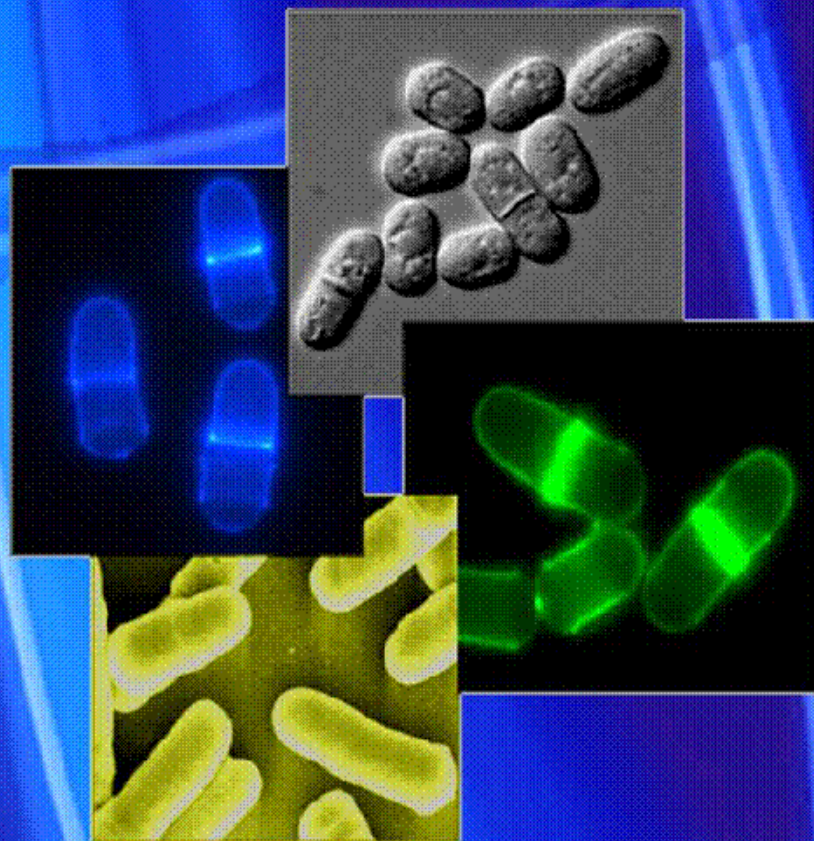


**Cpc2 REGULA LA RESPUESTA A ESTRÉS
Y EL CICLO CELULAR EN
*Schizosaccharomyces pombe***



ANDRÉS NÚÑEZ HERNÁNDEZ
TESIS DOCTORAL

2010



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Genética y Microbiología

**“Cpc2 REGULA LA RESPUESTA A ESTRÉS
Y EL CICLO CELULAR
EN *Schizosaccharomyces pombe*”**

TESIS DOCTORAL

Andrés Núñez Hernández

Murcia, 2010

**“Cpc2 REGULA LA RESPUESTA A ESTRÉS
Y EL CICLO CELULAR
EN *Schizosaccharomyces pombe*”**

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia, para optar al grado de Doctor en Biología, por el Licenciado **Andrés Núñez Hernández**.

Murcia, a 19 de Julio de 2010

Parte del trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Núñez A., Franco A., Madrid M., Soto T., Vicente J., Gacto M. y Cansado J.** Role for RACK1 orthologue in the modulation of stress response in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* (2009). 20(18):3996-4009.
- **Núñez A., Franco A., Soto T., Vicente J., Gacto M. y Cansado J.** The fission yeast Receptor of Activated C Kinase (RACK1) ortholog Cpc2 regulates mitotic commitment through Wee1 kinase. *J. Biol. Chem.* (En revisión).

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido financiado con las ayudas procedentes del Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto BFU2005-01401/MBC), Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto BFU2008-01653) y la Fundación Séneca - Región de Murcia (Proyectos 00475/PI/04 y 08725/PI/08).

Andrés Núñez Hernández ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación del Personal Investigador convocada por la Fundación Séneca (2005) dentro del Plan de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia 2003-2006.

ABREVIATURAS

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AMPc:** adenosín-monofosfato-3',5'-cíclico
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- BSA:** albúmina sérica bovina
- BPB:** azul de bromofenol
- CDK:** quinasa dependiente de ciclina
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DMSO:** Dimetil sulfóxido
- D.O.:** densidad óptica
- DTT:** ditioneitol
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- GAP:** proteína activadora de la actividad GTPasa
- GEF:** factor intercambiador de GFP
- GFP:** proteína fluorescente verde
- HA:** epítipo de hemaglutinina
- HA6H:** epítipo de hemaglutinina seguido de 6 histidinas consecutivas
- HEPES:** ácido N-(2-hidroxiethyl)-piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
- kDa:** kiloDalton
- MAPK:** MAP quinasa, proteína quinasa activada por mitógenos
- MAPKK:** MAP quinasa quinasa
- MAPKKK:** MAP quinasa quinasa quinasa
- MES:** ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico
- MOPS:** ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico
- NP-40:** nonidet P-40
- ORF:** fase de lectura abierta
- P:** ortofosfato
- PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida
- pb:** pares de bases
- PBS:** tampón fosfato salino
- PBST:** tampón fosfato salino con Tween-20
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PKA:** proteína quinasa dependiente de AMPc
- PKC:** proteína quinasa C

p/p: peso soluto/peso disolución
p/v: peso/volumen
r.p.m.: revoluciones por minuto
SAPK: proteína quinasa activada por estrés
SDS: dodecil sulfato de sodio
SPB: Cuerpo polar del huso
SSC: citrato de sodio salino
TAE: tampón Tris-acético EDTA
TBS: tampón Tris salino
TBST: tampón Tris salino con Tween-20
TE: Tris-EDTA
Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano
U.R.: unidades relativas
V: voltios
v/v: volumen/volumen
YGRC: "*Yeast Genetic Resource Center*"

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
1.1.- Ciclo de vida de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
2.- EL CICLO CELULAR DE <i>S. pombe</i>	5
2.1.- Regulación del ciclo celular en <i>S. pombe</i>	7
2.1.1.- Regulación de la actividad de Cdc2 a lo largo del ciclo celular en <i>S. pombe</i>	8
2.1.1.1.- La transición G ₂ /M: Cdc25 y Wee1.....	8
2.1.1.2.- La transición G ₁ /S: APC/Ste9, APC/Slp1, Rum1 y los dímeros Cdc2-Ciclina.....	10
2.1.2.- Inhibidores y activadores de la quinasa Wee1.....	10
2.1.3.- Reguladores de la actividad de la fosfatasa Cdc25.....	14
2.1.4.- Los <i>checkpoints</i>	16
2.1.4.1.- SAC (" <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> ").....	16
2.1.4.2.- Los checkpoints de daño del ADN.....	16
3.- LAS RUTAS DE MAP QUINASAS	17
3.1.- Conservación evolutiva de las rutas de MAP quinasas.....	18
3.2.- La ruta de MAP quinasa de respuesta a estrés (SAPK, " <i>Stress Activated Protein Kinase</i> ").....	20
3.2.1.- Sensores.....	21
3.2.2.- Reguladores de respuesta.....	21
3.2.3.- Componentes del módulo de MAP quinasas.....	22
3.2.4.- Efectores de Sty1.....	24
3.2.5.- Regulación negativa de Sty1 por fosfatasas.....	26
3.3.- La ruta de MAP quinasas de integridad celular.....	26
3.3.1.- Elementos que actúan por encima del módulo de MAP quinasas de integridad celular.....	27
3.3.2.- El módulo de MAP quinasas de integridad celular.....	29
3.3.3.- Efectores de Pmk1.....	32
3.3.4.- Regulación negativa.....	32
3.4.- Interconexión entre las rutas de MAP quinasa de respuesta a estrés y de integridad celular.....	33
4.- RACK1	34
4.1.- Identificación y caracterización de RACK1.....	34

4.2.- Estructura y función de las proteínas con dominios WD40	35
4.3.- RACK1 participa en la regulación de múltiples procesos celulares	36
4.4.- RACK1 es un componente estructural del ribosoma eucariótico	39
5.- ORTÓLOGOS DE RACK1 EN LEVADURAS	41
5.1.- ASC1 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
5.2.- Cpc2 en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	42

OBJETIVOS

OBJETIVOS.....	47
----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MICROORGANISMOS	51
1.1.- Estirpes de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	51
1.2.- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	54
2.- PLÁSMIDOS	54
3.- MEDIOS DE CULTIVO	56
3.1.- Medios empleados para el crecimiento y selección de <i>E. coli</i>	56
3.2.- Medios empleados para el crecimiento, selección y mantenimiento de <i>S. pombe</i>	56
4.- CONDICIONES DE CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS. ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO, RECUENTO CELULAR Y TAMAÑO EN DIVISIÓN	58
4.1.- Condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	58
4.2.- Condiciones de cultivo para <i>S. pombe</i>	58
4.3.- Estimación del crecimiento, recuento celular y tamaño en división	59
5.- PURIFICACIÓN DE ASCOSPORAS DE <i>S. pombe</i>	59
6.- TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN	60
7.- TRATAMIENTOS DE ESTRÉS	61
8.- ENSAYOS DE VIABILIDAD	62
9.- ENSAYO DE SENSIBILIDAD A β-GLUCANASAS	62
10.- SINCRONIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR	63
10.1.- Citometría de flujo	63
10.2.- Ensayos de unión a cromatina <i>in vitro</i>	64
11.- TÉCNICAS MICROSCÓPICAS	64
12.- FRACCIONAMIENTO DE POLISOMAS	65

13.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	66
13.1.- Obtención y manipulación de muestras de ADN	66
13.1.a) Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	66
13.1.b) Aislamiento de ADN genómico de <i>S. pombe</i>	66
13.1.c) Determinación de la concentración de ADN total	67
13.1.d) Digestión del ADN con enzimas de restricción	67
13.1.e) Electroforesis de ADN en geles de agarosa y purificación de ADN a partir de geles	67
13.1.f) Clonación de fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción	67
13.1.g) Reacción en amplificación de ADN (PCR)	68
13.1.h) Mutagénesis dirigida	70
13.1.i) Secuenciación del ADN	70
13.1.j) Comprobación de genotipos mediante PCR a partir de colonia	70
13.2.- Obtención y manipulación de muestras de ARN	71
13.2.a) Aislamiento del ARN total de <i>S. pombe</i>	71
13.2.b) Valoración de la concentración de ARN total	72
13.2.c) Análisis de la expresión génica mediante <i>Northern blotting</i>	72
13.2.d) Autorradiografía y análisis densitométrico	74
14.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	74
14.1.- Obtención de los extractos celulares y preparación de las muestras de proteína	74
14.2.- Purificación de proteínas fusionadas a HA6H	75
14.3.- Ensayos de inmunoprecipitación	75
14.4.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	76
14.5.- Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (<i>Western-blotting</i>)	76
14.5.a) Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	76
14.5.b) Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa	77
14.5.c) Análisis densitométrico	78
15.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	78

RESULTADOS

CAPÍTULO I: Cpc2 modula la actividad de las rutas de MAP quinasas y la respuesta a estrés en <i>S. pombe</i>	83
---	----

1.- LOS NIVELES DE Cpc2 NO VARÍAN EN RESPUESTA A CAMBIOS EN LAS CONDICIONES AMBIENTALES	85
--	----

2.- INTERACCIÓN DE Cpc2 CON LA RUTA DE MAP QUINASAS DE INTEGRIDAD CELULAR	86
2.1.- Cpc2 regula la forma, el tamaño celular y la septación de manera independiente de la actividad de Pmk1	87
2.2.- Cpc2 participa en el mantenimiento de la integridad de la pared celular independiente de la actividad de Pmk1	88
2.3.- Cpc2 regula el estado basal de fosforilación de Pmk1.....	89
2.4.- Cpc2 controla negativamente la homeostasis celular del cloruro	90
2.5.- Cpc2 está implicada en la regulación de la fosforilación de Pmk1 en respuesta a estrés	92
3.- REGULACIÓN DE LA RUTA SAPK POR Cpc2	94
3.1.- Los mutantes carentes de <i>cpc2</i> ⁺ presentan una fosforilación defectiva de Sty1 en respuesta a estrés	94
3.2.- Cpc2 regula positivamente los niveles de las fosfatasa de tirosina Pyp1 y Pyp2.....	95
3.3.- Cpc2 regula los niveles del factor de transcripción Atf1	98
3.4.- El factor de inicio de la traducción eIF2 α no está implicado en la regulación de la expresión de Atf1 por Cpc2	100
4.- Cpc2 PARTICIPA EN LA RESPUESTA DE <i>S. pombe</i> FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO	101
4.1.- Sensibilidad a estrés del mutante nulo $\Delta cpc2$	101
4.2.- La actividad de Cpc2 es importante en la respuesta a estrés oxidativo.....	102
4.3.- La cinética de acumulación nuclear de Pap1 en respuesta al peróxido de hidrógeno está alterada en el mutante $\Delta cpc2$	103
4.4.- Cpc2 modula la respuesta al estrés por H ₂ O ₂ a nivel transcripcional y traduccional	106
5.- RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE Cpc2 EN EL RIBOSOMA	108
5.1.- Los residuos de Arginina-36 y Lisina-38 son esenciales para la interacción de Cpc2 con el ribosoma	108
5.2.- La presencia de Cpc2 en el ribosoma es necesaria para su función como regulador positivo de distintas proteínas reguladoras de la respuesta a estrés.....	111
 <i>Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast</i>	117
 CAPÍTULO II: Cpc2 regula la transición G₂/M del ciclo celular	133
1.- Cpc2 COMO REGULADOR DEL CICLO CELULAR	135
1.1.- Cpc2 regula de manera positiva la transición G ₂ /M del ciclo celular	135
1.2.- Cpc2 no regula la transición G ₁ /S del ciclo celular en <i>S. pombe</i>	137

2.- Cpc2 Y LA RUTA SAPK NO INTERACCIONAN DURANTE LA REGULACIÓN DE LA MITOSIS	139
3.- INTERACCIÓN ENTRE Cpc2 Y LOS REGULADORES DE Cdc2 DURANTE LA PROGRESIÓN G₂/M	140
3.1.- Cpc2 regula el ciclo celular independientemente de la fosfatasa Cdc25.....	140
3.2.- Cpc2 regula la entrada en mitosis por medio de la quinasa inhibidora del ciclo celular Wee1	141
4.- Cpc2 REGULA DESDE EL RIBOSOMA LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR A NIVEL TRADUCCIONAL	142
4.1.- Cpc2 regula negativamente los niveles de Wee1.....	143
4.2.- Los niveles de Cdr2, un inhibidor de Wee1, están reducidos en el mutante nulo $\Delta cpc2$	144
 <i>The fission yeast Receptor of Activated C Kinase (RACK1) ortholog Cpc2 regulates mitotic commitment through Wee1 kinase</i>	151

DISCUSIÓN

1.- Cpc2 REGULA LA ACTIVIDAD DE LA RUTA DE MAPK DE INTEGRIDAD CELULAR, AUNQUE NO ES UN COMPONENTE DE DICHA RUTA	173
2.- Cpc2 MODULA NEGATIVAMENTE EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE Sty1 Y Pmk1 POR MEDIO DE LAS FOSFATASAS DE TIROSINA Pyp1 Y Pyp2	174
3.- Cpc2 ES IMPORTANTE DURANTE LA RESPUESTA CELULAR FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL DESARROLLO SEXUAL EN <i>S. pombe</i>	175
4.- Cpc2 REGULA LA TRANSICIÓN G₂/M DEL CICLO CELULAR POR MEDIO DE Wee1	179
5.- LA LOCALIZACIÓN DE Cpc2 EN EL RIBOSOMA ES NECESARIA PARA UNA ADECUADA RESPUESTA A ESTRÉS, EL DESARROLLO SEXUAL Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN <i>S. pombe</i>	181
6.- UN MODELO PARA EXPLICAR LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE Cpc2 EN <i>S. pombe</i>	184

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	189
---------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	191
---------------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I.1.- Quinasas dependientes de ciclinas en distintos organismos	7
Tabla I.2.- Tipos de ciclinas implicadas en el control del ciclo celular	8
Figura I.1.- Imágenes de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> obtenidas empleando distintas técnicas microscópicas	3
Figura I.2.- Clasificación taxonómica de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
Figura I.3.- Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	5
Figura I.4.- Ciclo celular de <i>S. pombe</i>	6
Figura I.5.- Mecanismos de regulación de la actividad de Cdc2 a lo largo del ciclo celular	9
Figura I.6.- Inhibidores y activadores de Wee1 y Cdc25	11
Figura I.7.- Modelo de regulación de la entrada en mitosis en función del tamaño celular	12
Figura I.8.- Esquema de la organización de las cascadas de MAP quinasas y la transducción de señales	18
Figura I.9.- Rutas de MAP quinasas presentes en diferentes organismos	19
Figura I.10.- Ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i>	23
Figura I.11.- Ruta de MAP quinasas de integridad celular en <i>S. pombe</i>	30
Figura I.12.- Interrelación entre las rutas de MAP quinasas SAPK y de integridad celular en <i>S. pombe</i>	33
Figura I.13.- Secuencia y modelo estructural de RACK1/Cpc2	35
Figura I.14.- Modelo tridimensional del ribosoma eucariótico y localización de RACK1/Cpc2	40

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla MM.1.- Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> empleadas en este trabajo	49
Tabla MM.2.- Composición de los stocks utilizados de sales, minerales y vitaminas	55
Tabla MM.3.- Plásmidos empleados como molde de ADN en las reacciones de PCR	66
Tabla MM.4.- Oligonucleótidos empleados para la clonación en vectores de sobre-expresión	66
Tabla MM.5.- Oligonucleótidos empleados para la delección de los genes indicados	67
Tabla MM.6.- Oligonucleótidos empleados para la obtención de fusiones a diferentes epítomos	67

Tabla MM.7.- Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de mutagénesis dirigida de <i>cpc2</i> ⁺	68
Tabla MM.8.- Oligonucleótidos empleados para la comprobación de genotipos	69
Tabla MM.9.- Oligonucleótidos utilizados en la obtención de sondas para los estudios de expresión génica.....	71
Tabla MM.10.- Anticuerpos y condiciones de uso empleadas en este trabajo	75
Figura MM.1.- Construcción de los plásmidos pIL-cpc2-GFP y pIL-cpc2(DE)-GFP	53

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Figura RI.1.- La expresión de Cpc2 no se ve afectada por las condiciones nutricionales del medio ni en respuesta a estrés	85
Figura RI.2.- Morfología celular y tamaño en división	87
Figura RI.3.- Nivel de septación.....	88
Figura RI.4.- Sensibilidad a β -glucanasa	88
Figura RI.5.- Viabilidad celular en presencia de caspofungina.....	89
Figura RI.6.- Estado basal de fosforilación de Pmk1	89
Figura RI.7.- Ensayos de sensibilidad a cloruro y fenotipo "vic"	90
Figura RI.8.- Estado basal de fosforilación de Pmk1	91
Figura RI.9.- Ensayos de sensibilidad a cloruro.....	91
Figura RI.10.- Cpc2 regula negativamente la fosforilación de Pmk1 en estrés	92
Figura RI.11.- La expresión de <i>cpc2</i> ⁺ revierte los efectos sobre el estado de fosforilación de Pmk1 y el tamaño celular en los mutantes $\Delta cpc2$	93
Figura RI.12.- Fosforilación de Pmk1 empleando un anticuerpo anti-fosfo-tirosina.....	93
Figura RI.13.- Fosforilación de Sty1 en respuesta a estrés	95
Figura RI.14.- La delección de <i>cpc2</i> ⁺ en un fondo genético <i>wis1</i> ^{DD} recupera la activación normal de Pmk1 respecto al mutante sencillo <i>wis1</i> ^{DD}	96
Figura RI.15.- Niveles de las fosfatasa Pyp1 y Pyp2	97
Figura RI.16.- Niveles de las fosfatasa Ptc1, Ptc3 y Pmp1	98
Figura RI.17.- El grado de fosforilación basal de Pmk1 en las células $\Delta pyp1 \Delta cpc2$ es similar al del mutante sencillo $\Delta pyp1$	98
Figura RI.18.- Los niveles de proteína Atf1 están regulados positivamente por Cpc2	99
Figura RI.19.- Los niveles de ARNm de <i>atf1</i> ⁺ , <i>pyp1</i> ⁺ y <i>pyp2</i> ⁺ no están afectados en el mutante $\Delta cpc2$	99
Figura RI.20.- eIF2 α no está implicado en el control de la expresión de Atf1 por Cpc2	101
Figura RI.21.- Ensayos de sensibilidad a estrés	102
Figura RI.22.- Análisis de la ruta Sty1-Atf1-Pyp2 en respuesta a H ₂ O ₂	103
Figura RI.23.- La acumulación nuclear de GFP-Pap1 está retrasada en las células $\Delta cpc2$	104

Figura RI.24.- El retraso en la acumulación nuclear de GFP-Pap1 en las células $\Delta cpc2$ es específico de estrés por H_2O_2	105
Figura RI.25.- La expresión de los genes dependientes de Pap1 en respuesta a H_2O_2 está retrasada en las células $\Delta cpc2$	107
Figura RI.26.- El incremento en la síntesis de catalasa citoplasmática está bloqueado en las células $\Delta cpc2$ en respuesta al H_2O_2	108
Figura RI.27.- Posición de los aminoácidos mutagenizados en la versión Cpc2(DE)-GFP.....	109
Figura RI.28.- Localización y niveles de expresión de las versiones de Cpc2 fusionadas a GFP.....	109
Figura RI.29.- Análisis del fraccionamiento de polisomas por ensayos tipo <i>Western</i>	110
Figura RI.30.- La fosforilación de Pmk1 está incrementada en las células que expresan la versión Cpc2(DE)-GFP	111
Figura RI.31.- Los niveles de Pyp1 y Pyp2 son menores en el mutante Cpc2(DE)-GFP.....	111
Figura RI.32.- Los mutantes que expresan Cpc2(DE)-GFP presentan un descenso en los niveles de Atf1	112

CAPÍTULO II

Figura RII.1.- Morfología celular y tamaño en división	135
Figura RII.2.- Cpc2 regula de manera positiva la transición G_2/M del ciclo celular.....	136
Figura RII.3.- Análisis de la transición G_1/S por citometría de flujo	137
Figura RII.4.- Ensayos de unión a cromatina <i>in situ</i> de Mcm4 durante la transición G_1/S	138
Figura RII.5.- Niveles de fosforilación de Cdc2 durante la transición G_1/S	139
Figura RII.6.- Epistasia entre Cpc2 y la ruta SAPK	139
Figura RII.7.- Cpc2 regula el ciclo celular de manera independiente de Cdc25	140
Figura RII.8.- La termosensibilidad y el tamaño en división de las células se incrementan al deletar el gen $cpc2^+$ en un fondo genético $cdc2-3w \Delta cdc25$	141
Figura RII.9.- Cpc2 regula el ciclo celular a través de Wee1	142
Figura RII.10.- La unión de Cpc2 al ribosoma es crítica para la regulación del ciclo celular	143
Figura RII.11.- Cpc2 regula los niveles de Wee1 pero no de Cdc25	143
Figura RII.12.- El tratamiento con cicloheximida incrementa de manera aditiva los niveles de Wee1 en el mutante $\Delta cpc2$	144
Figura RII.13.- Los niveles de Cdr2, un inhibidor de Wee1, están reducidos en el mutante $\Delta cpc2$	145
Figura RII.14.- La delección de $cpc2^+$ incrementa el tamaño en división de manera aditiva en los mutantes $\Delta cdr2$, $\Delta nim1 \Delta cdr2$ y $\Delta pom1$	146

DISCUSIÓN

Figura D.1.- Ensayo de sensibilidad al DEM.....	176
Figura D.2.- Cpc2 interviene en la señalización de nutrientes y la esporulación.....	177
Figura D.3.- Los mutantes $\Delta nrd1$ no muestran diferencias significativas en el grado de fosforilación de Pmk1 ni en los niveles de Atf1 y Pyp2.....	183
Figura D.4.- Modelo propuesto para la función de Cpc2 en <i>S. pombe</i>	185

INTRODUCCIÓN

1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Schizosaccharomyces pombe*

La primera referencia a *Schizosaccharomyces pombe* (Figura I.1) data de 1893, cuando P. Lindner aisló este microorganismo a partir de cerveza de mijo elaborada en ciertas regiones de África. El nombre genérico pretende resaltar las similitudes con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y hace referencia a su particular mecanismo de división por fisión (*Schizo-*). Por otro lado, el epíteto específico *pombe* indica el nombre local de la cerveza elaborada con este microorganismo. Curiosamente, la mayoría de las estirpes silvestres y mutantes de *S. pombe* utilizadas en los laboratorios proceden de un aislamiento realizado en Europa por A. Osterwalder (1921) a partir de mosto.

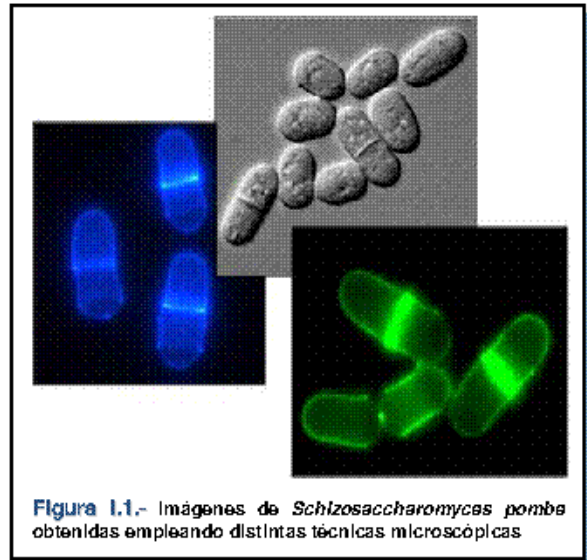


Figura I.1.- Imágenes de *Schizosaccharomyces pombe* obtenidas empleando distintas técnicas microscópicas

S. pombe es un eucariota unicelular que forma colonias de células libres inmóviles. Su morfología celular es cilíndrica, con un tamaño de 12-15 x 3-4 μm . Taxonómicamente, *S. pombe* queda encuadrada dentro de los ascomicetos (Figura I.2) al igual que *S. cerevisiae*. Sin embargo, el análisis de las secuencias génicas indica que la separación evolutiva entre ambas

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

Figura I.2.- Clasificación taxonómica de *Schizosaccharomyces pombe*. Adaptado de <http://ndexfungorum.org/> y James *et al.* (2006).

levaduras ocurrió próxima a la divergencia de los hongos de plantas y metazoos hace 1000-1200 millones de años (Sipiczki, 2000, Heckman *et al.*, 2001, James *et al.*, 2006). 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.

S. pombe posee una serie de características que lo hacen especialmente idóneo como modelo de estudio en muchos campos de la biología celular. Su genoma está totalmente secuenciado (3 cromosomas, ~ 14 Mb, Wood *et al.*, 2002) y su ciclo biológico es rápido y

fundamentalmente haploide, lo que permite su manipulación genética de manera sencilla sin interferencias de una segunda copia génica. Además, la existencia de un ciclo sexual permite, a través de la conjugación, combinar mutaciones, crear estirpes con proteínas marcadas con distintos epítomos o condicionar la expresión de genes de una manera rápida y sencilla.

Como eucariota simple, comparte un alto grado de similitud con las células de organismos superiores en cuanto a la regulación de procesos biológicos fundamentales como la organización del citoesqueleto, la compartimentalización celular, el procesamiento del ARN, etc. Además, su particular mecanismo de división por bipartición, a diferencia de la mayoría de levaduras que se dividen por gemación, la hace especialmente interesante para el estudio del ciclo celular, pudiendo reconocerse en qué fase del ciclo se encuentran las células simplemente por su morfología.

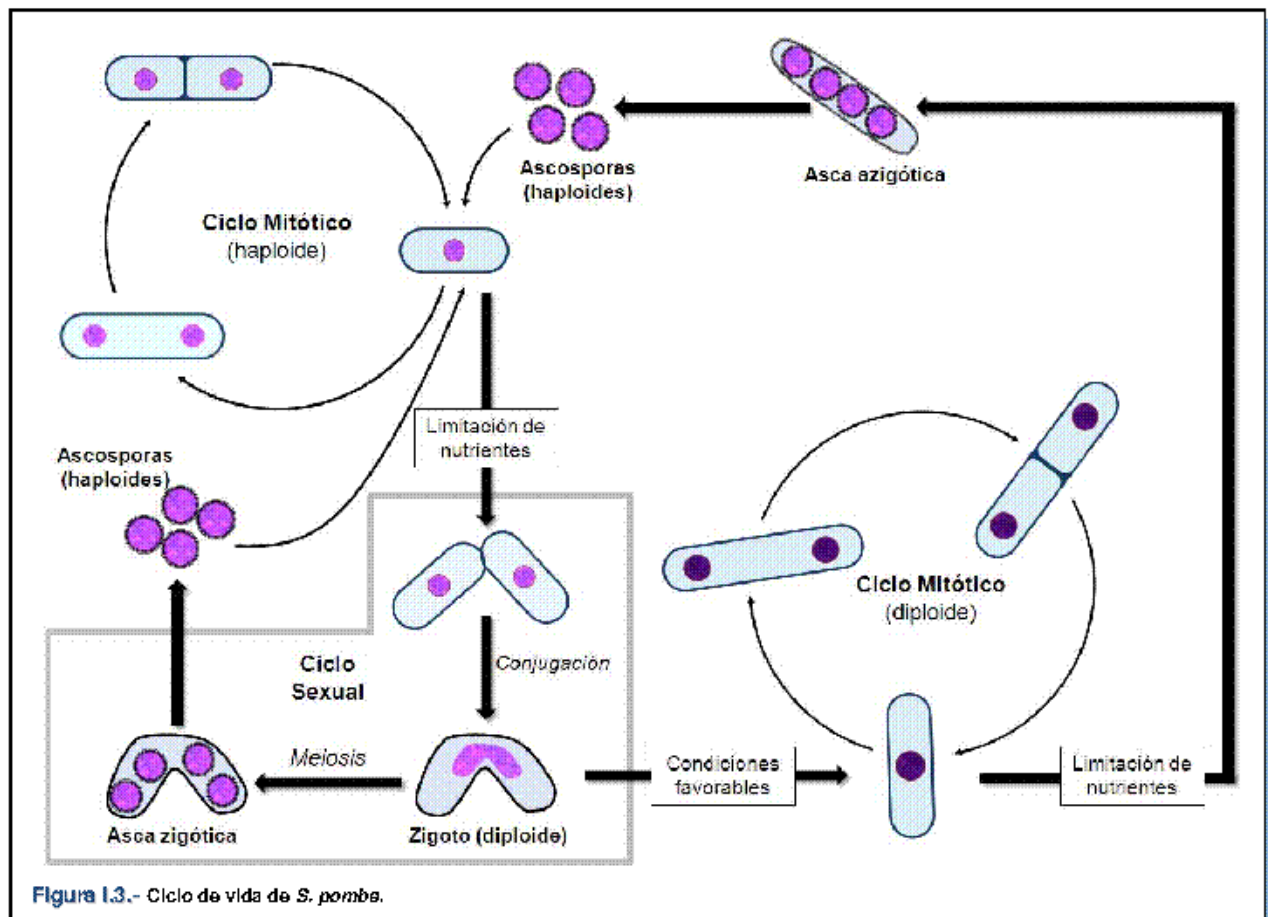
Como componente de la comunidad fúngica, *S. pombe* presenta una pared celular que le proporciona protección mecánica, forma y estabilidad osmótica. Esta característica permite su empleo como modelo en el análisis de los procesos de formación, biosíntesis y degradación de este componente celular, y para estudios con fármacos antifúngicos.

1.1.- Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*

En condiciones favorables de crecimiento las células de *S. pombe* son haploides y se dividen asexualmente por mitosis (ciclo mitótico; Figura 1.3). Sin embargo, cuando las condiciones externas se vuelven adversas, *S. pombe* puede llevar a cabo un ciclo sexual por conjugación entre tipos sexuales opuestos, denominados h^+ y h^- (cepas heterotálicas). Además, existen cepas homotálicas (h^{90}) capaces de conjugarse entre ellas ya que en estas condiciones algunas células pueden sufrir un cambio del tipo sexual.

En medios de cultivo con glucosa, el ciclo vegetativo de una cepa haploide de *S. pombe* dura aproximadamente 2-4 horas. Sin embargo, en respuesta a la limitación de nutrientes, y especialmente en ausencia de nitrógeno, se induce el ciclo sexual (Figura 1.3). Las células bloquean su ciclo celular en la fase G_1 , y, si en la población se encuentran presentes ambos tipos sexuales (h^+ y h^-), comienza el proceso de conjugación con la elongación de las células hacia las del sexo opuesto ("*shmooing*"). Las dos células se fusionan para dar lugar a un cigoto diploide que entra en un proceso de meiosis seguido de la esporulación, donde se genera un asca con cuatro esporas haploides. Finalmente, las paredes del asca se autolisan liberando los cuatro productos meióticos, que pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en

condiciones abióticas (Leupold, 1950). Cuando las condiciones ambientales lo permiten, las esporas germinan y entran nuevamente en el ciclo mitótico (Yamamoto *et al.*, 1997).



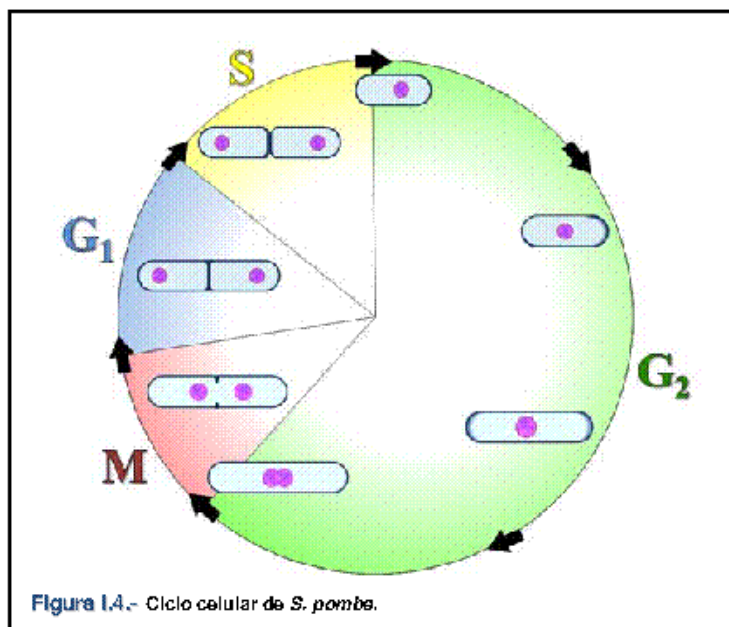
Alternativamente, el cigoto puede desarrollar un ciclo vegetativo diploide si las condiciones del medio mejoran en el momento de su formación. Sin embargo, los diploides son bastante inestables, y ante la limitación de nutrientes inician la meiosis sin necesidad de conjugar, generando ascas azigóticas constituidas por cuatro ascosporas haploides (Figura I.3).

2.- EL CICLO CELULAR DE *S. pombe*

Al igual que el resto de organismos eucariotas, *Schizosaccharomyces pombe* presenta cuatro fases diferenciadas durante su ciclo celular: G_1 , S, G_2 y M (Mitchison, 1970; Figura I.4). La fase G_1 o "Gap 1" supone un intervalo entre la mitosis y la replicación de los cromosomas, caracterizado por la síntesis de ARN y proteínas necesarias para la duplicación del ADN. En

este punto, si la disponibilidad de nutrientes es limitada, las células pueden iniciar el ciclo sexual. Si no, entran en la fase S, comenzando la replicación del ADN de forma simultánea en varios puntos del genoma. 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).

La división celular ocurre por 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.



La pared celular hasta dividir el citoplasma en dos partes iguales. Entonces, 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 (septo 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 la degradación hacia el interior del septo primario, liberándose así las dos células hijas

al comienzo de la fase S. Las fases M, G₁ y S ocurren normalmente antes de la separación física de las dos células hijas, por lo que cuando esto sucede ya han alcanzado la fase G₂ temprana (MacNeill y Fantes, 1997).

Tras la división celular, las células hijas comienzan a crecer de manera monopolar por el polo "viejo", y una vez alcanzan una masa crítica determinada se inicia también el crecimiento por el polo de nueva formación. Esta activación del crecimiento bipolar (NETO, "New End Take Off") ocurre ya en la fase G₂ o "Gap 2", etapa que ocupa en torno al 70% del ciclo de la levadura, durante la que se produce un incremento de la masa y tamaño celular, preparándose para la división. Cuando alcanza un tamaño crítico, la célula entra en mitosis (fase M), se produce la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la segregación de las cromátidas hermanas a ambos polos celulares (Hagan y Hyams, 1988), comenzando un nuevo ciclo.

2.1.- Regulación del ciclo celular en *S. pombe*

El mecanismo de división por fisión binaria de *S. pombe* lo convierte en una herramienta especialmente útil para los estudios de regulación del ciclo celular, puesto que los mutantes que presentan un retraso en la entrada en mitosis alcanzan un mayor tamaño antes de dividirse, y por el contrario, aquellos que entran prematuramente, se dividen a un tamaño menor (Fantès 1979; Nurse y Thuriaux, 1980). Además, la regulación de la mitosis en animales multicelulares presenta una mayor similitud con *S. pombe* que con la levadura gemante *S. cerevisiae*, por lo que los estudios en este campo han resultado muy fructíferos empleando este microorganismo como modelo (Russell y Nurse, 1986 y 1987).

Los mecanismos de regulación del ciclo celular se encuentran altamente conservados en los organismos eucariotas. De todos los componentes implicados en el ciclo de división celular (*cdcs*), destacan las quinasas dependientes de ciclinas o CDKs ("*Cyclin-Dependent Kinases*") como elementos centrales de control. La concentración de estas quinasas se mantiene constante a lo largo del ciclo celular. Sin embargo, sufren bruscas variaciones en su estado de fosforilación que conllevan cambios drásticos en la actividad enzimática. Las oscilaciones en la actividad de las CDKs dependen fundamentalmente de las variaciones en los niveles de sus unidades reguladoras denominadas ciclinas, en cuya ausencia el sitio activo de la quinasas queda bloqueado, reduciendo la actividad de la quinasas (De Bondt *et al.*, 1993).

En las células humanas, que contienen más de diez genes diferentes que codifican proteínas de la familia de las CDKs, sólo unas pocas regulan directamente el ciclo celular. El resto forma complejos con otras proteínas o está implicado en la regulación de la diferenciación, la transcripción, o en respuesta a factores externos (Tabla I.1). Por el contrario, en *S. pombe* existe una única CDK esencial en el control del ciclo celular, Cdk1/Cdc2, fuertemente conservada en organismos superiores y otras levaduras (Lee y Nurse, 1987; Tabla I.1).

Especie	Denominación	Función o fase del ciclo en que participa
<i>S. cerevisiae</i>	CDK1/CDC28	Todas
<i>S. pombe</i>	Cdk1/Cdc2	Todas
<i>H. sapiens</i>	CDK1/CDC2	M
	CDK2	G ₁ /S, S y G ₂
	CDK3	G ₀ /G ₁
	CDK4	G ₁
	CDK5	Dif. neuronal
	CDK6	G ₁
	CDK7	CAK*, transcripción
	CDK8	Transcripción
	CDK9	Transcripción
	CDK10	Transcripción, G ₂ /M
	CDK11	Transcripción, M

Tabla I.1.- Quinasas dependientes de ciclinas en distintos organismos. Adaptado de *The Cell Cycle: principles of control*. Morgan (2007), y revisión de Romano y Jordano (2008). *CAK = Cdk-Activating Kinase.

A lo largo del ciclo celular las CDKs se asocian a diferentes ciclinas, resultando en diferentes complejos CDK-ciclina que regulan los procesos que ocurren en cada etapa. Estas ciclinas pueden clasificarse en cuatro tipos, dependiendo de su aparición durante el ciclo y sus funciones (Tabla I.2). Las ciclinas G₁-S, S y M están directamente implicadas en el control de los sucesos del ciclo celular, mientras que las ciclinas G₁ contribuyen al progreso del ciclo en respuesta a factores extracelulares (Tabla I.2).

Aunque en *S. pombe* existen tres ciclinas tipo B (Cdc13, Cig1, Cig2) y una tipo Cln (de mayor similitud con las ciclinas de *S. cerevisiae*) (Tabla I.2), sólo Cdc13 es esencial para la progresión del ciclo, lo que sugiere que el complejo formado por Cdc2-Cdc13 es suficiente para

regular tanto la fase S como la M, decidiendo si la célula duplica su ADN o entra en división (Fisher y Nurse, 1996).

Especie	Tipos de Ciclinas (y CDK a la que se une)			
	G1	G1/S	S	M
<i>S. pombe</i>	Puc1 (Cdc2)	Puc1, Cig1 (Cdc2)	Cig2, Cig1 (Cdc2)	Cdc13 (Cdc2)
<i>S. cerevisiae</i>	CLN3 (CDC28)	CLN1, CLN2 (CDC28)	CLB5, CLB6 (CDC28)	CLB1,2,3,4 (CDC28)
<i>H. sapiens</i>	Ciclina D1/2/3 (CDK4/6)	Ciclina E (CDK2)	Ciclina A (CDK2/1)	Ciclina B (CDK1)

Tabla I.2.- Tipos de ciclinas implicadas en el control del ciclo celular. Adaptado de *The Cell Cycle: principles of control*. Morgan (2007).

2.1.1.- Regulación de la actividad de Cdc2 a lo largo del ciclo celular en *S. pombe*

Siendo Cdc2 la única CDK presente en la levadura, su actividad está fuertemente regulada en todas las etapas del ciclo mediante tres mecanismos fundamentales: formación/degradación de complejos CDK-Ciclina, fosforilación/desfosforilación y la presencia de inhibidores (Figura I.5).

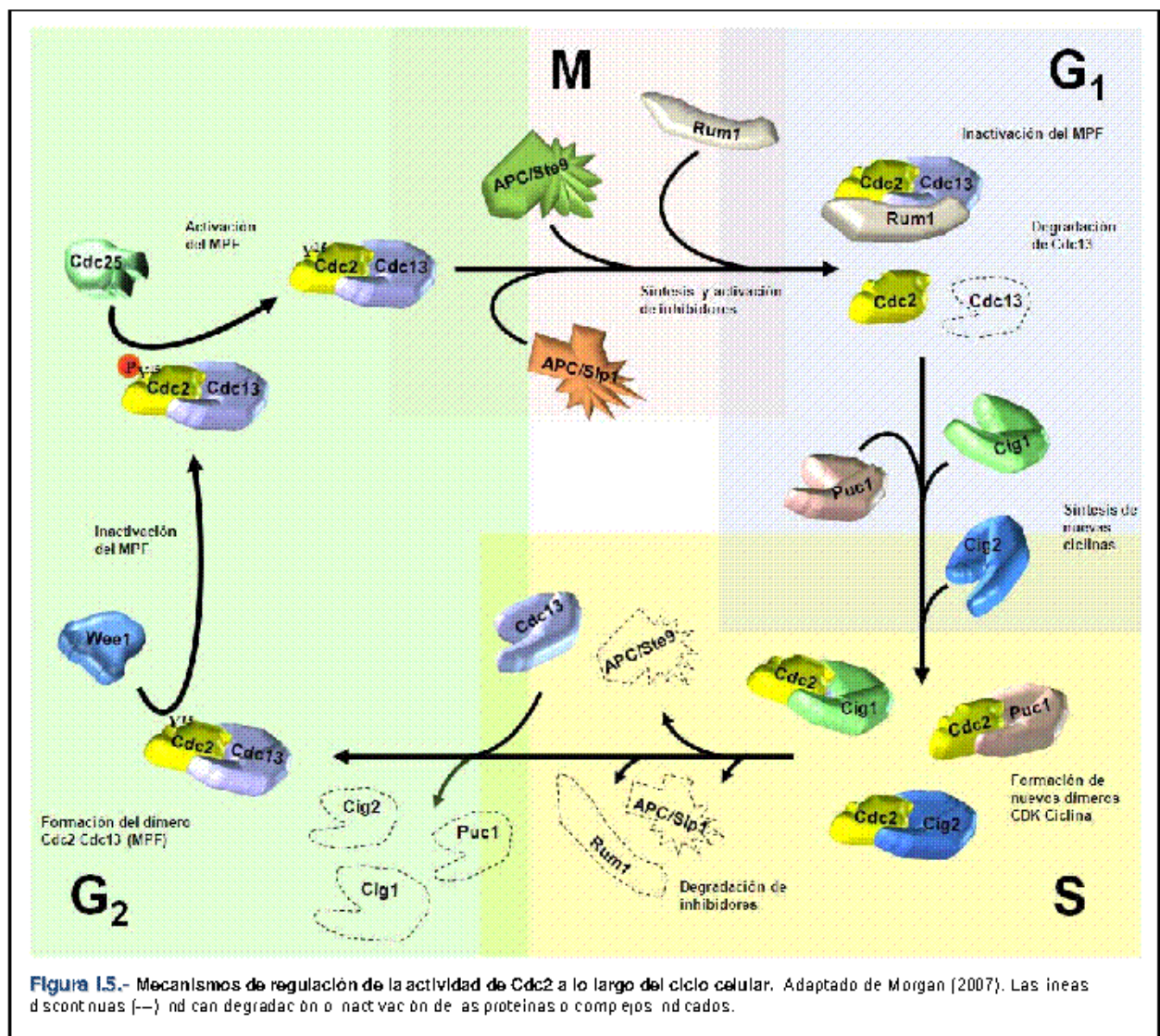
2.1.1.1.- La transición G₂/M: Cdc25 y Wee1

El componente central de la maquinaria del ciclo celular en *S. pombe* es el dímero Cdc2-Cdc13, conocido como MPF ("M-phase Promoting Factor"), el cual se va acumulando en el núcleo a lo largo de la fase G₂. En esta fase del ciclo, el MPF permanece inactivo por acción de las quinasas Wee1 y Mik1, capaces de fosforilar a Cdc2 en el residuo de Tirosina-15 (Tyr¹⁵), inhibiendo su actividad (Russell y Nurse, 1987; Gould y Nurse, 1989; Lundgren *et al.*, 1991) y evitando la entrada en mitosis.

A diferencia del modelo de mamíferos, donde la decisión de entrar en división se lleva a cabo por un *checkpoint* que asegura que se ha producido la replicación del ADN, en *S. pombe* la resolución se toma al alcanzar un tamaño celular crítico (Kellogg, 2003; Rupes, 2002). Recientemente, se ha establecido la conexión entre el tamaño celular y la decisión de entrar en

mitosis (Moseley *et al.*, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009). Los principales reguladores negativos de la actividad de Wee1 son las quinasas Cdr2 y Cdr1/Nim1 y, según estos trabajos, es el crecimiento de la célula el que genera un gradiente de las proteínas implicadas en la regulación de Cdr2 y Cdr1 y lleva a su activación, inactivando a Wee1 y permitiendo así la activación de Cdc2 (ver Apartado 2.1.2).

Al final de la fase G₂, la inhibición de Wee1 y la activación de la fosfatasa Cdc25 (capaz de eliminar el grupo fosfato de la Tyr¹⁵ de Cdc2; Russell y Nurse, 1986; Millar *et al.*, 1991) hacen que se genere un pico de alta actividad del PMF, promoviendo la entrada en mitosis (Norbury y Nurse, 1990; Stem y Nurse, 1996) (Figura 1.5).



2.1.1.2.- La transición G₁/S: APC/Ste9, APC/Slp1, Rum1 y los dímeros Cdc2-Ciclina

La actividad del propio MPF durante la entrada en mitosis estimula la activación del APC ("Anaphase-Promoting Complex), encargado de señalizar la degradación de varios reguladores del ciclo celular (Amon *et al.*, 1994). La formación de los complejos APC/Slp1 y APC/Ste9 promueven la degradación de Cdc13 mientras la célula avanza hacia la fase G₁ (Kitamura *et al.*, 1998). También en esta etapa aparece Rum1, un inhibidor estequiométrico capaz de unirse al dímero Cdc2-Cdc13 e inactivarlo (Moreno y Nurse, 1994; Moreno *et al.*, 1994; Correa-Bordes y Nurse, 1995; Martín-Castellanos *et al.*, 1996) (Figura 1.5). De este modo, el descenso de los niveles de la ciclina Cdc13 y la inhibición llevada a cabo por Rum1 conducen a un descenso de la actividad del MPF.

Durante la fase G₁ se produce la expresión de otras ciclinas y la formación de nuevos complejos que permiten el progreso del ciclo: Cdc2-Cig1 (que fosforila y señaliza a Rum1 para su degradación durante las fases S y G₂; Correa-Bordes *et al.*, 1997), Cdc2-Puc1 (Martín-Castellanos *et al.*, 2000) y fundamentalmente Cig2 (estimulado por el factor de transcripción Cdc10). El complejo Cdc2-Cig2 no es degradado por APC/Ste9 y no se inhibe eficazmente por Rum1, de modo que en las células se incrementa la actividad de Cdc2 lo suficiente para fosforilar e inactivar a Ste9, disociar el APC (Blanco *et al.*, 2000) y eliminar a Rum1. Se alcanzan así los niveles de actividad de Cdc2 necesarios para fosforilar y modular la actividad de proteínas implicadas en el comienzo de la fase S y terminar de degradar a los inhibidores. Cuando finaliza la replicación del ADN, las células se encuentran en fase G₂ temprana, iniciando un nuevo ciclo (Figura 1.5).

2.1.2.- Inhibidores y activadores de la quinasa Wee1

La actividad del MPF durante la mitosis es un paso crucial que debe estar sujeto a un control muy riguroso. Los dos elementos principales encargados de esta función son Wee1 y Cdc25, cuya regulación es compleja, no del todo conocida y en la que participan múltiples elementos para coordinar los procesos celulares con la división.

La quinasa Wee1 es la principal responsable de inhibir la entrada en mitosis por fosforilación de Cdc2 en un residuo conservado de tirosina (Tyr¹⁵) que inactiva a la proteína (Gould y Nurse, 1989; Lundgren *et al.*, 1991). Las células carentes de *wee1*⁺ entran prematuramente en mitosis y se dividen cuando alcanzan un tamaño que es aproximadamente la mitad del normal. Por el contrario, la sobre-expresión de este gen retrasa la mitosis, de modo que las células alcanzan un tamaño mayor antes de dividirse, indicando que es un regulador

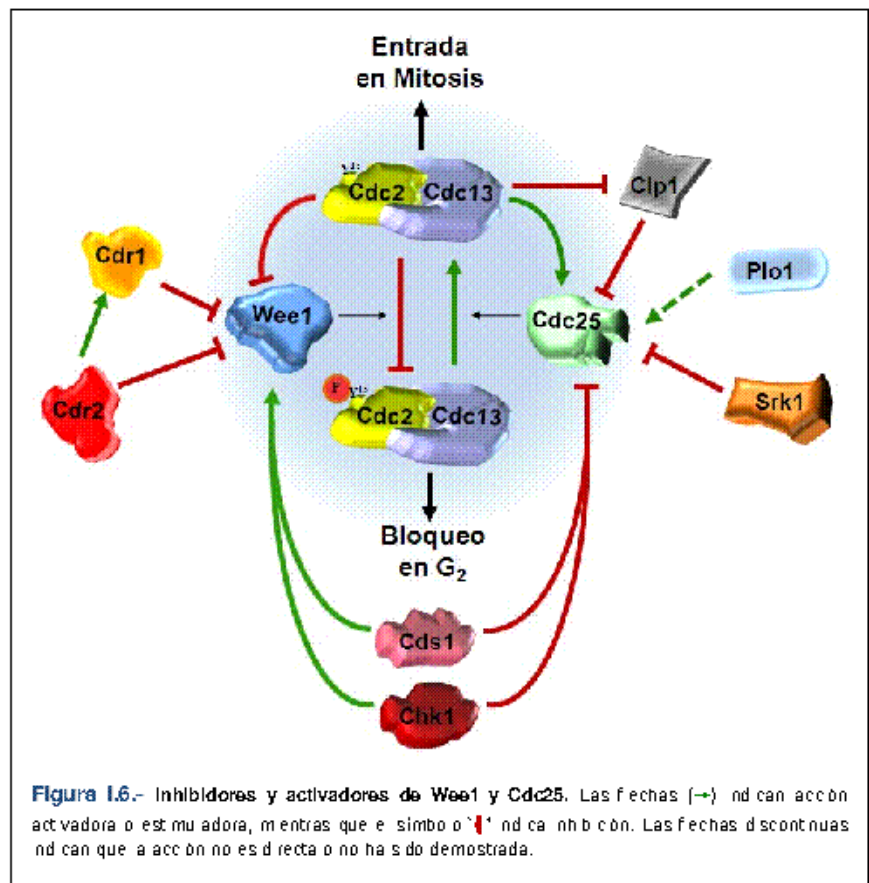
negativo de la mitosis y que además actúa de manera dosis-dependiente (Russell y Nurse, 1987).

Se trata de una proteína de ~97 kDa que localiza fundamentalmente en el núcleo, donde ejerce su actividad sobre Cdc2 (Aligue *et al.*, 1997). Su dominio quinasa aparece conservado en el extremo C-terminal. Sin embargo, el extremo N-terminal difiere mucho entre sus homólogos de *S. cerevisiae* (SWE1), *Drosophila melanogaster*, *Xenopus* y humanos (Aligue *et al.*, 1997), por lo que los mecanismos moleculares que regulan la actividad de Wee1 no están totalmente esclarecidos y pueden presentar diferencias significativas de un organismo a otro.

Puesto que se trata de un inhibidor de la entrada en mitosis, su actividad debería cambiar drásticamente al final de la fase G₂. A favor de esta idea se ha observado que, aunque los niveles de ARN mensajero de *wee1*⁺ se mantienen constantes a lo largo del ciclo, los niveles de proteína sufren una ligera oscilación, reduciéndose durante la entrada en mitosis y la fase G₁ (Aligue *et al.*, 1997), lo que sugiere una regulación a nivel de traducción del mensajero de *wee1*⁺ o post-traducciona, afectando a la estabilidad de la proteína.

Los estudios realizados hasta el momento en diversos organismos indican que la acumulación sucesiva de fosforilaciones constituye un mecanismo de regulación negativa de esta proteína (revisión de Kellogg, 2003; Lee *et al.*, 2005; Harvey *et al.*, 2005).

Los homólogos de Wee1 presentes en *S. pombe*, *S. cerevisiae* y *Xenopus* muestran una fuerte hiperfosforilación durante la división celular y, curiosamente, en los extractos obtenidos de *Xenopus* durante la mitosis, la actividad quinasa de XWEE1 está reducida. En *S. cerevisiae*, SWE1/WEE1 es degradada durante la transición G₂/M, su

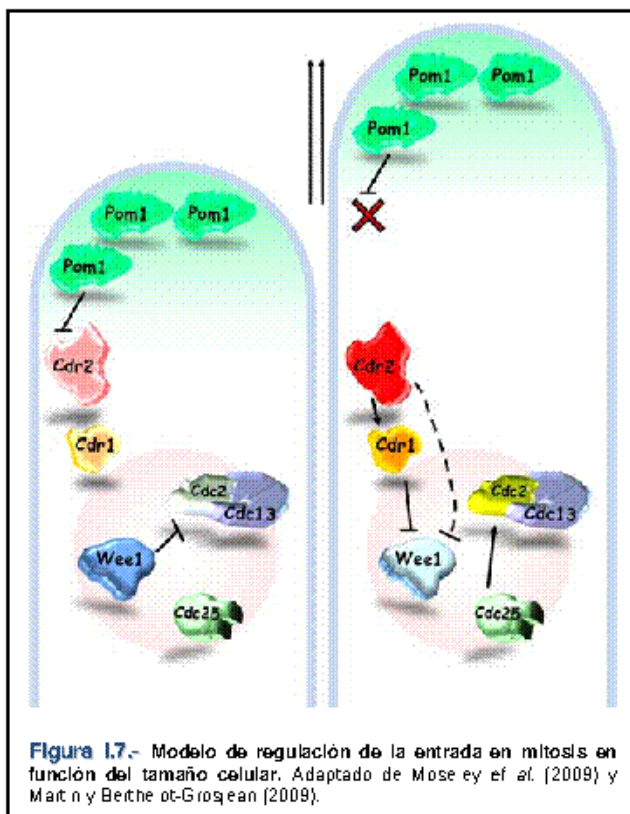


expresión comienza a incrementar durante la fase S y va acumulando fosforilaciones mientras progresa el ciclo (Shulewitz *et al.*, 1999; McMillan *et al.*, 1999; Sreenivasan y Kellogg, 1999). Estas especies hiperfosforiladas son susceptibles de ubiquitinación y subsecuente degradación por el proteosoma (Sia *et al.*, 1998; McMillan *et al.*, 2002).

Dada la importancia de regular la actividad de Wee1, cabe esperar que algunas de estas fosforilaciones sean activadoras, mientras otras inhiban su actividad (Figura 1.6). En cuanto a los activadores, estudios previos han demostrado que las quinasas implicadas en el *checkpoint* de daños en el ADN Cds1 y Chk1 son capaces de fosforilar y activar a Wee1. En respuesta a tratamientos con hidroxiurea y radiación ultravioleta, esta fosforilación produce un aumento de la actividad quinasa de Wee1 sobre Cdc2 induciendo un bloqueo del ciclo en G₂ y estableciendo así una relación entre el estado de la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular (Boddy *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 1997).

Por el contrario, los principales reguladores negativos de la actividad de Wee1 son las quinasas Cdr1/Nim1 y Cdr2. *cdr1⁺/nim1⁺* codifica una proteína de ~70 kDa cuyos niveles de expresión parecen no variar a lo largo del ciclo (Wu *et al.*, 1996), y que es capaz de fosforilar

directamente a Wee1, reduciendo su actividad *in vitro* (Russell y Nurse, 1987; Coleman *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1993; Wu y Russell, 1993). Asimismo, *cdr2⁺* codifica una proteína de ~86 kDa con un motivo quinasa de serina/treonina en su región N-terminal y relacionada con Cdr1/Nim1. Los análisis realizados *in vitro* confirman que Cdr2 es capaz de unirse y fosforilar a Wee1 en su extremo N-terminal (Kano y Russell, 1998; Breeding *et al.*, 1998). Recientemente se ha establecido un modelo de regulación de Wee1 mediada por Cdr1 y Cdr2 y en la que interviene la quinasa Pom1 para indicar a la célula el momento de iniciar la división (Moseley *et al.*, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean,



2009). Según este modelo, Cdr2 fosforila y activa a Cdr1, siendo ambas capaces de inhibir a Wee1 (Moseley *et al.*, 2009). El módulo Cdr2-Cdr1-Wee1 localiza en los nodos interfásicos - una región en el centro de la célula justo debajo de la membrana celular alrededor del núcleo -

y esta localización es dependiente de Cdr2 (Moseley *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados de estos trabajos (Moseley *et al.*, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009), Pom1 - una quinasa de la familia DYRK implicada en el crecimiento polarizado y posicionamiento del septo durante la citocinesis (Bähler y Pringle, 1998; Bähler y Nurse, 2001) - localiza en los polos de la célula y regularía la actividad de Cdr2 actuando como un inhibidor. De esta manera, en las células de pequeño tamaño, Pom1 inhibiría a Cdr2 (que a su vez actúa sobre Crd1), de modo que Wee1 puede llevar a cabo su acción sobre la Tyr¹⁵ de Cdc2, inhibiendo así al MPF y evitando la entrada en mitosis (Figura 1.7). Sin embargo, conforme la célula va creciendo, los polos quedan más alejados del centro celular, y por tanto del módulo Cdr2-Cdr1-Wee1 (Figura 1.7). En estas condiciones, Pom1 ya no es capaz de actuar sobre Cdr2, de modo que Wee1 es finalmente fosforilado, anulando así su actividad sobre el MPF (Moseley *et al.*, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009).

Los correspondientes ortólogos en *S. cerevisiae* de *cdr1⁺* (*HSL1*) y *cdr2⁺* (*GIN4* y *KCC4*) no parecen actuar directamente sobre SWE1/WEE1, sino intervenir en la adecuada localización de SWE1 durante el desarrollo de la yema y la formación del anillo de separación (Longtine *et al.*, 2000; Barral *et al.*, 1999; Shulewitz *et al.*, 1999). Sin embargo, sí se ha descrito que CDC5, el homólogo de Polo quinasa (Plo1 en *S. pombe*), y CLA4, implicado en la citocinesis y gemación, y homólogo de STE20 de *S. cerevisiae*, pueden fosforilar a SWE1 *in vitro* y comprometer su actividad (Sakchaisri *et al.*, 2004).

Un aspecto común entre los homólogos de WEE1 en diferentes organismos es la conservación en la proteína de dipéptidos de Ser-Pro y Thr-Pro, que constituyen la secuencia consenso mínima necesaria para la fosforilación por Cdk1/Cdc2 (Nigg, 1993). De hecho, la hiperfosforilación de Wee1 en *Xenopus* durante la mitosis es dependiente de la actividad de Cdc2, y se ha demostrado que este Cdc2 puede unirse a Wee1 *in vitro* (Mueller *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1993). Harvey *et al.* (2005) describieron en *S. cerevisiae* que el propio dímero CDK-Ciclina (CDC28-CLB2) es capaz de fosforilar a SWE1 y reducir su actividad, pero al mismo tiempo esta fosforilación es necesaria para la completa actividad de SWE1. Según su modelo, durante la fase G₂ tardía, se incrementan los niveles de SWE1, que se une al complejo de reciente formación CDC28/CLB2, fosforilando el uno al otro. La fosforilación del dímero sobre SWE1 la vuelve plenamente funcional, mientras que la acción de la quinasa sobre éste, bloquea la actividad de CDC28. Conforme avanza el ciclo celular, SWE1 va siendo fosforilada por otras quinanas, y cuando CDC28 es desfosforilado por la fosfatasa MIH1 (homólogo de Cdc25 de *S. pombe*), termina de hiperfosforilar a SWE1, inactivándola y permitiendo la entrada en mitosis. Sin embargo, la conservación de este modelo de regulación de SWE1/WEE1 no ha sido confirmada por el momento en otros organismos.

2.1.3.- Reguladores de la actividad de la fosfatasa Cdc25

Cdc25 es una proteína fosfatasa de ~66 kDa cuya actividad es esencial para la entrada en mitosis, actuando como un inductor de la división celular de manera dosis-dependiente y en sentido opuesto a Wee1 (Russell y Nurse, 1986). En *S. pombe*, Cdc25 es capaz de eliminar la fosforilación en Tyr¹⁵ de Cdc2 que bloquea su actividad por acción de la quinasa inhibidora Wee1 (Russell y Nurse, 1986; Millar *et al.*, 1991).

Igual que en el caso de Wee1, la regulación de la actividad de Cdc25 es compleja, y no están totalmente esclarecidos los mecanismos ni identificados todos los reguladores que participan el proceso (Figura 1.6). En mamíferos existen tres genes relacionados (*CDC25A*, *CDC25B* y *CDC25C*) que muestran funciones solapantes y algunas propias de cada isoforma (Donzelli y Draetta, 2003). Curiosamente, *CDC25A* es suficiente para llevar a cabo todas las transiciones a lo largo del ciclo, aunque la isoforma *CDC25B* es necesaria para las divisiones meióticas que ocurren en los ovocitos de ratón (Chen *et al.*, 2001; Lincoln *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2005). Asimismo, la sobreproducción de las versiones *CDC25A* y *CDC25B* parece estar relacionada con la proliferación de algunos tipos de células tumorales (Kristjánsdóttir y Rudolph, 2004).

De manera similar a Wee1, Cdc25 es una proteína que presenta en su secuencia múltiples regiones fosforilables que regulan su actividad. En mamíferos, la hiperfosforilación de *CDC25C* conduce a la activación de su actividad quinasa, mientras que sobre *CDC25A* estabiliza la proteína y evita su degradación por ubiquitinación. Por el contrario, tras la salida de la mitosis, la desfosforilación de la proteína devuelve la actividad inicial a la isoforma *CDC25C*, mientras que *CDC25A* es reconocida y degradada por el APC ("Anaphase-Promoting Complex").

En *S. pombe*, la única Cdc25 existente comparte propiedades con las tres isoformas presentes en células humanas. Como en el caso de Wee1, la fosforilación de Cdc25 en diferentes regiones de su extremo N-terminal puede regular positiva o negativamente su actividad. En *Xenopus*, la presencia de sitios consenso de fosforilación para Cdk1 en *CDC25* críticos para su hiperactivación en mitosis ha demostrado que el dímero Cdk1-Ciclina estimula *in vitro* la actividad de *CDC25C* de humanos (Izumi y Maller, 1993; Hoffmann *et al.*, 1993). En el caso de *S. pombe*, se ha observado que la fosforilación activadora de Cdc25 depende *in vivo* de la actividad de Cdc2 (Kovelman y Russell, 1996), confirmando los datos anteriores y estableciendo un mecanismo de retroalimentación positiva en la activación de Cdc2 para la entrada en mitosis.

Otro activador de la actividad fosfatasa de Cdc25 es la Polo quinasa, Plo1. El homólogo de *Xenopus* (PLX1) fue purificado de los extractos mitóticos unido a la región N-terminal de Cdc25 y se demostró que es capaz de estimular su actividad (Kumagai y Dunphy, 1996). Los mutantes afectados en la actividad de la Polo quinasa en *Drosophila* (Polo), *S. cerevisiae* (CDC5) y *S. pombe* (Plo1) manifiestan múltiples defectos durante la mitosis, pero no se produce un bloqueo del ciclo celular en G₂M, por lo que no parece esencial para la actividad de Cdc25 (revisión de Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

Durante la interfase y cuando se producen daños en el ADN o por estrés, la entrada al núcleo de Cdc25 se bloquea por su interacción con proteínas de la familia 14-3-3 (Takizawa y Morgan, 2000). Son proteínas de pequeño tamaño que reconocen determinadas regiones fosforiladas de Cdc25 resultantes de la actividad de proteínas quinasas del *checkpoint* y que conducen a un retraso en el progreso del ciclo celular por inhibición de Cdc25. En *S. pombe*, Cds1 y Chk1 son capaces de fosforilar a Cdc25 en la posición Ser⁹⁹, sitio reconocido por Rad24 (una proteína 14-3-3), inhibiendo así su actividad y separando a Cdc25 de su sustrato Cdc2 por exclusión del núcleo celular (Fumari *et al.*, 1999).

Recientemente se ha vinculado en mamíferos la respuesta a estrés señalizada por la MAP quinasa p38 con un *checkpoint* que retrasa la transición G₂M en respuesta a varios estímulos ambientales como radiación ultravioleta o estrés hiperosmótico (Bulavin *et al.*, 2001; Matsusaka y Pines, 2004; Mikhailov *et al.*, 2005), provocando la fosforilación de CDC25. Sin embargo, esta fosforilación no es llevada a cabo directamente por p38, sino por una MAPKAP tipo 2 (quinasa activada por MAP quinasas), que actúa directamente sobre CDC25 (Manke *et al.*, 2005). Apoyando estos datos, en respuesta a diversos tipos de estrés, la MAP quinasa Sty1 (homóloga a p38 en *S. pombe*) fosforila y activa a Srk1, una quinasa MAPKAP, que directamente fosforila e inhibe a Cdc25 en la misma posición que Chk1 y Cds1 (Smith *et al.*, 2002; Lopez-Avilés *et al.*, 2005).

Un elemento más descrito como inhibidor de la mitosis en *S. pombe* es la fosfatasa Clp1/Flp1, relacionada con las proteínas Cdc14. La inactivación de Clp1 produce una entrada prematura en mitosis, sin afectar a la fosforilación llevada a cabo por las quinasas del *checkpoint*. Sin embargo, sí que afecta a la fosforilación activadora de Cdc2 sobre Cdc25 (Wolfe y Gould, 2004). En *S. pombe*, al igual que ocurre en mamíferos con CDC25C y CDC25A, Cdc25 es desfosforilada al final de la mitosis y esto requiere de la actividad de Clp1. Esta desfosforilación podría tener dos funciones: 1) inactivar a la fosfatasa activada; y 2) evitar que Cdc25 sufra nuevas fosforilaciones activadoras que dificulten su exclusión del núcleo por bloqueo de la unión de proteínas 14-3-3. Esto es congruente con el hecho de Cdc25 no es

excluida del núcleo de manera adecuada en las células carentes de *clp1*⁺ durante el fin de la mitosis (Wolfe y Gould, 2004). Estudios posteriores han revelado que Cdc2 es capaz de fosforilar a Clp1 durante la entrada en mitosis e inactivarlo, permitiendo así que la actividad de Cdc25 sea máxima para inducir la división celular. Conforme avanza el proceso, Clp1 se auto-desfosforila, volviéndose nuevamente activo y desfosforilando a su sustrato Cdc25, reduciendo su actividad sobre Cdc2 (Wolfe *et al.*, 2006).

2.1.4.- Los checkpoints

Los denominados *checkpoints* o puntos de control son mecanismos encargados de vigilar la correcta progresión de las fases del ciclo celular (Weinert y Hartwell, 1988). Cuando estos *checkpoints* detectan anomalías, se inicia una señal que, por un lado, bloquea la progresión del ciclo celular, y por otro, inicia los sistemas necesarios para solventar el problema, asegurando así que la célula no avance en el ciclo hasta corregir los errores detectados. Los principales *checkpoints* pueden englobarse en dos grupos: SAC ("*Spindle Assembly Checkpoint*"), y de daños en el ADN.

2.1.4.1.- SAC ("*Spindle Assembly Checkpoint*")

Este punto de control ocurre durante la mitosis y parece detectar dos fenómenos: la falta de captura de algún cinetocoro por los microtúbulos del huso mitótico y la falta de tensión entre cromosomas en metafase (Kadura y Sazer, 2005). En cualquiera de estos casos, el SAC inhibe el APC, bloqueando la transición del ciclo celular y manteniendo a las células en metafase hasta que el error quede solventado (Kadura y Sazer, 2005).

Los componentes del SAC se localizan en los cinetocoros de los cromosomas. También participa la quinasa Aurora (Ark1), que localiza en los cinetocoros y juega un papel fundamental en la desestabilización de la unión entre los microtúbulos y los cinetocoros cuando los cromosomas no están correctamente orientados (Petersen y Hagan, 2003).

2.1.4.2.- *Los checkpoints de daño del ADN*

Se pueden clasificar en dos grupos:

- *Checkpoint de la fase G₂/M*: es el más estudiado. Entre los componentes más destacados encontramos dos complejos encargados de detectar el daño en la molécula de ADN, y que son necesarios para activar el *checkpoint*: el complejo Rad9-Rad1-Hus1 y el formado por Rad26 y Rad3 (O'Connell *et al.*, 2000). Ambos son reclutados en las zonas dañadas del ADN, siendo la quinasa Rad3 clave para iniciar su activación (Edwards *et al.*, 1999; Parrilla-Castellar *et al.*, 2004). La diana de Rad3 es la quinasa Chk1, que transmite la

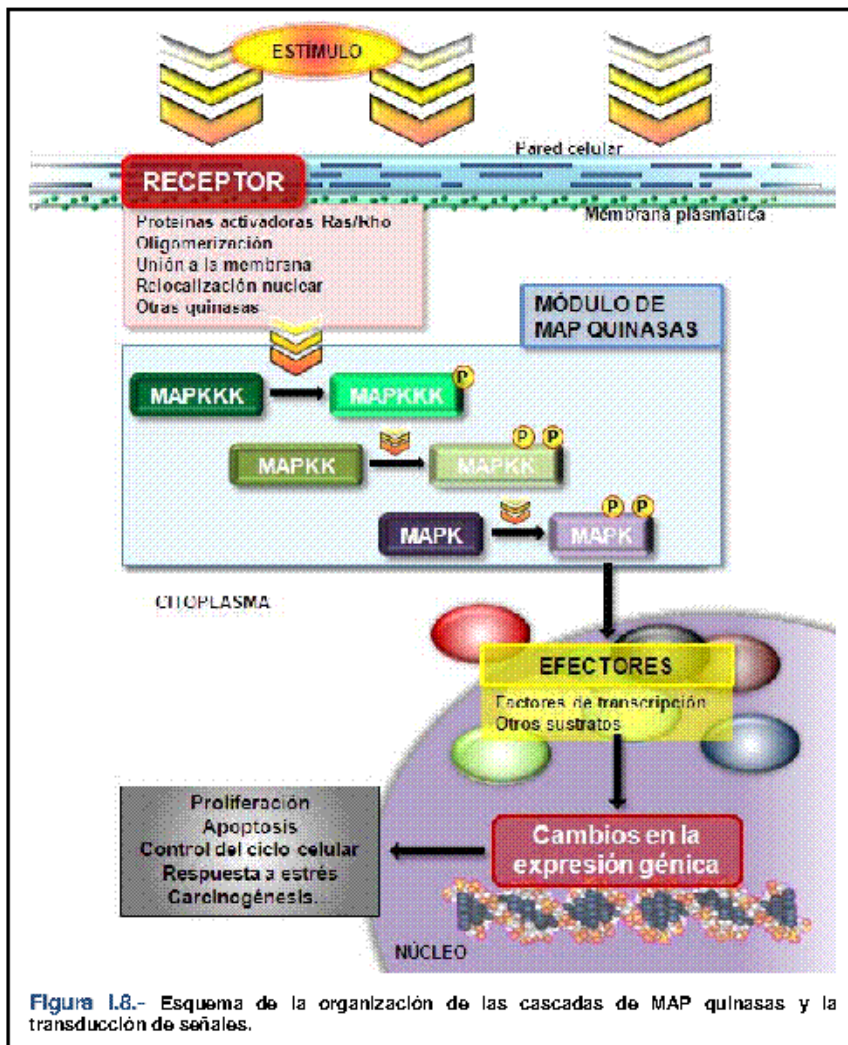
señal hasta la maquinaria del ciclo celular fosforilando a Cdc25 y Wee1 (Mochida *et al.*, 2004). La fosforilación de Cdc25 inhibe a la fosfatasa, provocando un retraso en la desfosforilación y activación de Cdc2, y en el inicio de la mitosis. La inhibición de Cdc25 parece estar mediada por Rad24 (proteína del tipo 14-3-3), que exporta a Cdc25 del núcleo en respuesta al daño en el ADN (López-Girona *et al.*, 1999) aunque el transporte no es un requisito esencial para producir el bloqueo (López-Girona *et al.*, 2001).

- *Checkpoint de la fase S/M*: bloquea la entrada en mitosis cuando se detectan daños en el ADN como roturas de la doble hélice en respuesta a otro tipo de situaciones que impidan la progresión de la replicación. Se produce un bloqueo de la actividad mediado por Cdc25 (Fumari *et al.*, 1997; López-Girona *et al.*, 1999 y 2001). Muchos de los elementos implicados en esta respuesta también lo están en el *checkpoint* de la fase G₂M, siendo de gran importancia la proteína Cds1, cuya actividad es exclusiva de la fase S y dependiente de Rad26 (Lindsay *et al.*, 1998; Rhind y Russell, 2000).

3.- LAS RUTAS DE MAP QUINASAS

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. Tales rutas se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, y transmiten señales extracelulares hasta el núcleo para inducir cambios significativos en los patrones de expresión génica, con el consecuente incremento en los niveles de distintos factores encargados de proteger a las células frente al agente estresante (Marshall, 1995).

El módulo clásico de MAPK consta de tres proteínas quinasas que se regulan por medio de una cascada de fosforilaciones secuenciales (ver esquema en la Figura I.8). En respuesta a un estímulo activador detectado por los sensores (receptores transmembranales acoplados a proteínas G, sistemas de regulación de dos componentes, proteínas integrales de membrana...), la primera quinasa del módulo, denominada MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), fosforila en residuos de serina o treonina del segundo componente del módulo, la MAPK quinasa (MAPKK). Las MAPKKs son quinasas que reconocen y fosforilan los residuos de treonina y tirosina en la secuencia T-X-Y (X= prolina, ácido glutámico o glicina) del motivo de activación de la MAP quinasa, que es el último componente del módulo. Una vez fosforiladas, las MAP quinasas fosforilan a distintos sustratos a nivel citoplasmático, como otras proteínas



quinazas, chaperonas, proteínas del citoesqueleto y se traslocan al núcleo, activando entonces a factores de transcripción específicos (Hill y Treisman, 1995; Treisman, 1996).

Cuando las células se adaptan a las nuevas condiciones ambientales, las cascadas de MAP quinazas deben ser desactivadas por reguladores negativos, que modulan la duración e intensidad de la señal transmitida (Karin y Hunter, 1995). Entre dichos reguladores negativos destacan las fosfatasas de MAP quinazas, que

controlan el nivel de activación, adaptación y recuperación de cada ruta, y que se agrupan en fosfatasas de especificidad dual, fosfatasas de tirosina, y fosfatasas de serina y treonina (Karin y Hunter, 1995).

3.1.- Conservación evolutiva de las rutas de MAP quinazas

En mamíferos se distinguen tres grupos fundamentales de MAP quinazas: ERK, p38 y JNK (Figura 1.9). Las familias ERK y p38 poseen homólogos en levaduras y presentan los motivos de fosforilación dual Thr-Glu-Tyr y Thr-Gly-Tyr, respectivamente. Las MAP quinazas del tipo JNK han sido descritas únicamente en mamíferos y se fosforilan en el motivo Thr-Pro-Tyr (Davis, 2000). En mamíferos dichas cascadas de MAP quinazas regulan multitud de procesos celulares como la diferenciación, movilidad, proliferación y apoptosis. ERK1 y ERK2 se han relacionado preferentemente con la regulación de la diferenciación y la proliferación

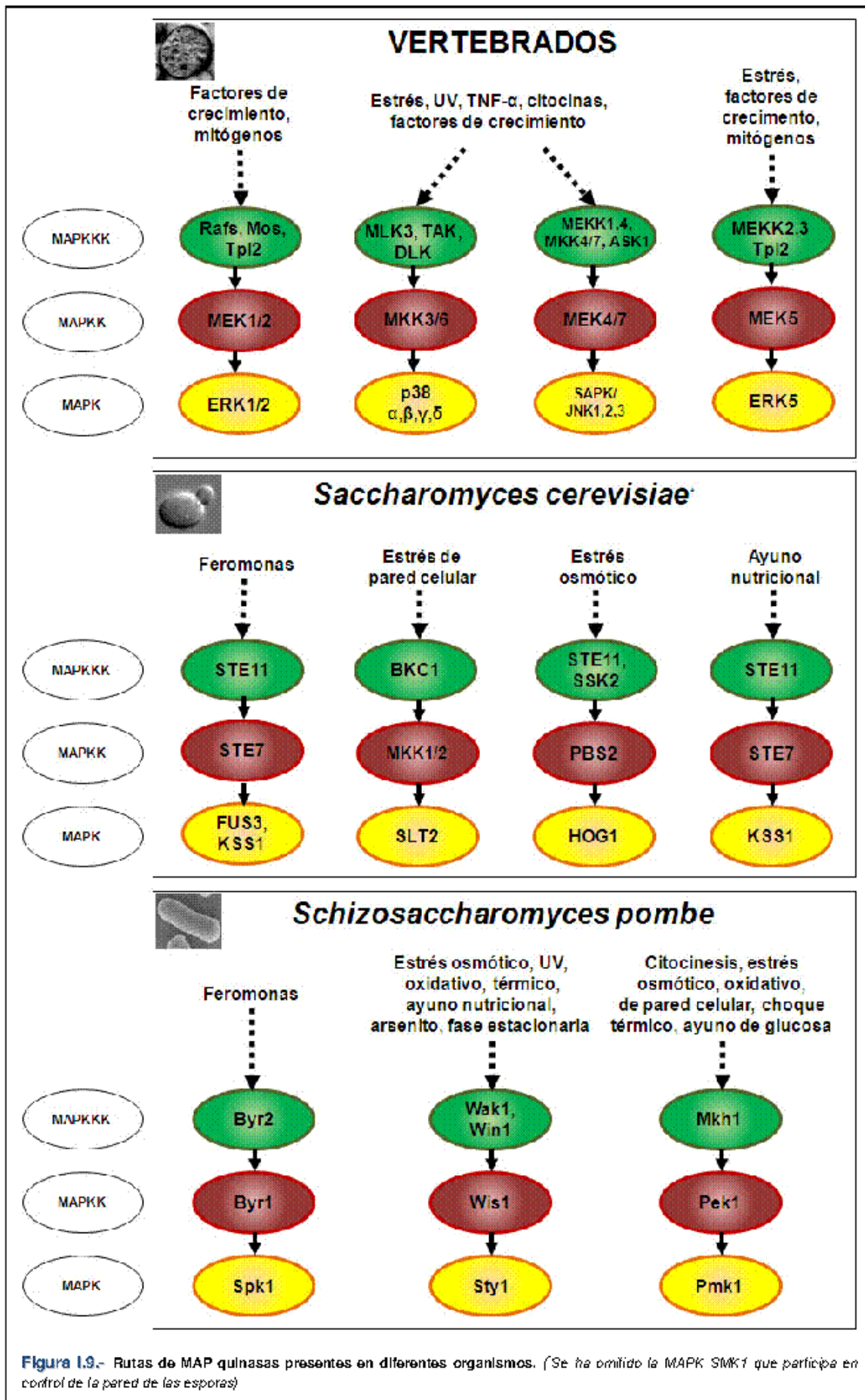


Figura 1.9.- Rutas de MAP quinasas presentes en diferentes organismos. (Se ha omitido la MAPK SMK1 que participa en control de la pared de las esporas)

celulares, mientras que JNK y p38 están implicadas en las respuestas celulares frente al estrés y la apoptosis (Schaeffer y Weber, 1999).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado cinco rutas de MAP quinasas. Las cuatro MAP quinasas presentes en células vegetativas, FUS3, KSS1, HOG1 y SLT2/MPK1, regulan la respuesta frente a feromonas y durante la conjugación (FUS3), la filamentación y la invasividad (KSS1), el crecimiento en condiciones de osmolaridad elevada (HOG1) y la integridad celular (SLT2/MPK1). En cuanto a SMK1, su función se ha relacionado con el control de la síntesis de la pared de las ascosporas (Figura I.9).

Por el contrario, *Schizosaccharomyces pombe* únicamente presenta tres rutas de MAP quinasas: la ruta de respuesta a estrés o SAPK, la ruta de integridad celular, y la ruta de respuesta a feromonas que regula el proceso de conjugación (Figura I.9).

Mientras que las rutas JNK y p38 de mamíferos son homólogas a las rutas SAPK de *S. pombe* y HOG de *S. cerevisiae*, la ruta de integridad celular de *S. pombe* presenta un alto grado de conservación con las quinasas ERK1/2 de mamíferos y la ruta SLT2/MPK1 de *S. cerevisiae*. Dada su relevancia en el presente trabajo, a continuación se detallan las principales características de las rutas SAPK y de integridad celular.

3.2.- La ruta de MAP quinasa de respuesta a estrés (SAPK, “*Stress Activated Protein Kinase*”)

La ruta SAPK es la vía principal de señalización por MAP quinasas presente en *S. pombe*. Los mutantes carentes de alguno de sus principales componentes muestran una morfología alargada, baja viabilidad tras la entrada en fase estacionaria, ausencia de crecimiento en condiciones hiperosmóticas, sensibilidad a estrés causado por metales pesados, al choque térmico y al frío, entre otros agentes (Warbrick y Fantès, 1991; Shiozaki y Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2002). Además, dichos mutantes presentan defectos en la iniciación de la meiosis tras el ayuno de nitrógeno, y no reinician de forma apropiada el ciclo celular después de un estrés (Shiozaki y Russell, 1995 y 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). La existencia de todos estos defectos indica sin lugar a dudas que esta ruta juega un papel crítico en la respuesta general de *S. pombe* frente a múltiples estímulos externos. Los componentes principales de dicha ruta se describen a continuación y se muestran en la Figura I.10.

3.2.1.- Sensores

A pesar del descubrimiento de la ruta SAPK hace más de una década, poco se conoce sobre la detección específica de los diferentes tipos de estrés y cómo se transmiten hacia la cascada de MAP quinasas. Sólo en el caso del estrés oxidativo inducido por H₂O₂ se ha descrito la participación de una variante del sistema de dos componentes bacteriano compuesto por **Mak2**, **Mak3** y **Mpr1/Spy1** (Nguyen *et al.*, 2000; Aoyama *et al.*, 2001). En respuesta al peróxido de hidrógeno, Mak2 y Mak3 (dos histidín-quinatas citoplasmáticas) se autofosforilan en un residuo conservado de histidina presente en su extremo catalítico C-terminal. Seguidamente, Mpr1/Spy1 transfiere este fosfato a un residuo de Aspártico (Asp⁴¹²) presente en el regulador de respuesta Mcs4 (ver a continuación), que inicia la activación del módulo de MAP quinasas.

Recientemente se ha descrito que **Tdh1**, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, participa en la señalización del estrés oxidativo por H₂O₂. En presencia de este compuesto, la oxidación de cisteína-152 de Tdh1 es esencial para la asociación *in vivo* de Mpr1/Spy1 con Mcs4, regulando la activación de la MAP quinasa Sty1 (Morigasaki *et al.*, 2008).

3.2.2.- Reguladores de respuesta

Mcs4 es un regulador de respuesta funcional y estructuralmente relacionado con SSK1p de *S. cerevisiae*. Las células que carecen de Mcs4 son viables, aunque sensibles frente a diversos tipos de estrés (Shieh *et al.*, 1997; Buck *et al.*, 2001). Además, presentan morfología alargada debido a un retraso en la finalización de la fase G₂/M del ciclo celular y son parcialmente estériles, aunque este defecto no es tan acusado como el que se observa en ausencia de Sty1 o Atf1 (Cottarel, 1997; Shieh *et al.*, 1998). Mcs4 interacciona físicamente con Mpr1/Spy1, Tdh y Wak1 y Win1, dos MAPKKK de la ruta SAPK (ver más adelante). Aunque por el momento el mecanismo por el cual Mcs4 activa a Wak1 y/o Win1 es desconocido, su presencia es necesaria para una correcta activación de la MAP quinasa Sty1 en respuesta todos los tipos de estrés conocidos (Shieh *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 2002). Sin embargo, la fosforilación del residuo de Asp⁴¹² descrita anteriormente sólo es crítica para la activación de Sty1 en respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂.

3.2.3.- Componentes del módulo de MAP quinasas

a) *MAPKKK*

El módulo de MAP quinasas de la ruta SAPK posee dos MAPKKK: **Wak1/Wis4/Wik1** (Samejima *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997) y **Win1** (Shiozaki y Russell, 1997; Samejima *et al.*, 1998). Ambas son capaces de fosforilar y activar a la MAPKK **Wis1** (Warbrick y Fantes, 1991) (Figura I.11). Aunque su presencia es necesaria para alcanzar la máxima activación de la ruta en respuesta a H₂O₂, Wak1 y Win1 pueden sustituirse mutuamente en la activación de Sty1 a bajos niveles de este agente oxidante (Quinn *et al.*, 2002). Sin embargo, Wak1 es la principal responsable de la activación de la ruta durante el estrés osmótico y en respuesta a bajas temperaturas (Soto *et al.*, 2002; Shiozaki *et al.*, 1998).

b) *MAPKK*

En respuesta a estrés, la MAPKK **Wis1** es fosforilada de manera dual en los residuos de Ser⁴⁶⁹ y Thr⁴⁷³ de su extremo C-terminal por las MAPKKK Wak1 y Win1 (Shieh *et al.*, 1998; Samejima *et al.*, 1998; Shiozaki *et al.*, 1998). Con la excepción del estrés térmico y el tratamiento con arsénico (Nguyen y Shiozaki, 1999; Rodríguez-Gabriel, 2005), todos los estímulos ambientales conocidos capaces de activar a Sty1 son transmitidos a Wis1 por medio de las MAPKKK Wak1 y Win1 (Shiozaki *et al.*, 1998).

c) *MAPK*

El elemento central de la ruta SAPK es la MAP quinasa **Sty1/Spc1/Phh1** (Shiozaki y Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995, Kato *et al.*, 1996). Sty1 es un miembro de la familia de MAP quinasas activadas por estrés (Familia SAPK), que incluye también a HOG1 de *S. cerevisiae* y a las SAPKs de células eucariotas superiores p38 y JNK. *S. pombe* integra la respuesta frente a múltiples condiciones de estrés por medio de la activación de Sty1, un rasgo que comparte con células eucariotas superiores, que activan las SAPKs p38 y JNK en condiciones similares (Tibbles y Woodgett, 1999). Sin embargo, esta característica la distingue claramente del modelo de *S. cerevisiae*, donde HOG1 es activable fundamentalmente en respuesta a cambios en la osmolaridad (Schüller *et al.*, 1994), aunque también se le ha asignado un papel a esta ruta en la respuesta frente al estrés oxidativo (Bilsland *et al.*, 2004).

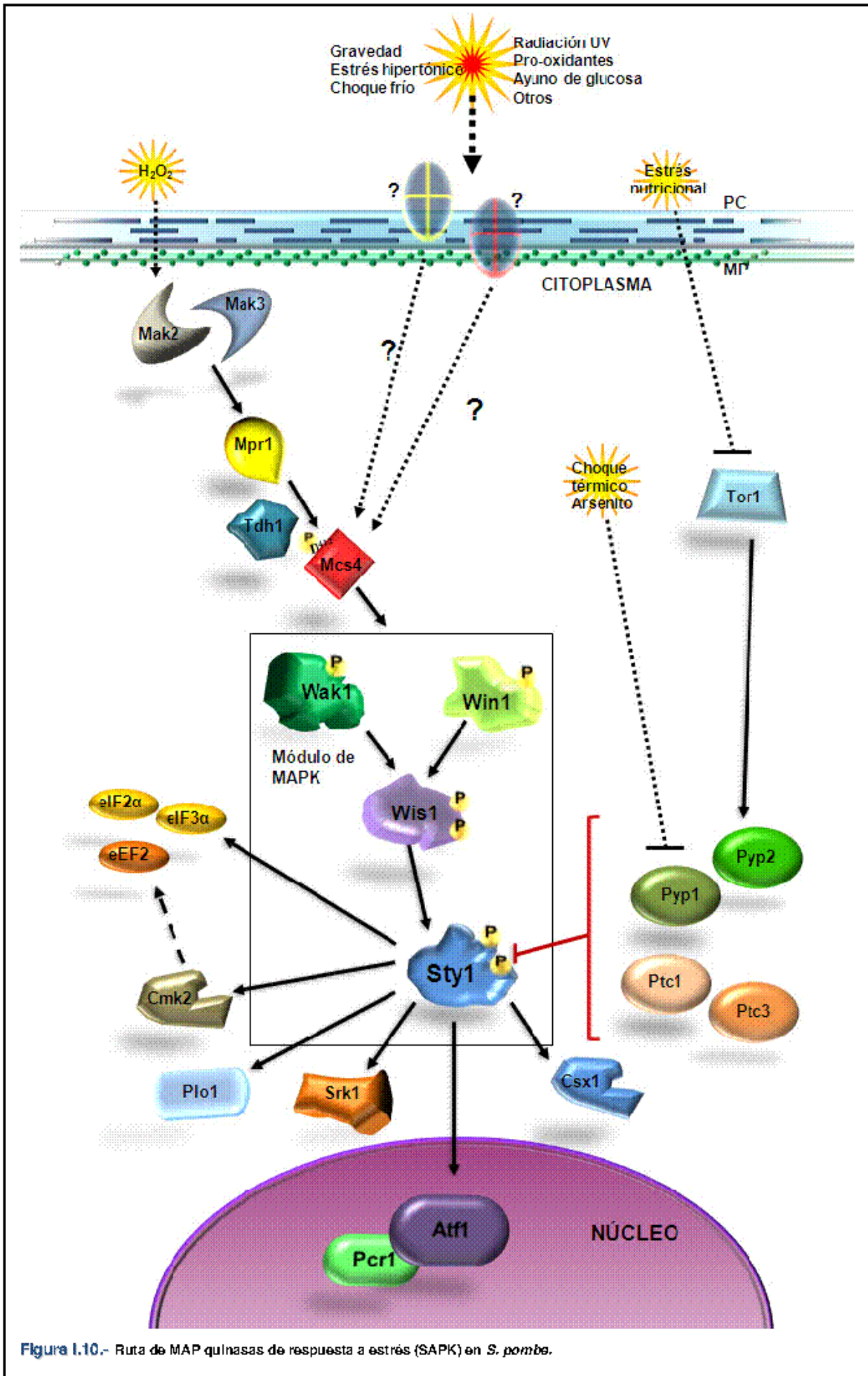


Figura 1.10.- Ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*.

En respuesta a estrés, la forma fosforilada de Wis1 se asocia y fosforila a Sty1 en sendos residuos de treonina (Thr¹⁷¹) y tirosina (Tyr¹⁷³) del motivo conservado TGY (treonina-glicina-tirosina) en respuesta a estrés osmótico salino y no salino, arsenito, choque térmico, H₂O₂, estrés por bajas temperaturas, pro-oxidantes, limitación de glucosa y ayuno de nitrógeno (Shiozaki y Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2002; George *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2002; Rodríguez-Gabriel y Russell, 2005; Shiozaki y Russell, 1996; Degols *et al.*, 1996; Degols y Russell, 1997; Soto *et al.*, 2007), provocando su translocación al núcleo, donde fosforila a distintos efectores (Gaits *et al.*, 1998).

3.2.4.- Efectores de Sty1

a) Factores de transcripción: Atf1 y Pcr1

Atf1 (homólogo al factor transcripcional ATF-2 de células superiores) es una proteína con un dominio bZIP que se une a motivos CRE ("cAMP-Response Element") presentes en los promotores de la mayoría de los genes cuya expresión depende de este factor. De manera similar a los mutantes carentes de *sty1*⁺, el mutante Δ *atf1* presenta una diferenciación sexual defectiva, y es especialmente sensible frente a los estreses oxidativo y osmótico. Sin embargo, no muestra anomalías en el desarrollo del ciclo celular, lo que sugiere que en *S. pombe* Atf1 está implicado en la respuesta general frente al estrés.

Atf1 se asocia *in vivo* con Sty1 y es fosforilado por la MAP quinasa en respuesta a múltiples estreses (Shiozaki y Russell, 1996). El modelo aceptado actualmente propone que, una vez que Sty1 es fosforilado por Wis1, se produce su translocación al núcleo donde se asocia y fosforila a Atf1. Es entonces cuando Atf1, formando heterodímeros con otro factor transcripcional denominado **Pcr1**, induce la expresión de genes cuyos productos se encuentran implicados en la respuesta adaptativa de *S. pombe* frente a diferentes tipos de estrés y en la regulación de la entrada en meiosis y que constituyen el "CESR" (acrónimo derivado del inglés: *core environmental stress response genes*). Así, genes como *gpd1*⁺ (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *ctf1*⁺ (catalasa) y *ntp1*⁺ (trehalasa neutra) son inducidos vía Atf1/Pcr1 en condiciones de estrés osmótico y estrés oxidativo de dosis alta, entre otros (Wilkinson *et al.*, 1996; Paredes *et al.*, 2003, 2004). Otros genes regulados por Atf1 son *pyp2*⁺ y el propio *atf1*⁺, que estimula su propia expresión en respuesta a estrés. La expresión de *ste11*⁺ (inductor del ciclo sexual de *S. pombe*) y *fbp1*⁺ (fructosa-1,6-bisfosfatasa), también está modulada por el complejo Atf1/Pcr1. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que la presencia de Pcr1 como parte del heterodímero no es necesaria para la expresión de la mayoría de genes dependientes de Atf1 en respuesta a estrés (Sansó *et al.*, 2008; Lawrence *et al.*, 2007). Por otra parte, aunque parece claro que el dominio bZIP

presente en Atf1 se une específicamente a motivos CRE (secuencia consenso TGACGT(C/A)A) presentes en los promotores de la mayoría de los genes dependientes de Sty1-Atf1, en los últimos años ha existido cierta controversia sobre la dinámica del proceso. Recientemente, Lawrence *et al.* (2006) han mostrado que una versión mutante de Atf1 carente de los 11 sitios de fosforilación por Sty1 seguía siendo activa a nivel transcripcional en respuesta a estrés. Según estos autores, la fosforilación de Atf1 mediada por Sty1 tendría como objeto favorecer la estabilidad del factor transcripcional e incrementar su vida media, siendo ésta mucho mayor que en la versión de Atf1 no fosforilable (Lawrence *et al.*, 2007). Reiter *et al.* (2008) han demostrado mediante el empleo de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), que Sty1 se asocia con los promotores y las ORFs de los genes cuya expresión es dependiente de Atf1. Para que dicha asociación tenga lugar es necesario que Sty1 se encuentre en su forma activa y la presencia del heterodímero Atf1 unido a dichos promotores (Reiter *et al.*, 2008).

b) Proteínas de unión a ARN: Csx1, Cip1 y Cip2

Csx1 es una proteína de unión a ARN que estabiliza los ARN mensajeros de *aff1*⁺ y *pcr1*⁺ en respuesta a estrés oxidativo, modulando así la expresión de genes dependientes de Sty1 y Atf1 en estas condiciones. Sin embargo, aunque Sty1 en su forma activa se une y fosforila a Csx1, dicha fosforilación no parece ser esencial para su función biológica (Rodríguez-Gabriel *et al.*, 2003).

Cip1 y **Cip2** son dos proteínas de unión a ARN que co-purifican con Csx1 y que parecen mostrar actividades opuestas a dicha proteína, ya que la sensibilidad a estrés oxidativo y la incapacidad para inducir los genes dependientes de Atf1 que provoca la falta de Csx1, se rescata parcialmente tras la delección simultánea de *cip1*⁺ y/o *cip2*⁺ (Martin *et al.*, 2006).

c) Proteínas quinasas activadas por Sty1 (MAPKAP): Cmk2, Srk1 y Plo1

Cmk2 es una proteína quinasa tipo II dependiente de calcio/calmodulina y ortóloga a RCK2 de *S. cerevisiae*. Cmk2 es fosforilada *in vivo* por Sty1 en presencia de H₂O₂, y los mutantes carentes de *cmk2*⁺ son especialmente sensibles al estrés oxidativo. Todo ello sugiere que Cmk2 juega un papel importante en la respuesta celular frente a este tipo de estrés, aunque hasta el momento su función específica no ha sido dilucidada (Sanchez-Piris *et al.*, 2002).

Sty1 juega un papel primordial en la regulación de la progresión del ciclo celular por medio de las quinasas **Srk1** y **Plo1**. El gen *srk1*⁺ es inducido de manera dependiente de Sty1

en respuesta a estrés osmótico, térmico y oxidativo (Smith *et al.*, 2002), y Sty1 se asocia *in vivo* con Srk1 durante el crecimiento vegetativo (López-Avilés *et al.*, 2008). La activación por estrés de Sty1 provoca la fosforilación directa de Srk1, que entra en el núcleo y bloquea el inicio de la mitosis al fosforilar e inactivar a la fosfatasa Cdc25. Tras dissociarse de Sty1, Srk1 es rápidamente degradada por el proteosoma (López-Avilés *et al.*, 2005, 2008; Smith *et al.*, 2002).

En respuesta a estrés por choque térmico o centrifugación la forma activa de Sty1 fosforila a la Polo quinasa Plo1 en el residuo de Ser⁴⁰². Dicha fosforilación promueve el reclutamiento de Plo1 en los cuerpos polares del huso (SPBs, "*Spindle Pole Bodies*"), donde regula la actividad de Cdc2 por medio de Cdc25 y Wee1 (Petersen y Hagan, 2005).

d) Factores reguladores de la traducción

En los organismos eucariotas la actividad del factor de inicio de la traducción eIF2 α es fundamental para la regulación de la síntesis proteica en respuesta a estrés. En dichas condiciones las quinasas Gcn2, Hri1 y Hri2 fosforilan a eIF2 α , que a su vez bloquea la traducción, lo que permite a la célula conservar recursos e iniciar la reconfiguración de la síntesis proteica para responder adecuadamente al estrés. La delección de *sty1*⁺ o de cualquiera de los componentes de la ruta SAPK provoca un incremento en la fosforilación de eIF2 α , lo que sugiere que Sty1 regula positivamente la traducción al reducir el estado de fosforilación de dicho factor (Dunand-Sauthier *et al.*, 2005; Berlanga *et al.*, 2010).

Trabajos recientes han demostrado que Sty1 regula negativamente la actividad de las quinasas Gcn2 y Hri2 en respuesta a estrés oxidativo (Berlanga *et al.*, 2010). Además, es capaz de asociarse *in vivo* al factor de elongación eEF2 y al factor de inicio de la traducción eIF3a, que reducen sus niveles y su estado de fosforilación en ausencia de dicha MAPK (Asp *et al.*, 2008).

3.2.5.- Regulación negativa de Sty1 por fosfatasas

La activación constitutiva de Sty1 es letal (Millar *et al.*, 1995), lo que sugiere que la regulación de la magnitud y duración de la activación de dicha MAP quinasa es crucial para garantizar una respuesta adecuada frente los estímulos externos. Por tanto, es fundamental la existencia de reguladores capaces de modular negativamente la actividad de la ruta. Las proteínas fosfatasas son sin lugar a dudas los principales reguladores negativos de las cascadas de MAP quinasas. En eucariotas se han descrito tres tipos de fosfatasas capaces realizar esta función: fosfatasas de tirosina (PTPs), fosfatasas de serina y treonina (PP2C) y fosfatasas de especificidad dual (DSPs) (Farooq y Zhou, 2004).

En *S. pombe*, las fosfatasa de tirosina **Pyp1** y **Pyp2** son capaces de desfosforilar a Sty1 en el residuo de Tyr¹⁷³ *in vivo* (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki y Russell, 1995). De las cuatro PP2C presentes en *S. pombe*, sólo **Ptc1** y **Ptc3** participan en la inactivación de Sty1, desfosforilando el residuo de Thr¹⁷¹ de la MAP quinasa tanto *in vivo* como *in vitro* (Nguyen y Shiozaki, 1999).

Pyp1 es la principal fosfatasa encargada de inactivar a Sty1 en células en crecimiento, mientras que tanto Pyp1 como Pyp2 ejercen esta función en respuesta a estrés. Estudios previos han demostrado que la expresión basal del gen *pyp1*⁺ así como la inducción por estrés de *pyp1*⁺, *pyp2*⁺ y *ptc1*⁺, está controlada por la ruta Sty1-Atf1, estableciéndose de esta manera un mecanismo de retroalimentación negativa (Degols *et al.*, 1996; Shiozaki y Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Gaits *et al.*, 1997) (Figura I.11).

Además, las fosfatasa pueden actuar a modo de "sensores" frente al estrés por choque térmico. Según los resultados de Nguyen *et al.* (1999), el estrés por choque térmico inhibe temporalmente la unión de Pyp1 a Sty1, lo que provoca un incremento del estado de fosforilación de la MAP quinasa. Posteriormente la acción de Ptc1 y Ptc3 recuperan el nivel basal de actividad de Sty1 (Nguyen *et al.*, 1999).

3.3.- La ruta de MAP quinasas de integridad celular

La función de la ruta de integridad celular es fundamental para la regulación de la construcción de la pared celular, la citocinesis, la morfogénesis, la fusión de vacuolas durante el estrés hipotónico y la homeostasis iónica (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000). La ausencia del elemento central de esta ruta, la MAP quinasa **Pmk1/Spm1** provoca sensibilidad osmótica en presencia de elevadas concentraciones de potasio, cambios evidentes en la morfología celular, multiseptación (especialmente en situaciones de estrés térmico u osmótico), e hipersensibilidad a β -glucanasas (Toda *et al.*, 1996; Sengar *et al.*, 1997; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000). Los componentes fundamentales de dicha ruta se muestran en la Figura I.11 y se describen a continuación.

3.3.1.- Elementos que actúan por encima del módulo de MAP quinasas de integridad celular

En *S. cerevisiae*, los receptores de la ruta de integridad celular son proteínas transmembranales codificadas por los genes *MTL1*, *MID2* y *WSC1-4*, y actúan esencialmente

como sensores que detectan cambios en la pared celular provocados por diferentes tipos de estrés, y que transmiten el estímulo activador hacia el resto de los componentes de la ruta de integridad celular (Vema *et al.*, 1997; Rajavel *et al.*, 1999). El estímulo se transmite desde los sensores a ROM2, un GEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) que activa a RHO1, y este a su vez al ortólogo de la proteína quinasa C PCK1, activando finalmente la cascada de MAP quinasas (Levin, 2005).

Por el contrario, se desconoce actualmente la identidad de los posibles sensores implicados en la detección y activación de la ruta de integridad celular de *S. pombe*. Sin embargo, estudios recientes han arrojado alguna luz sobre la identidad de los elementos implicados en la transmisión de la señal hasta el módulo de MAP quinasas:

a) **Cpp1**: se trata de una farnesil transferasa (FTasa) fuertemente conservada evolutivamente, y que juega un papel crítico en *S. pombe* durante la diferenciación sexual, la morfogénesis y la progresión del ciclo celular (Yang *et al.*, 2000 y 2001). Ma *et al.* (2006) han demostrado que Cpp1 farnesila *in vivo* a la GTPasa Rho2, permitiendo su anclaje en la membrana plasmática y la correcta activación de la ruta de integridad celular (ver a continuación).

b) **Rho2**: es una de las seis GTPasas de tipo Rho presentes en *S. pombe*, y junto con Rho1 participa en la morfogénesis, el mantenimiento de la integridad celular y la polarización del citoesqueleto en esta levadura, presentando ambas proteínas funciones parcialmente solapadas (Arellano *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997). Estudios previos demostraron que los mutantes de *S. pombe* carentes de calcineurina (Ppb1), o cuya actividad ha sido bloqueada en presencia del inmunosupresor FK506 (análogo de la ciclosporina), son hipersensibles al ión cloruro, y que la interrupción de los componentes de la ruta de integridad celular revertía este fenotipo. Basándose en esta interacción genética, Ma *et al.* (2006) investigaron nuevos componentes de la ruta de integridad celular mediante el aislamiento de mutantes "vic" (viables en presencia de ión cloruro y FK506) e identificaron a la pequeña GTPasa Rho2, que actúa aguas arriba del ortólogo de la proteína quinasa C Pck2 (ver a continuación), como responsable de la activación del módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 (Figura I.11). De hecho, el defecto de farnesilación de Rho2 del mutante $\Delta cpp1$ provoca el fenotipo "vic" típico de los mutantes con una actividad reducida de la ruta de integridad.

Recientemente se ha descrito también que las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) Rga2, Rga4 y Rga7, modulan negativamente la actividad de Pmk1 al actuar como reguladores negativos de la actividad GTPasa de Rho2 (Villar-Tajadura *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2010).

c) **Pck2**: es uno de los dos ortólogos a PKC de mamíferos presentes en *S. pombe* (Toda *et al.*, 1993). Junto con Rho2, fue identificado como un componente de la ruta de integridad, ya que

los mutantes carentes de *pck2*⁺ manifiestan fenotipo "vic" (Ma *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2008). Distintas evidencias han confirmado el modelo mediante el cual Rho2 actúa aguas arriba de Pck2, que a su vez interacciona y activa a Mkh1, la MAPKKK del módulo (Figura I.11), en respuesta a distintos estreses (Ma *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2008).

3.3.2.- El módulo de MAP quinasas de la ruta de integridad celular

a) MAPKKK

A diferencia de la ruta SAPK de *S. pombe*, la ruta de integridad celular posee una única MAPKKK, **Mkh1** (Sengar *et al.*, 1997), responsable de la transmisión de la señal de activación al resto de componentes del módulo al interaccionar *in vivo* con la MAPKK Pek1 y la MAPK Pmk1, formando un complejo ternario (Loewith *et al.*, 2000). El mutante deleciónado en *mkh1*⁺ manifiesta los mismos fenotipos que los mutantes carentes de Pek1 o Pmk1 (Sengar *et al.*, 1997; Madrid *et al.*, 2006).

b) MAPKK

En respuesta a un estímulo activador de la ruta, la MAPKK **Pek1** es fosforilada y activada por Mkh1 (Sugiura *et al.*, 1999). Curiosamente, en ausencia de estímulos externos, la forma no fosforilada de Pek1 actúa inhibiendo la señalización hacia la MAP quinasa Pmk1, permitiendo que los estímulos celulares que transcurren a través de esta ruta se transformen en respuestas del tipo todo o nada (Sugiura *et al.*, 1999).

c) MAPK

La MAP quinasa **Pmk1/Spm1** constituye el elemento central de la ruta de integridad celular (Toda *et al.*, 1996; Sengar *et al.*, 1997; Figura I.11). Pmk1 es activada por la MAPKK Pek1 por fosforilación en dos residuos conservados de treonina y tirosina en las posiciones 186 y 188, respectivamente, del motivo de activación -TEY- (Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000). Pmk1 es ortóloga a las MAPK ERK1 y ERK2 humanas que constituyen la cascada clásica de quinasas activadas por mitógenos, y que se activan preferentemente en respuesta a factores de crecimiento, ésteres de forbol, y en menor medida por estrés osmótico o citoquinas (Schaeffer y Weber, 1999).

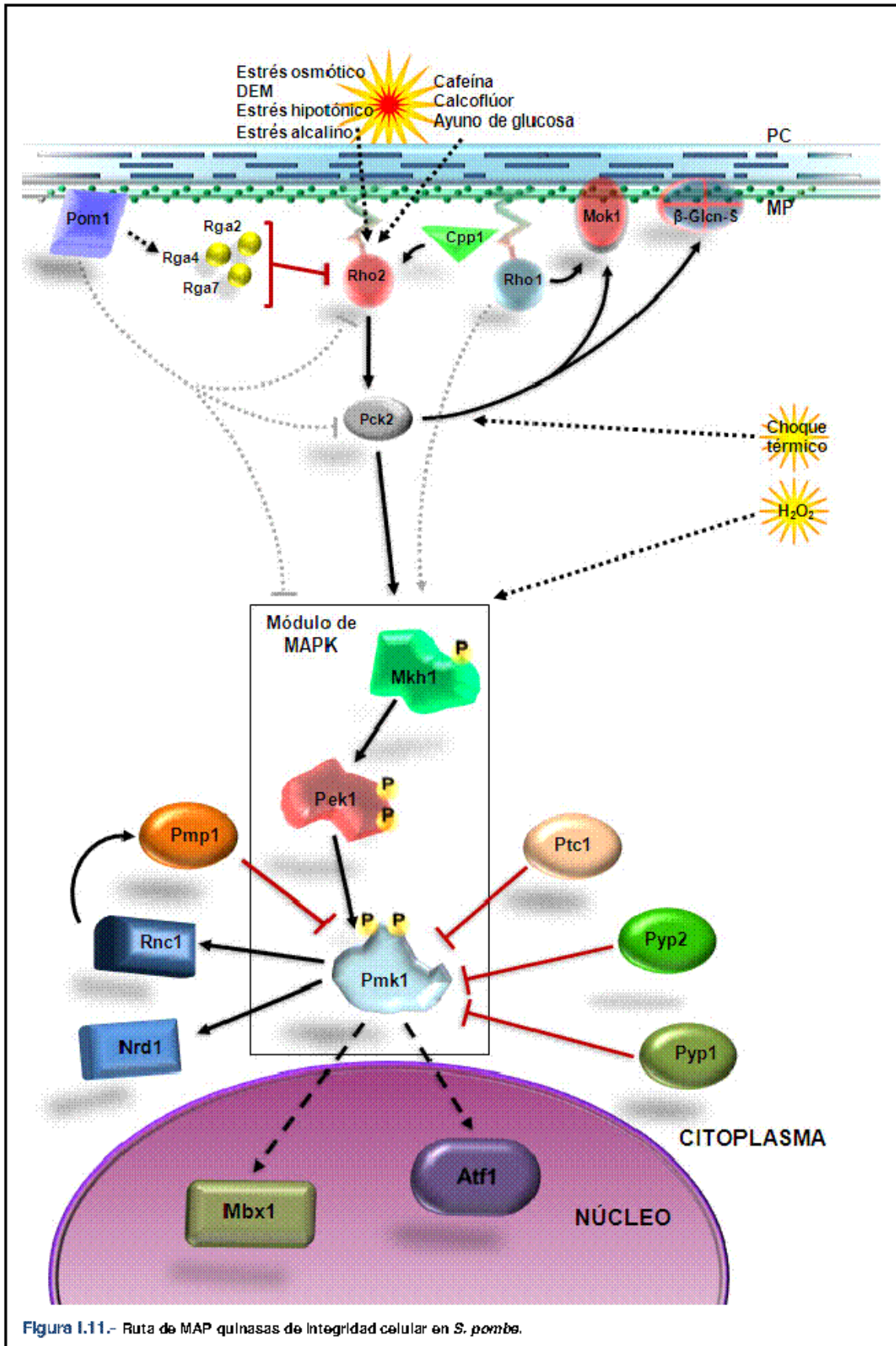


Figura I.11.- Ruta de MAP quinasas de Integridad celular en *S. pombe*.

Aunque originalmente 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-osmótico e hipo-osmótico, el ayuno de glucosa, el daño a la pared celular inducido con caspofungina (una equinocandina que inhibe la actividad de las beta-glucan sintetas de la pared celular), y el estrés oxidativo mediado por hidroperóxidos o agentes pro-oxidantes (Madrid *et al.*, 2006). Los mutantes de *S. pombe* carentes de Pmk1 son sensibles a la mayoría de los tipos de estrés que inducen su activación, por lo que la función de la MAPK es necesaria para una apropiada adaptación y supervivencia celular frente a tales condiciones. La activación de Pmk1 en respuesta a todos los estreses descritos es totalmente dependiente de la presencia de Mkh1 y Pek1, lo que sugiere que la cascada de MAPK no posee componentes adicionales o redundantes (Madrid *et al.*, 2006).

Un descubrimiento de gran interés aportado por nuestro grupo es que no todos los elementos descritos por encima del módulo de MAP quinasa participan en la transmisión de todos los tipos de estrés activadores de la ruta (Barba *et al.*, 2008). Así, hemos encontrado que la activación de Pmk1 inducida por estrés hipo- o hipertónico depende totalmente de la señalización mediada por Rho2-Pck2, mientras que la activación durante la separación celular o el tratamiento con peróxido de hidrógeno es completamente independiente de ambas proteínas (Figura I.11). Otros estreses, como el ayuno de glucosa o el daño de la pared celular se canalizan tanto a través de Pck2 como por medio de rutas alternativas (Figuras I.11). Estos resultados sugieren la existencia de diversas rutas que regulan la actividad basal y la activación de Pmk1 en respuesta a estrés, y que actúan de manera independiente del control de Rho2 y/o Pck2 según la naturaleza del estímulo activador (Barba *et al.*, 2008).

Nuestro grupo también ha estudiado la localización subcelular de los componentes de la ruta de integridad celular mediante microscopia de fluorescencia. Así, Mkh1 y Pek1 son proteínas citoplasmáticas, aunque también se presentan en el septo de división. Pmk1, la MAPK, está localizada en el núcleo y citoplasma, así como en el huso mitótico, el corpúsculo polar del huso (SPB) y el septo durante la división celular (Madrid *et al.*, 2006). Contrariamente al modelo descrito para ERK1/2 en mamíferos, la localización de Pmk1 no se ve afectada significativamente por su estado de activación ni en respuesta a estrés, lo que sugiere que tanto la forma activa como inactiva de la MAPK son capaces de entrar en el núcleo (Madrid *et al.*, 2006).

3.3.3.- Efectores de Pmk1

Entre las escasas dianas celulares conocidas de Pmk1 se encuentran Rnc1 y Nrd1, dos proteínas de unión a ARNm (Figura 1.11). **Rnc1**, una vez fosforilada por Pmk1, se une y estabiliza el ARN mensajero de Pmp1, una fosfatasa de especificidad dual que desfosforila la forma activada de Pmk1 (Sugiura *et al.*, 1998 y 2003). La forma activa de Pmk1 también se une y fosforila a **Nrd1**, que a su vez estabiliza el ARNm del gen *cdc4⁺* (cadena ligera de la miosina II) que participa en la regulación de la separación celular en *S. pombe* (Sato *et al.*, 2009).

Recientemente se ha propuesto que, bajo determinadas condiciones, la MAP quinasa Pmk1 es capaz de fosforilar y activar a **Atf1** (Takada *et al.*, 2007), el factor transcripcional clave en la respuesta a estrés de *S. pombe* cuya actividad es regulada por la ruta SAPK (ver Apartado 3.2.4.- Efectores). En este contexto, se ha demostrado también que el gen *ecm33⁺*, que codifica una proteína de la pared celular con motivo GPI (glicosil-fosfatidil-inositol), es activado transcripcionalmente por **Mbx1** (un factor de transcripción que en el mismo trabajo es vinculado a la ruta de integridad celular) y Atf1 coincidiendo con la activación de Pmk1 (Takada *et al.*, 2010). Sin embargo, el papel de Atf1 como diana de Pmk1 en la regulación transcripcional frente a distintas situaciones de estrés está por determinar apropiadamente.

3.3.4.- Regulación negativa

Al igual que en el caso de la ruta SAPK, la ruta de integridad celular está sometida a una regulación negativa que le permite regresar a su estado inicial previo a la activación y así responder a nuevos estímulos.

Pmp1 es el principal regulador negativo de Pmk1 (Sugiura *et al.*, 1998). Se trata de una fosfatasa de especificidad dual capaz de inactivar a Pmk1 actuando sobre los residuos de Tyr¹⁸⁶ y Thr¹⁸⁸ de la MAP quinasa. La estabilidad del mensajero de *pmp1⁺* depende de la proteína de unión a ARN, **Rnc1**, cuya actividad es estimulada en respuesta a estrés por la fosforilación directa de Pmk1, favoreciendo la síntesis de Pmp1 y constituyendo un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la ruta (Sugiura *et al.*, 2003).

Además, un estudio realizado en nuestro laboratorio demostró que las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2, y la fosfatasa de treonina Ptc1 mencionadas anteriormente como reguladores negativos de la MAP quinasa Sty1 (ver Apartado 3.2.5), son también capaces de asociarse y desfosforilar a Pmk1, definiendo una relación de interacción ("*crosstalk*") con la ruta SAPK (Madrid *et al.*, 2007).

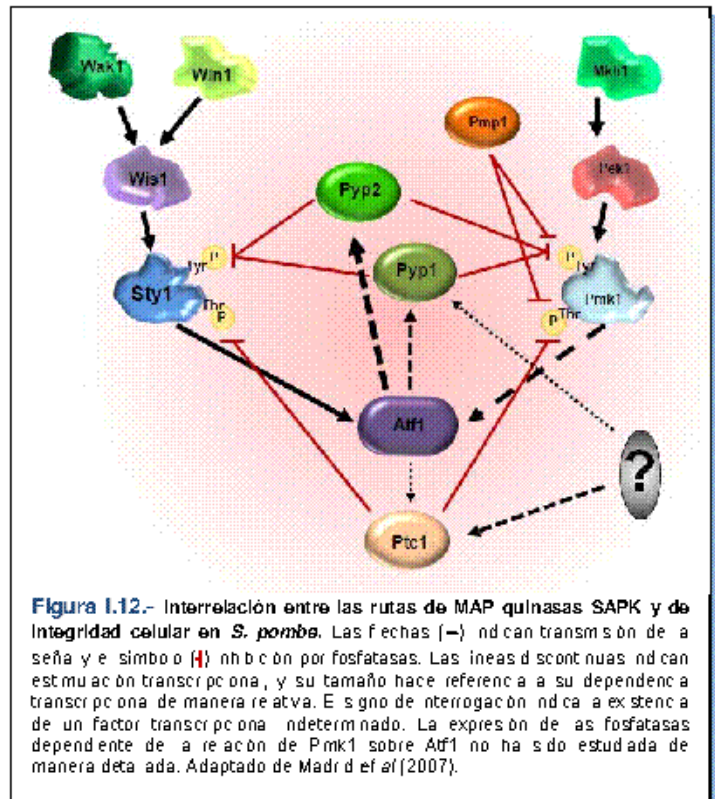
3.4.- Interconexión entre las rutas de MAP quinasa de respuesta a estrés y de integridad celular

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron por primera vez la existencia de una interrelación entre las rutas de MAP quinasa de Pmk1 y Sty1 de modo que las actividades de Sty1 y Atf1 son necesarias para una correcta desactivación de la MAP quinasa Pmk1 en células sometidas a estrés hiperosmótico por KCl (Madrid *et al.*, 2006).

Esta interconexión está mediada por las fosfatasas Pyp1, Pyp2, Ptc1 y Ptc3, previamente descritas como reguladores negativos de la ruta SAPK

(Degols *et al.*, 1996; Shiozaki y Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Gaits *et al.*, 1997) y capaces de actuar también sobre la MAP quinasa de integridad celular Pmk1 (Madrid *et al.*, 2007; Takada *et al.*, 2007) (Figura I.12). De este modo, mientras Pyp1 y Ptc1 regulan el nivel basal de fosforilación de Pmk1, Pyp1, Pyp2 y Ptc1 limitan la hiperactivación de la MAP quinasa durante el estrés osmótico por KCl (Madrid *et al.*, 2007).

Aunque no es el único ejemplo existente de fosfatasas que actúan sobre MAP quinasas de diferentes rutas (en *S. cerevisiae* las MAP quinasas FUS3, KSS1 y SLT2 son sustratos de las fosfatasas de tirosina PTP2 y PTP3, homólogas a Pyp1 y Pyp2; Zhan *et al.*, 1997; Mattison *et al.*, 1999 y 2000) sí fue la primera descripción de que esto ocurría en la levadura con fisión.



4.- RACK1

4.1.- Identificación y caracterización de RACK1

El término RACK (*R*eceptor for *A*ctivated *C*-*K*inase) hace referencia a un grupo de proteínas de bajo peso molecular (≈ 30 kDa) capaces de unirse a la proteína quinasa C (PKC) activada, y que cumplen los siguientes criterios (Mochly-Rosen *et al.*, 1991):

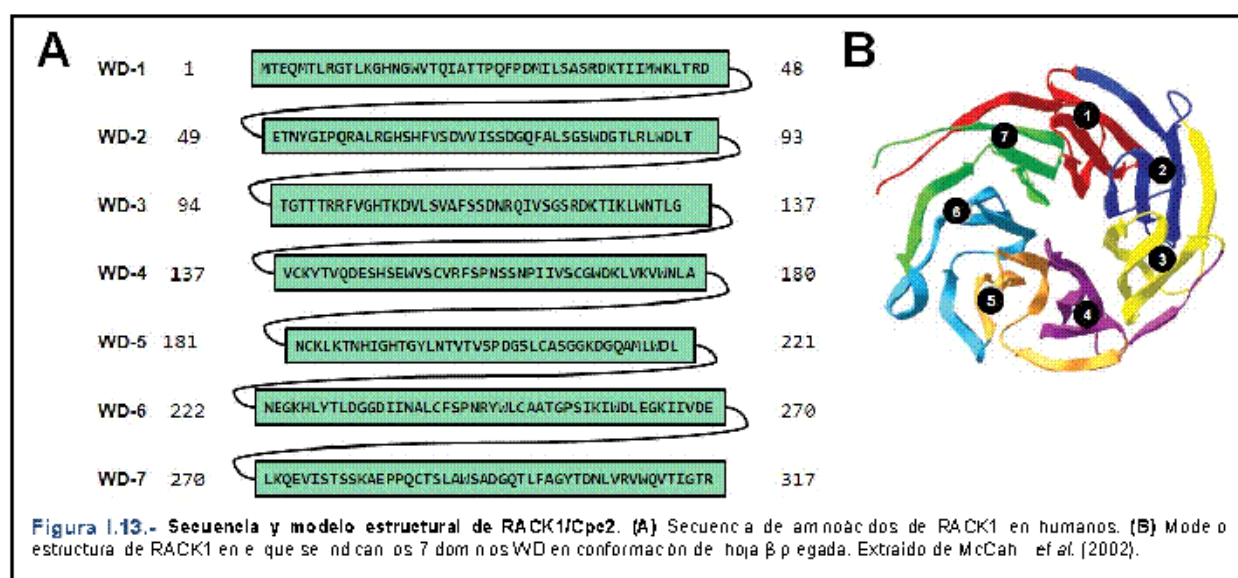
- 1) Son capaces de unirse a la PKC en presencia de sus activadores (diacilglicerol, calcio, fosfatidilserina), pero no en su ausencia.
- 2) La unión a PKC no ocurre en el sitio catalítico, siendo ésta saturable y específica.
- 3) No son sustratos de la quinasa, pero su presencia incrementa la actividad de PKC sobre distintos efectores.

Originalmente *RACK1* se identificó como una proteína de 36 kDa presente en células de cerebro de rata (Ron *et al.*, 1994). Posteriormente se ha confirmado que todos los eucariotas poseen homólogos de *RACK1*, y que estos presentan un alto grado de conservación. Así, se ha comprobado la existencia de *RACK1* en el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, que se separó de los antecesores de plantas y animales entre 600-1000 millones de años atrás (Schloss, 1990). Como se ha comentado, la secuencia de *RACK1* se encuentra altamente conservada: rata, pollo y humanos comparten en torno al 88% de identidad a nivel de ADN y casi un 100% a nivel proteico. El homólogo a *RACK1* en *Drosophila* presenta un 76% de identidad con *RACK1* de mamíferos, y muestra un patrón de expresión diferencial durante el desarrollo embrionario (Vani *et al.*, 1997), al igual que *XRACK1*, el homólogo en *Xenopus*, que comparte el 95% de identidad con la proteína humana (Kwon *et al.*, 2001). En plantas como *Arabidopsis* se han descrito hasta tres genes con homología con *RACK1* (*RACK1A*, *RACK1B* y *RACK1C*), con un 97% de secuencia compartida y un 78% de identidad con *RACK1* de humanos (Chen *et al.*, 2006).

Por su parte, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* presentan un solo gen homólogo a *RACK1*, *ASC1/CPC2* (65% de identidad) y *cpc2** (77% de identidad), respectivamente (ver Apartado 5.)

4.2.- Estructura y función de las proteínas con dominios WD40

Tanto RACK1 como Cpc2 (la proteína RACK1 de *S. pombe*) presentan en su estructura repeticiones múltiples ricas en triptófano–aspártico (WD40; Figura I-13A), siguiendo el consenso $X^{6-94}\text{-[GH-X}^{23-41}\text{-WD]}_N^{4-8}$ (donde N = número de repeticiones WD, y X = cualquier aminoácido) (Neer *et al.*, 1994). Este tipo de dominios están presentes en proteínas que actúan a modo de plataforma para el ensamblaje de complejos multiproteicos, o como mediadores para la interacción entre éstos (Neer *et al.*, 1994). Los motivos WD40 adoptan una conformación de β -hélice que se disponen en una estructura circular (Figura I-13B), ideal para anclarse a varios elementos al mismo tiempo y facilitar las interacciones proteína-proteína. Por tanto, el papel asignado a las proteínas con dominios ricos en Trp-Asp es actuar a modo de adaptadores, uniéndose simultáneamente a varias proteínas y modulando las interacciones entre ellas. Gracias a la proximidad física que se establece al estar unidos al mismo adaptador, se puede facilitar la afinidad de las enzimas por sus sustratos.



Las proteínas con dominios WD40 están implicadas en numerosos procesos celulares, entre otros el procesamiento del ARN, la regulación del ensamblaje del citoesqueleto o del ciclo celular (Neer *et al.*, 1994). Un ejemplo importante de proteínas con este tipo de dominios y que presentan un alto grado de homología con RACK1 son las subunidades β de las proteínas G. Las proteínas G heterotriméricas están implicadas en múltiples rutas de señalización. Están formadas por las subunidades α (con capacidad de hidrolizar el GTP), β y γ acopladas a un receptor anclado a la membrana plasmática. En respuesta a la unión del ligando al receptor, se produce un cambio conformacional en la subunidad α , que libera el GDP y une GTP. Ello

provoca la disociación del dímero formado por las subunidades $G_{\beta\gamma}$ de G_{α} , que activa o inhibe a sus efectores. Después de un cierto tiempo, la G_{α} hidroliza el GTP a GDP, y se reconstituye el complejo heterotrimérico (Sprang 1997).

Otro ejemplo es la familia de genes Groucho/TLE, que en *Drosophila* codifican proteínas con una región N-terminal rica en glutamina (implicada en la oligomerización) y un extremo C-terminal con abundantes repeticiones WD. Actúan a modo de co-represores sin unirse directamente a los ácidos nucleicos, formando complejos con proteínas represoras unidas al ADN, y participando en el desarrollo embrionario y en distintas rutas de señalización (Chen y Courey, 2000).

4.3.- RACK1 participa en la regulación de múltiples procesos celulares

En respuesta a estímulos activadores de PKC la localización de RACK1 coincide con la de PKC activada, lo que sugiere que el papel de RACK1 no es "anclar" a PKC a un lugar concreto dentro de la célula (Ron *et al.*, 1999). Por otra parte, aunque muchos de los procesos donde participa RACK1 están vinculados a su relación con PKC, otros parecen ser independientes, dejando la puerta abierta a un papel de RACK1 independiente de la actividad de PKC. En mamíferos, RACK1 está implicado en numerosos procesos biológicos (McCahill *et al.*, 2002; López-Bergami *et al.*, 2005). A continuación se describen los más relevantes:

a) Función y envejecimiento neuronal. Una función importante asociada a las distintas isoformas de PKC en el tejido neuronal es la transducción de señales que regulan sucesos a corto (flujo de iones, liberación de neurotransmisores), medio (modulación de receptores) y largo plazo (remodelación sináptica y expresión génica). Además, las PKCs también participan en los procesos de aprendizaje y memoria (Selcher *et al.*, 2002). Durante el desarrollo cerebral el patrón de expresión de las distintas isoformas de PKC es similar al de RACK1, lo que sugiere la existencia de una interdependencia funcional (Huang *et al.*, 1990).

En los cerebros de ratas con edad avanzada la traslocación de PKC en respuesta a estímulos activadores está seriamente dañada, afectando así la señalización y transmisión de la señal y, por tanto, a los procesos anteriormente mencionados (Battaini *et al.*, 1995). Varios trabajos han descrito que los niveles de RACK1 en estos tejidos se encuentran reducidos, y han asociado el déficit funcional en la traslocación de PKC con unos menores niveles de RACK1 (Pascale *et al.*, 1996; Sanguino *et al.*, 2004). La enfermedad de Alzheimer también parece estar relacionada con un déficit funcional de PKCs, que de nuevo ven afectada su traslocación desde el citosol a la membrana en respuesta a distintos estímulos activadores como forbol 12-acetato 13-

miristato (PMA). Distintos estudios han propuesto que este fenómeno podría ser debido a la reducción de los niveles de RACK1 en el tejido neuronal, puesto que, al igual que en el caso anterior, tanto los niveles de mensajero como de proteína de PKC no están alterados en estos tejidos, y su funcionalidad mejoró al incrementar los niveles de RACK1 (Wang *et al.*, 1994).

b) Desarrollo embrionario. Distintos estudios realizados en *Drosophila melanogaster* han destacado la importancia de RACK1 durante el desarrollo embrionario, siendo esencial su función desde los estadios más tempranos de este proceso. La presencia de la proteína RACK1 materna heredada en los ovocitos es imprescindible durante las primeras etapas de desarrollo tras la formación del cigoto, provocándose su muerte si no se produce adecuadamente (Kadmas *et al.*, 2007). La expresión del mensajero de *RACK1* en *Drosophila* sigue un patrón complejo a lo largo del desarrollo. Aunque todos los tejidos expresan *RACK1* a bajos niveles durante la embriogénesis temprana, los tejidos individuales potencian su expresión en determinadas etapas del desarrollo (Vani *et al.*, 1997; Kadmas *et al.*, 2007). Estos resultados han sido corroborados en estudios realizados con oocitos de *Xenopus* en los que se ha analizado el patrón de expresión de *XRACK1* durante la embriogénesis (Kwon *et al.*, 2001).

En los individuos adultos de *Drosophila*, la expresión de RACK1 es mucho mayor en las hembras que en los machos, siendo los ovarios los tejidos que muestran un mayor nivel de expresión. Las hembras con versiones atenuadas de *RACK1* presentan defectos de desarrollo en los órganos reproductores y en el número y formación de ovocitos, llegando incluso a la esterilidad, lo que vincula a RACK1 con el mantenimiento de la línea germinal y la fertilidad (Kadmas *et al.*, 2007).

c) Adhesión celular. Las integrinas son receptores heterodiméricos ($\alpha\beta$) que median la unión de las células a la matriz extracelular y receptores específicos de otras células. Presentan un largo dominio extracelular de unión con el ligando, un dominio transmembranal, y un dominio citoplasmático conservado que carece de actividad catalítica. En respuesta a la unión con el ligando, las integrinas inducen cambios en la organización del citoesqueleto de actina y forman agrupaciones de los propios receptores capaces de activar a otras rutas de transducción de señales. RACK1 es capaz de interactuar con el dominio citoplasmático de la subunidad β de las integrinas a través de las repeticiones WD (Liliental y Chang, 1998). Sin embargo, su unión requiere el pretratamiento con PMA, un activador de PKC que tiene como sustrato a la subunidad β de la integrina, por lo que su papel regulador de la adhesión parece estar mediado por su co-localización con PKC (revisión de Schechtman y Mochly-Rosen, 2001). Algo similar ocurre con la Dinamina-1, una proteína implicada en el reciclaje de las vesículas de clatrina que es sustrato de PKC y capaz de interactuar con RACK1 (Rodríguez *et al.*, 1999).

También ha sido descrita la capacidad de RACK1 para interactuar con el receptor del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1R), y que esta asociación se produce tanto en presencia de IGF-1 como de PMA, por lo que en respuesta a ambas moléculas RACK1 formaría un complejo proteico que incluiría a la subunidad β de la integrina y al IGF-1R, proporcionando un mecanismo potencial por el que estas moléculas podrían regularse unas a otras (Hermanto *et al.*, 2002). Otros trabajos relacionan la adhesión focal de las células con la capacidad de RACK1 de interactuar con la quinasa de tirosina Src (Cox *et al.*, 2003).

d) Regulación de rutas de señalización por MAP quinasas. En células humanas, la MAP quinasa JNK es fosforilada por PKC en el residuo de Ser¹²⁹. Esta fosforilación es crucial para su activación por TPA (12-o-tetradenoil-phorbol-13-acetato), TNF α (Factor de Necrosis Tumoral α) o radiación ultravioleta y requiere la presencia de RACK1. En respuesta a estrés RACK1 actuaría a modo de plataforma entre JNK y PKC a través de los dominios WD, facilitando la fosforilación en Ser¹²⁹. Además, el grupo fosfato en esta Ser¹²⁹ promueve la fosforilación de otros residuos por las quinasas MKK4 y MKK7 en respuesta a estreses que activan ambas rutas de señalización, indicando que la función de RACK1 es fundamental para una adecuada señalización de los estímulos externos (López-Bergami *et al.*, 2005).

Arimoto *et al.* (2008) demostraron la existencia de interacción entre RACK1 y MTK1 (una quinasa que media la respuesta de apoptosis inducida por estrés) en células animales. Según estos autores, la unión a RACK1 es necesaria para potenciar la activación de MTK1, aunque su presencia no es suficiente en ausencia de los activadores. Además, proponen que RACK1 mantiene a MTK1 en su forma dimerica e inactiva en ausencia de estrés, facilitando la posterior activación en respuesta a distintos estímulos.

e) Regulación de la traducción. RACK1 y sus ortólogos son componentes estructurales del ribosoma eucariótico, formando parte de la subunidad pequeña 40S. Distintos trabajos han relacionado a esta proteína con la regulación de la traducción (ver Apartado 4.4 a continuación).

f) Ciclo celular y cáncer. RACK1 interactúa con Src (quinasa involucrada en la proliferación, diferenciación, adhesión y supervivencia celulares; ver revisión por Abram y Courtneidge, 2000), e inhibe su actividad de manera dosis-dependiente en células NIH3T3 de ratón. La sobre-expresión de *RACK1* no sólo reduce la tasa de crecimiento, sino que prolonga la fase G₀/G₁ por inactivación de Src (Chang *et al.*, 1998). Por el contrario, la inhibición de la traducción del mensajero de *RACK1* en la misma línea celular conduce a una activación de la señalización mediada por Src, acelerando la transición G₁/S (Mamidipudi *et al.*, 2004). El homólogo en *S. pombe* está implicado también en el ciclo celular, ya que el mutante carente Cpc2/RACK1 muestra un retraso en la entrada en mitosis, alcanzando un tamaño mayor antes de dividirse (McLeod *et al.*, 2000).

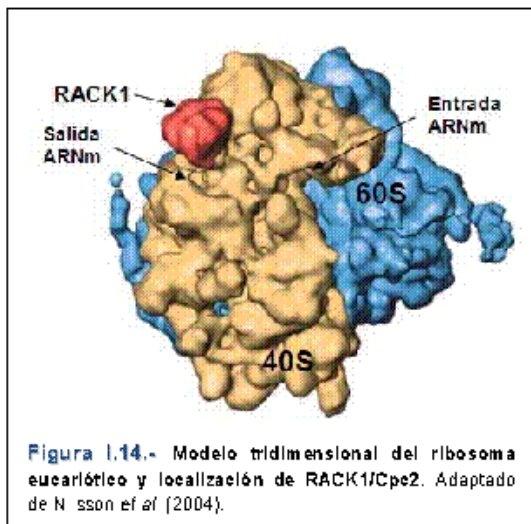
La relación entre cáncer y PKC se describió al observar que compuestos como el PMA, un activador específico de PKC, inducían la formación de tumores en modelos animales (Castagna *et al.*, 1982). De hecho, distintos tipos de cáncer se encuentran asociados a una alta actividad de PKCs. En las células cancerosas de pulmón y de colon los niveles de RACK1 se encuentran aumentados hasta 20 veces en comparación con tejidos sanos (Berns *et al.*, 2000), aunque no está claro si ello colabora al desarrollo de ambas neoplasias (Schechtman y Mochly-Rosen, 2001).

g) Respuesta inmune. Un mecanismo importante en la respuesta inmune de mamíferos consiste en la producción del anión superóxido (O_2^-) por los neutrófilos en respuesta al reconocimiento de antígenos. Esta respuesta parece estar regulada por la actividad de PKC y RACK1. El bloqueo de la unión de RACK1 a PKC o la inhibición de la traducción de *RACK1* incrementa la generación de este anión en los neutrófilos HL60, lo que sugiere que RACK1 podría secuestrar a PKC o dirigirla hacia otras rutas de señalización para regular así negativamente la producción de O_2^- (Korchak y Kilpatrick, 2001).

h) Desarrollo y señalización en plantas. Los ortólogos a RACK1 en plantas están implicados en procesos como la germinación, la producción de hojas y la floración, afectando a la señalización en presencia de hormonas vegetales (Chen *et al.*, 2006; Guo y Chen 2008 y 2009), y a la respuesta inmune de algunas plantas (Nakashima *et al.*, 2008). Aunque en *Arabidopsis* existen hasta tres proteínas RACK (*RACK1A*, *RACK1B* y *RACK1C*), la falta de una de ellas es suficiente para provocar alteraciones en el desarrollo de la planta. Ello sugiere bien la existencia de funciones diferentes para cada uno de los tres parálogos, o la necesidad de formación de heterodímeros para garantizar su actividad biológica (Chen *et al.*, 2006).

4.4.- RACK1 es un componente estructural del ribosoma eucariótico

Una de las características fundamentales de *RACK1* y sus ortólogos es que se trata de proteínas estructurales que forman parte de la subunidad pequeña 40S del ribosoma, estando presentes en una relación 1:1 con el resto de proteínas ribosomales (Link *et al.*, 1999; Shor *et al.*, 2003; Gerbasi *et al.*, 2004). El análisis cristalográfico por microscopía electrónica sitúa a RACK1 cerca de la zona de salida de los ARN mensajeros, en una localización conservada evolutivamente (Figura 1.14). Dicha localización se mantiene gracias a la interacción entre residuos de aminoácidos básicos como Arginina y Lisina presentes en su secuencia con el ARN ribosomal. Además, las regiones con dominios WD quedan expuestas hacia el exterior, lo que sugiere que RACK1 podría servir de plataforma y ensamblaje para distintas moléculas presentes en el ribosoma (Sengupta *et al.*, 2004).



Dada su estructura y localización en el ribosoma, es lógico pensar que RACK1 pueda tener un papel asociado a la regulación de la traducción en respuesta a distintos estímulos. A favor de esta hipótesis se encuentra la relación ya mencionada entre PKC y RACK. En respuesta a estímulos específicos, PKC es activada y reclutada al ribosoma gracias a RACK1. Allí, PKC fosforila el factor eIF6, que se disocia de la subunidad 60S y permite el ensamblaje del ribosoma completo (Ceci *et al.*, 2003). También existen algunas evidencias

de que el factor eIF4E, una proteína que se une a la región CAP de los ARNm, puede ser fosforilada por PKC de manera dependiente de RACK1 (Whalen *et al.*, 1996). En conjunto, estas evidencias sitúan a RACK1 como un elemento esencial en la transmisión de los estímulos para la modificación del proteoma a nivel traduccional, alterando las funciones celulares de manera global. El estudio de los ortólogos de RACK1 en las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, ha aportado algunas pistas sobre su posible papel como elemento regulador de la traducción (ver Apartado 5)

Aunque tanto en humanos como en *S. cerevisiae* o *S. pombe* se ha descrito la existencia de RACK1 no particulado (Ceci *et al.*, 2003; Shor *et al.*, 2003), está por determinar la existencia de posibles funciones de esta proteína en su forma citosólica no unida a ribosoma. Los datos aportados por Arimoto *et al.* (2008) en cuanto a la relación entre RACK1 y MTK1 (ver Apartado 4.3), apuntan en este sentido. Ambas proteínas co-localizan en el citoplasma en células no estimuladas. Sin embargo, en respuesta a compuestos que inducen la muerte celular, RACK1 es reclutado en los gránulos de estrés junto a la subunidad pequeña del ribosoma, manteniéndose separado de MTK1 y evitando así su activación. De este modo se consigue promover la supervivencia celular evitando la activación de la ruta MTK1-SAPK y la respuesta apoptótica (Arimoto *et al.*, 2008).

5.- ORTÓLOGOS DE RACK1 EN LEVADURAS

Los ortólogos de *RACK1* en *S. cerevisiae* (*ASC1*) y *S. pombe* (*cpc2*⁺) no son genes esenciales, por lo que el análisis de los fenotipos asociados a su delección ha arrojado nuevos datos sobre las funciones asociadas a esta proteína. Además, algunos de los fenotipos que manifiestan los mutantes nulos de ambas levaduras son suprimidos por la expresión de *RACK1* humano, lo que sugiere que las funciones asignadas a *ASC1/Cpc2* podrían encontrarse conservadas en células superiores.

5.1.- *ASC1* en *Saccharomyces cerevisiae*

La primera referencia formal sobre el ortólogo de *RACK1* en *S. cerevisiae* fue realizada por Chantrel *et al.* (1998), al describir a *ASC1* como un gen implicado en el crecimiento de la levadura en condiciones de anaerobiosis, y sugiriendo su implicación en la traducción al demostrar su asociación con la subunidad 40S del ribosoma. Estos datos fueron posteriormente corroborados por Gerbasi *et al.* (2004), que no sólo confirmaron la asociación de *ASC1* con el ribosoma, sino también su posible papel como regulador de la traducción *in vivo* e *in vitro* (Gerbasi *et al.*, 2004).

En *S. cerevisiae* la expresión de *ASC1* se encuentra regulada por FHL1, un factor de transcripción que regula la expresión de la mayoría de los genes que codifican proteínas ribosomales (Lee *et al.*, 2002). FHL1 asociado a IFH1 (un co-regulador de la expresión génica en respuesta a condiciones ambientales; Cherel y Thuriaux, 1995), regula los niveles de expresión de *ASC1* en función de la fuente de carbono. Así, en presencia de una fuente de carbono no fermentable como el etanol, los niveles de mensajero de *ASC1* se reducen a la mitad comparados con la expresión en presencia de glucosa (Kleinschmidt *et al.*, 2006). Los niveles de *ASC1* en medio con glucosa se ven comprometidos en ausencia de FHL1, mientras que IFH1 es necesario únicamente para la expresión en medio con etanol como fuente de carbono (Kleinschmidt *et al.*, 2006). El mismo tipo de respuesta también se observa en el caso de otras proteínas ribosomales (Herruer *et al.*, 1987; Kief y Warner, 1981). Sin embargo los niveles de expresión de *ASC1* se reducen en respuesta al choque térmico, estrés osmótico, o ayuno de nitrógeno (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Natarajan *et al.*, 2001).

La relación de *ASC1* con la señalización celular en función de las condiciones nutricionales del medio ha sido descrita por varios autores. Hoffmann *et al.* (1999) describieron que en *S. cerevisiae* *ASC1* actúa como regulador negativo de la expresión de elementos

implicados en la respuesta frente al ayuno de aminoácidos. Según este estudio, en condiciones de limitación de aminoácidos en el medio, ASC1 regula negativamente la expresión de genes inducidos por GCN4, un activador transcripcional cuya expresión se estimula en estas condiciones dependiendo de la fosforilación por GCN2 de eIF2 α (Dever *et al.*, 2002).

La expresión de *FLO11*, que codifica una proteína de *S. cerevisiae* implicada en la adhesión y dimorfismo durante el ayuno de glucosa y la limitación de aminoácidos, está reducida en el mutante carente de *ASC1*, por lo que dichas células pierden la capacidad de adhesión y crecimiento invasivo (Valerius *et al.*, 2007). Asimismo, la homología existente entre *ASC1* y la subunidad β de las proteínas G le permite a ASC1 sustituir a las G_{β} como GPA2 (subunidad G_{α}), y regulando negativamente la señalización por glucosa responsable de la activación de la ruta PKA en respuesta a incrementos en los niveles de AMPc (Zeller *et al.*, 2007).

Recientemente se ha caracterizado la estructura cristalográfica de ASC1 y se han identificado los aminoácidos responsables de su unión a la subunidad 40S del ribosoma (Coyle *et al.*, 2009). La identificación de dichos residuos ha permitido confirmar el modelo propuesto previamente por Sengupta *et al.* para RACK1, según el cual ASC1 se une fundamentalmente al ARNr 18S por medio de los aminoácidos conservados Arg³⁸ y Lys⁴⁰ (Gengupta *et al.*, 2004).

5.2.- Cpc2 en *Schizosaccharomyces pombe*

Los primeros estudios sobre Cpc2, el ortólogo a RACK1 en *S. pombe*, fueron realizados por el grupo de Maureen Mcleod (Mcleod *et al.*, 2000), y sugerían que dicha proteína actuaba como regulador negativo del desarrollo meiótico en esta levadura. Así, Cpc2 se identificó tras un ensayo de dos híbridos con Pat1, una quinasa esencial que regula la entrada en meiosis y esporulación en *S. pombe* (Iino y Yamamoto, 1985; Nurse, 1985). Las células carentes de *cpc2*⁺ presentan fallos en el bloqueo en fase G₁ del ciclo previo al inicio de la conjugación, y un retraso en la entrada en mitosis que provoca un claro incremento en el tamaño en división. Aunque los mutantes $\Delta cpc2$ no son estériles, muestran un defecto parcial durante los procesos de conjugación y esporulación. Los ensayos de actividad quinasa para Pat1 no se ven afectados en ausencia de Cpc2 (McLeod *et al.*, 2000), por lo que el papel concreto de esta proteína en la regulación del desarrollo sexual de *S. pombe* no ha sido aclarado todavía.

Como ocurre con RACK1 en mamíferos, Cpc2 también interacciona con Pck2 (Won *et al.*, 2001), uno de los dos homólogos a PKC presentes en *S. pombe* (Kobori *et al.*, 1994), y que recientemente ha sido descrito como un componente de la ruta de MAP quinastas de integridad

celular (Ma *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2008). Por otra parte, la sensibilidad del mutante $\Delta cpc2$ frente a Latrunculina B (un compuesto que inhibe la polimerización de la actina), así como la existencia de defectos morfológicos agravados cuando se combina con la delección de $pck2^+$, sugieren que en *S. pombe* Cpc2 participa en la organización del citoesqueleto de actina de manera independiente o paralela a la actividad de Pck2 (Won *et al.*, 2001).

De manera análoga a RACK1 y ASC1, Cpc2 forma parte estructural del ribosoma eucariótico y, aunque no es imprescindible para el proceso de traducción, parece jugar un papel relevante en la estabilización de la unión entre las subunidades 40S y 60S del ribosoma (Shor *et al.*, 2003). Un resultado muy interesante presentado en este trabajo indicó que, aunque la síntesis proteica global no se ve afectada en el mutante carente de $cpc2^+$, sí se observa una variación en la abundancia relativa de algunas proteínas. Así, ciertas proteínas ribosomales y algunas enzimas implicadas en el metabolismo de la metionina vieron reducida su expresión en ausencia de $cpc2^+$. Curiosamente, estas variaciones no siempre se correspondían con descensos en los niveles de ARN mensajero correspondientes de dichas proteínas. Así, la proteína estructural del ribosoma Rpl25 mostró unos niveles de mensajero invariables por la presencia o ausencia de Cpc2, mientras que sus niveles proteicos se reducen drásticamente en las células carentes de $cpc2^+$, lo que sugeriría que Cpc2 podría participar en la regulación traduccional de ciertos RNA mensajeros de manera selectiva (Shor *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

RACK1 regula variados e importantes procesos celulares tanto en células humanas como en el resto de organismos eucariotas. Sin embargo, los mecanismos que definen su actividad a nivel molecular no han sido definidos claramente en muchos casos. El propósito fundamental de esta Tesis Doctoral ha consistido en tratar de dilucidar las funciones celulares de Cpc2, ortólogo a RACK1, empleando la levadura *Schizosaccharomyces pombe* como modelo de estudio. Con este fin se abordaron los siguientes objetivos:

- 1.- Análisis de la relación funcional entre Cpc2 y las rutas de transducción de señales mediadas por MAP quinasas durante la respuesta celular frente a condiciones de estrés.
- 2.- Estudio del papel de Cpc2 como regulador de la progresión del ciclo celular e identificación de las dianas que participan en dicha regulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MICROORGANISMOS

1.1.- Estirpes de *Schizosaccharomyces pombe*

Se han empleado diversas cepas silvestres y mutantes de *S. pombe* que han sido cedidas o generadas durante la realización de esta Tesis Doctoral y cuya denominación, genotipo y origen quedan indicados en la Tabla MM.1.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
MM1	h ⁺ <i>ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2004)
MM2	h <i>ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2004)
AN001	h ⁺ <i>cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN002	h ⁺ <i>cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
MI200	h ⁺ <i>pmk1-HA6H:ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2006)
MI201	h <i>pmk1-HA6H:ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2006)
AN100	h ⁺ <i>pmk1-HA6H:ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN101	h <i>pmk1-HA6H:ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
GB3	h ⁺ <i>pck2::KanMX6 pmk1-HA6H:ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Barba <i>et al.</i> (2007)
AN150	h ⁺ <i>pck2::KanMX6 pmk1-HA6H:ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
TP319-13c	h <i>pmk1::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Toda <i>et al.</i> (1996)
AN160	h <i>pmk1::ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
MI212	h ⁺ <i>pmp1::KanMX6 pmk1-HA6H:ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2007)
AN170	h ⁺ <i>pmk1-HA6H:ura4⁺ cpc2::KanMX6 pmp1::HygMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
PP42	h ⁺ <i>ppb1::ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4D-18</i>	P. Pérez
AN010	h ⁺ <i>ppb1::ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M210 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
JMI521	h ⁺ <i>styl-HA6H:ura4⁺ ade6-M216 his7-366 leu1-32 ura4D-18</i>	J. B. Millar
AN200	h ⁺ <i>styl-HA6H:ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M216 his7-366 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
MI709	h <i>wisl^{DD}-12myc:ura4⁺ pmk1-HA6H:ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2006)
AN600	h <i>wisl^{DD}-12myc:ura4⁺ pmk1-HA6H:ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
MI713	h <i>wisl^{DD}-12myc:ura4⁺ pmk1-HA6H:ura4⁺ atf1::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2006)
MI701	h ⁺ <i>pypl-13myc:KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2006)
AN700	h ⁺ <i>pypl-13myc:KanMX6 cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
MI702	h <i>pyp2-13myc:ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	J. B. Millar
AN400	h <i>pyp2-13myc:ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
MI703	h ⁺ <i>ptc1-13myc:KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2006)
AN500	h ⁺ <i>ptc1-13myc:KanMX6 cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo

Tabla MM.1.- Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* empleadas en este trabajo

MI305	h ⁺	<i>pmp1-GFP::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2006)
AN020	h ⁺	<i>pmp1-GFP::KanMX6 cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN030	h ⁺	<i>ptc3-13myc::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN031	h ⁺	<i>ptc3-13myc::KanMX6 cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
MI213	h ⁺	<i>pyp1::KanMX6 pmk1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2007)
AN032	h ⁺	<i>pyp1::KanMX6 pmk1-HA6H::ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
JM1821	h	<i>atf1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	J. B. Millar
AN300	h	<i>atf1-HA6H::ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
1243	h	<i>eIF2α(S52A)::ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4D-18</i>	Tvegård <i>et al.</i> (2007)
AN040	h	<i>eIF2α(S52A)::ura4⁺ atf1-HA6H::ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN041	h	<i>eIF2α(S52A)::ura4⁺ atf1-HA6H::ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M210 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
TK107	h	<i>styl::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	T. Kato
MI103	h ⁺	<i>atf1::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2007)
MI204	h ⁺	<i>styl::ura4⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> (2007)
AN-120	h ⁺	<i>styl::ura4⁺ cpc2::KanMX6 pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
EHH14	h	<i>nmt41::pap1-GFP::leu1⁺ his2 leu1-32 ura4D-18</i>	E. Hidalgo
AN050	h	<i>nmt41::pap1-GFP::leu1⁺ cpc2::KanMX6 his2 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN060	h ⁺	<i>ctt1-GFP::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN061	h ⁺	<i>ctt1-GFP::KanMX6 cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN070	h ⁺	<i>cpc2-GFP::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN071	h ⁺	<i>cpc2::KanMX6 cpc2-GFP::leu1⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN072	h ⁺	<i>cpc2::KanMX6 cpc2(R36D K38E)-GFP::leu1⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN081	h ⁺	<i>cpc2::KanMX6 cpc2-GFP::leu1⁺ atf1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN082	h ⁺	<i>cpc2::KanMX6 cpc2(R36D K38E)-GFP::leu1⁺ atf1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN091	h ⁺	<i>cpc2::KanMX6 cpc2-GFP::leu1⁺ pyp1-13myc::KanMX6 pmk1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN092	h ⁺	<i>cpc2::KanMX6 cpc2(R36D K38E)-GFP::leu1⁺ pyp1-13myc::KanMX6 pmk1-HA6H::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN102	h	<i>cpc2::KanMX6 cpc2-GFP::leu1⁺ pyp2-13myc::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
AN103	h	<i>cpc2::KanMX6 cpc2(R36D K38E)-GFP::leu1⁺ pyp2-13myc::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Este trabajo
FY13559	h	<i>rst2-GFP::ura4⁺ leu1 ade6-M216 ura4D-18</i>	YGRC
AN-CC40	h	<i>rst2-GFP::ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1 ade6-M216 ura4D-18</i>	Este trabajo
L972	h	<i>protótrofa</i>	Leupold 1950
FY7287	h	<i>cdc2-1w leu1-32</i>	YGRC
AN-CC1	h	<i>cdc2-1w cpc2::KanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
FY16194	h	<i>cdc2-3w ade6-M216 ura4D-18</i>	YGRC
AN-CC2	h	<i>cdc2-3w cpc2::KanMX6 ade6-M216 ura4D-18</i>	Este trabajo

Tabla MM.1.- Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* empleadas en este trabajo (continuación)

FY16230	h	<i>cdc2-3w cdc25::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	YGRC
AN-CC3	h	<i>cdc2-3w cdc25::ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
FY7108	h	<i>wee1-50 ade6-M216</i>	YGRC
AN-CC5	h	<i>wee1-50 cpc2::KanMX6 ade6-M216</i>	Este trabajo
1081	h	<i>wee1-3HA6H ura4-D18 leu1-32</i>	O'Connell (1997)
AN-CC8	h	<i>wee1-3HA6H cpc2::KanMX6 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
326	h	<i>cdc10-129</i>	V. Simanis
AN-CC10	h	<i>cdc10-129 cpc2::KanMX6</i>	Este trabajo
JK2240	h	<i>cdr2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	P. Russell
AN-CC12	h	<i>cdr2::ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
JK2241	h	<i>cdr2::ura4⁺ nim1::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	P. Russell
AN-CC13	h	<i>cdr2::ura4⁺ nim1::ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
JK2310	h	<i>cdr2-2HA6his:ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	P. Russell
AN-CC14	h	<i>cdr2-2HA6his:ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
LW117	h	<i>nim1-2HA6his:ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	P. Russell
AN-CC15	h	<i>nim1-2HA6his:ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
560	h	<i>cdc21(mcm4)-GFP:ura4⁺ ura4 leu1-32</i>	SE. Kearsey (2000)
AN-CC16	h	<i>cdc21(mcm4)-GFP:ura4⁺ cpc2::KanMX6 ura4 leu1-32</i>	Este trabajo
AN-CC17	h ⁺	<i>cdc21(mcm4)-GFP:ura4⁺ cpc2::KanMX6 ura4 leu1-32</i>	Este trabajo
PPG148	h	<i>cdc25-22 ura4-D18</i>	P. Pérez
AN-CC18	h	<i>cdc25-22 cpc2::KanMX6 ura4-D18</i>	Este trabajo
AN-CC19	h	<i>cdc25-22 cpc2-GFP:KanMX6 ura4-D18</i>	Este trabajo
FM-23	h	<i>cdc25-HA:ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Stock laboratorio
AN-CC20	h	<i>cdc25-HA:ura4⁺ cpc2::KanMX6 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AN-CC21	h ⁺	<i>cdc10-129 cdc21(mcm4)-GFP:ura4⁺ leu1-32</i>	Este trabajo
AN-CC22	h ⁺	<i>cdc10-129 cdc21(mcm4)-GFP:ura4⁺ cpc2::KanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
AN-CC23	h	<i>cdr2-2HA6his:ura4⁺ cpc2::KanMX6 cpc2-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AN-CC24	h	<i>cdr2-2HA6his:ura4⁺ cpc2::KanMX6 cpc2(R36D K38B)-GFP::leu1⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
T8313	h	<i>pom1::KanMX6 pmk1-HA6H:ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Soto <i>et al.</i> (2010)
AN-CC27	h	<i>pom1::KanMX6 cpc2::KanMX6 pmk1-HA6H:ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
FY13983	h ^{po}	<i>cpc2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	YGRC
AN-CC30	h ^{po}	<i>cpc2::ura4⁺ cpc2-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	Este trabajo
AN-CC31	h ^{po}	<i>cpc2::ura4⁺ cpc2(R36D K38B)-GFP::leu1⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	Este trabajo
FY6937	h ^{po}	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	YGRC
MM76	h ⁺	<i>pom1-GFP::KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Stock laboratorio
AN-CC35	h ⁺	<i>pom1-GFP::KanMX6 cpc2::KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo

Tabla MM.1.- Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* empleadas en este trabajo (continuación)

1.2.- Cepas de *Escherichia coli*

La cepa DH5 α (Hanahan, 1983) se empleó como hospedadora con el fin de mantener y amplificar los diferentes plásmidos utilizados. Su genotipo es el siguiente:

supE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

2.- PLÁSMIDOS

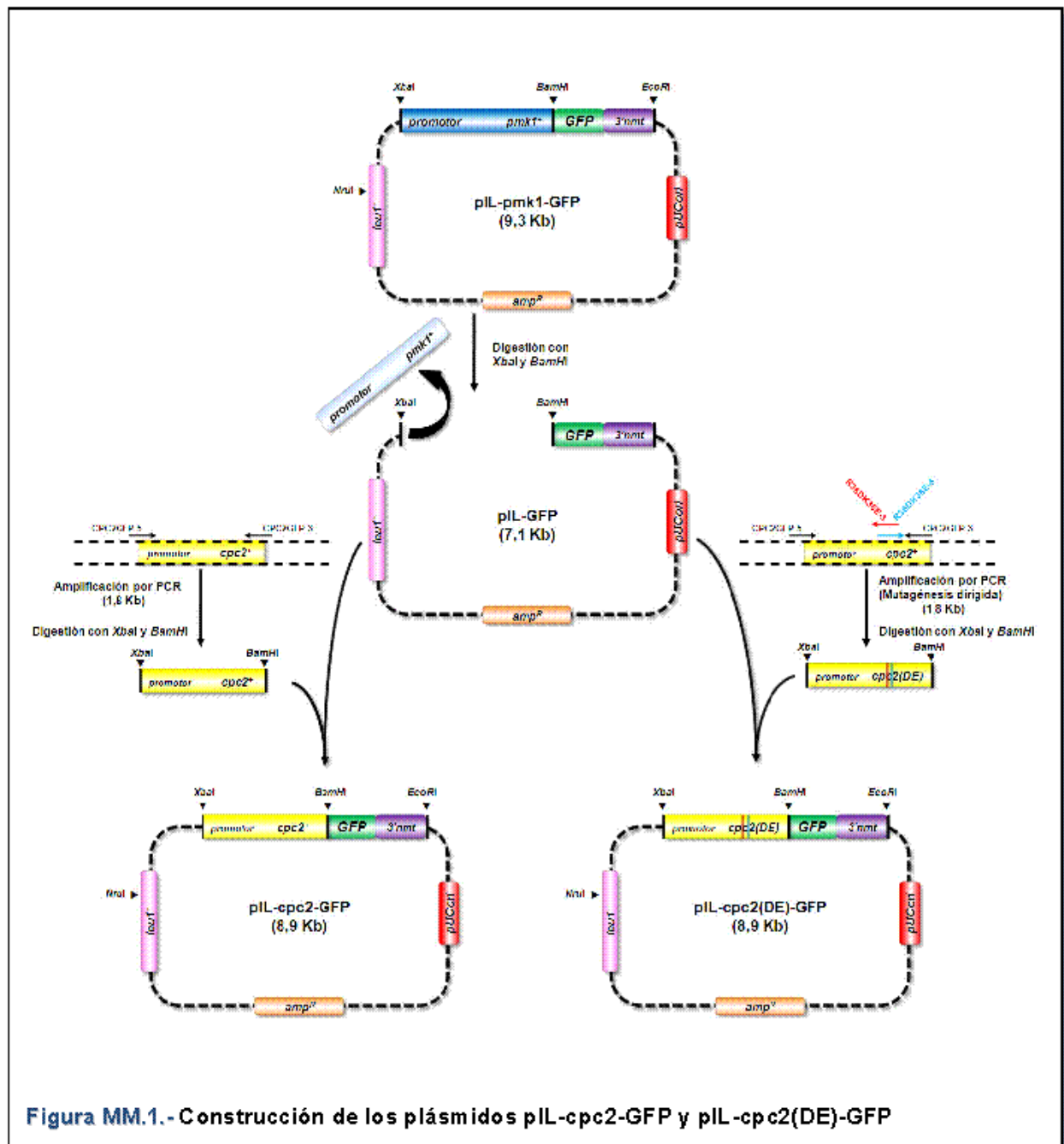
➤ **pREP3X (Forsburg, 1993)**

Deriva de la serie de vectores de expresión pREP/RIP (Maundrell, 1990). Teniendo como base el plásmido pUC119, se caracteriza por poseer un codón de iniciación (ATG) en el extremo 5' del fragmento portador de sitios múltiples de clonación. Aguas arriba de dicha región se localiza la región promotora (*nmt1*) regulada negativamente por la presencia de tiamina en el medio de cultivo (Maundrell, 1990) en su versión de expresión 3X. Además, posee un fragmento de parada de la transcripción (*Stop*) en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple. También presenta una secuencia autorreplicativa de bajo número de copias (*ars1*), y un marcador capaz de complementar distintas auxotrofías en las cepas receptoras de *S. pombe* (en nuestro caso *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae* que complementa estirpes *leu1-32*).

En este trabajo se empleó este plásmido para clonar *cpc2*⁺, obteniendo así el plásmido pREP-cpc2. Éste se introdujo por transformación en una cepa Δ *cpc2*, seleccionando aquellas colonias capaces de crecer en EMM2 sin leucina. Las condiciones empleadas para la sobre-expresión se describen en el Apartado 4.2.- Condiciones de cultivo para *S. pombe*.

➤ **pIL-cpc2-GFP y pIL-cpc2(DE)-GFP (este trabajo)**

Construido a partir del vector pIL-pmk1-GFP (Madrid *et al.*, 2006), el plásmido pIL-cpc2-GFP se diseñó para introducir una versión de *cpc2* con su propio promotor y fusionada en su extremo carboxilo al epítopo GFP ("Green Fluorescent Protein"). Para su construcción (Figura MM.1) se amplificó por PCR el fragmento de ADN correspondiente a la ORF de *cpc2*⁺ y su promotor, utilizando como molde de la reacción ADN genómico procedente de la cepa silvestre L972 (*ver Tabla MM.1*). Se emplearon los oligonucleótidos CPC2GFP-5 (que hibrida desde la posición -585 a la -567, aguas arriba del codón de iniciación de *cpc2*⁺, y que contiene un sitio de corte *Xba*I) y CPC2GFP-3 (que hibrida en el extremo 3' de *cpc2*⁺ y que incorpora un sitio de corte *Bam*HI inmediatamente aguas arriba del codón de terminación). El fragmento obtenido (1,4 Kb) fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I y se clonó en el vector pIL-



pmk1-GFP tras ser digerido previamente con las mismas endonucleasas. El vector resultante (pIL-cpc2-GFP) es un plásmido que se integra en el genoma de la levadura por recombinación homóloga en el locus de *leu1-32* (previa digestión con el enzima *NruI*) y que expresa la proteína de fusión Cpc2-GFP. De manera similar, se construyó el plásmido pIL-cpc2(DE)-GFP con el objetivo de introducir una versión mutagenizada de *cpc2* (ver Apartado 13.1.h Mutagénesis dirigida).

3.- MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo que se exponen a continuación, a menos que se especifique lo contrario, se indica en gramos de compuesto por 100 ml de medio de cultivo. Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2%.

3.1.- Medios empleados para el crecimiento y selección de *E. coli*

➤ **Medio LB** (según Miller, 1972). Su composición es: triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1%. Fue empleado para el crecimiento rutinario de *E. coli*.

➤ **Medio LBA.** Este medio se utilizó para la selección de estirpes resistentes a ampicilina. Su composición es similar al medio LB más 100 µg/ml de ampicilina que se suplementó después de esterilizar el medio en el autoclave.

➤ **Medio SOC** (Sambrook *et al.*, 1998). Su composición es: triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM. Fue empleado para la recuperación celular después de la electroporación.

3.2.- Medios empleados para el crecimiento, selección y mantenimiento de *S. pombe*

➤ **Medio YES** ("Yeast Extract with Supplements"). Medio rico empleado rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Su composición es: glucosa 2% y extracto de levadura 0,6%. El medio se suplementa con leucina, histidina, adenina y uracilo (100 mg/l) en aquellos casos en los que la cepa lo requiere. Este medio suplementado con geneticina (G-418, *Invitrogen*) o higromicina B (*Roche*) se utilizó para la selección de cepas transformadas con el casete de resistencia a uno u otro antibiótico. En ambos casos se empleó una concentración final de 200 µg/ml de antibiótico en el medio.

➤ **Medio YES 7% Glucosa.** Se utilizó para el crecimiento de *S. pombe* con el objetivo de someter a las células a estrés por privación de glucosa y en los ensayos con diferentes fuentes de carbono. Su composición es: glucosa 7% y extracto de levadura 0,6%. El medio se suplementa con leucina, histidina, adenina y uracilo (100 mg/l) en aquellos casos en los que la cepa lo requiere.

➤ **Medio YEG.** Se empleó para la inducción del ayuno de glucosa en *S. pombe* y el crecimiento vegetativo con glicerol como fuente de carbono. Su composición es: glicerol 3% y extracto de levadura 0,6%. El medio se suplementa con leucina, histidina, adenina y uracilo (100 mg/l) en aquellos casos en los que la cepa lo requiere.

➤ **Medio Mínimo de Edimburgo (EMM2)** (Mitchinson, 1970; Nurse, 1975). Se utilizó como medio de selección en los experimentos de transformación. También se utilizó para el crecimiento rutinario de cepas transformadas con plásmidos y aquellas que expresan genes bajo el control del promotor *nmt1*⁺. En este último caso, el medio se suplementó con tiamina (concentración final de 10-15 μ M) para reprimir la expresión génica. La composición del medio es la siguiente: ftalato monopotásico 0,3%, Na₂HPO₄ 0,22%, NH₄Cl 0,5%, glucosa 2%.

Esta disolución se esteriliza en el autoclave y posteriormente se le adicionan diferentes cantidades de los stocks de sales, minerales y vitaminas, que han sido esterilizados previamente por filtración (Tabla MM.2):

Stock de Sales (50X)		Stock de Minerales (10000X)		Stock de Vitaminas (1000X)	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,26 M	H ₃ BO ₃	81 mM	Ácido Nicotínico	81,2 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5 mM	MnSO ₄	23,7 mM	Inositol	55,5 mM
KCl	0,67 M	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	14 mM	Biotina	40,8 mM
Na ₂ SO ₄	14 mM	FeCl ₃ ·6H ₂ O	7,4 mM	Ácido Pantoténico	4,2 mM
		MoO ₄ ·2H ₂ O	2,5 mM		
		KI	6 mM		
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,6 mM		
		Ácido Cítrico	47,6 mM		

Tabla MM.2.- Composición de los stocks utilizados de sales, minerales y vitaminas.

El medio se suplementa con leucina, histidina, adenina y uracilo (100 mg/l) en aquellos casos en los que la cepa lo requiere.

➤ **Medio Mínimo de Edimburgo sin Nitrógeno (EMM2-N).** Se utilizó para inducir el ayuno de nitrógeno en *S. pombe*. Su composición es similar al EMM2 con la excepción de que no contiene fuente de nitrógeno (NH₄Cl).

➤ **Medio Mínimo de Edimburgo con Glutamato (EMMG).** Se empleó para el crecimiento vegetativo de *S. pombe* en los ensayos con diferentes fuentes de nitrógeno. Su

composición es similar al medio EMM2 sustituyendo la fuente de nitrógeno NH_4Cl por glutamato 10 mM.

➤ **Medio Mínimo de Edimburgo con Prolina (EMMP).** Se utilizó para el crecimiento vegetativo de *S. pombe* en los ensayos con diferentes fuentes de nitrógeno. Su composición es similar al EMM2 sustituyendo la fuente de nitrógeno NH_4Cl por L-prolina 10 mM.

➤ **Medio SPA.** Se utilizó para inducir la conjugación y esporulación en *S. pombe*. Su composición es: glucosa 1%, K_2HPO_4 0,1%, CaCl_2 a partir de una solución concentrada 50X (0,074%) y agar 3%. El medio se suplementa con vitaminas (en la misma cantidad que el medio EMM2) y leucina, histidina, adenina y uracilo (100 mg/l) en aquellos casos en los que la cepa lo requiere.

4.- CONDICIONES DE CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS. ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO, RECUENTO CELULAR Y TAMAÑO EN DIVISIÓN

4.1.- Condiciones de cultivo para *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se incubaron en medio líquido LB con antibióticos mediante agitación orbital (250 r.p.m.) a una temperatura de 37°C. Para el crecimiento en medios sólidos las células se incubaron en estufas a 37°C.

4.2.- Condiciones de cultivo para *S. pombe*

En general, el crecimiento de cepas en cultivo líquido se llevó a cabo en el medio indicado en matraces Erlenmeyer a 28°C empleando incubadores con agitación orbital (180 r.p.m.). En el caso de estirpes portadoras de alelos termosensibles (*cdc25-22*, *cdc10-129*, *wee1-50*) las células se cultivaron inicialmente a 25°C (temperatura permisiva).

Para el cultivo en medios sólidos se incubaron las células en estufas a la temperatura deseada en cada caso, que osciló entre 25 y 37 °C. En los experimentos realizados con células en fase exponencial de crecimiento se usaron cultivos con valores de densidad óptica a 600 nm (D.O._{600}) comprendidos entre 0,5 y 1,0.

Los experimentos de sobre-expresión génica bajo el control de diferentes versiones del promotor *nmt1* se llevaron a cabo cultivando las células en EMM2 líquido con tiamina (10-15

µM). Para eliminar la tiamina residual del medio de cultivo, se recogieron las células por centrifugación y se lavaron tres veces en EMM2 sin tiamina. Finalmente, se resuspendieron las células en EMM2 sin tiamina, incubando durante 16-18 horas en condiciones de desrepresión.

4.3.- Estimación del crecimiento, recuento celular y tamaño en división

El seguimiento del crecimiento de los microorganismos en medio líquido se realizó por turbidimetría, midiendo la densidad óptica de los cultivos a 600 nm (D.O.₆₀₀) en un equipo Ultrospec 2100 (*Amersham Biosciences*). En el caso de valores directos superiores a 0,3 se procedió a diluir la muestra y posteriormente a multiplicar la nueva medida por el correspondiente factor de dilución.

El recuento de células totales de *S. pombe* a diferentes tiempos se llevó a cabo mediante contaje microscópico directo en un hemocitómetro Neubauer. La concentración celular de la suspensión original se expresó como número de células por mililitro (N) según la fórmula $N = 2.5 \times 10^5 \times M \times D$, donde M es la media del número de microorganismos determinado en los recuentos efectuados por cuadrícula de la cámara, y D es el factor de dilución.

Para analizar el tamaño en división, las células se cultivaron en medio YES y EMM2 a 28°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ máxima de 0,5. En el caso de estirpes portadoras de los alelos termosensibles *cdc25-22* y *cdc10-129*, las células se cultivaron a 25°C. Las cepas que portan el alelo *wee1-50* se cultivaron a 25°C y posteriormente se transfirieron a 34°C durante 4 horas para poner de manifiesto el fenotipo *wee*. Alícuotas de los cultivos se tiñeron con blanco de calcoflúor y se observaron en un microscopio Leica DM4000B (ver Apartado 11.- Técnicas microscópicas). Se midieron un número mínimo de 200 células septadas ($n \geq 200$) para cada cepa y los tamaños, en micras (µm), se muestran como la media aritmética ± el error estándar.

5.- PURIFICACIÓN DE ASCOSPORAS DE *S. pombe*

Las ascosporas de *S. pombe* se aislaron y purificaron siguiendo el método descrito por Kelly *et al.* (1993). Este método se basa en la utilización del enzima glusulasa (*Sigma*), capaz de digerir las paredes de células vegetativas y ascas induciendo su lisis osmótica, pero que no ataca a las paredes de las ascosporas ni afecta a su capacidad germinativa. En todos los casos se partió de 20-30 ml de cultivo esporulado, cuyo contenido celular se resuspendió en 2 ml de solución enzimática de glusulasa al 2% en tampón acético/acetato pH 5. Las mezclas se incubaron a continuación con agitación orbital (150 r.p.m.) a 25°C durante 12-14 horas. Una

vez finalizado el tratamiento enzimático y tras varios lavados con glicerol al 10%, las esporas se resuspendieron en agua estéril, y se sembraron en placas con medio EMM2 con el fin de inducir la germinación de las esporas aisladas.

6.- TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN

➤ **Transformación de *E. coli***

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo se transformaron por electroporación con un equipo *Eppendorf Electroporator 2510*, utilizando el protocolo proporcionado por la casa comercial. En todos los casos el marcador de selección de los transformantes fue la resistencia a ampicilina. Después de someter a las células a un pulso de corriente, se recuperaron en medio SOC durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente se recogieron por centrifugación y se sembraron en placas de LBA (medio LB más ampicilina).

➤ **Transformación de *S. pombe***

La transformación de *S. pombe* se realizó según el método descrito por Moreno *et al.* (1991) con ligeras modificaciones. Se inoculó una colonia de la cepa *S. pombe* a transformar en 10 ml de medio YES y se cultivó a 28°C hasta alcanzar valores de D.O.₆₀₀ comprendidos entre 0,8 y 1,2. Las células se recogieron por centrifugación a 1800 r.p.m. durante 4 minutos, se lavaron y se resuspendieron, primero con 5 ml de agua bidestilada estéril y a continuación con 5 ml de tampón AcLi/TE (acetato de litio 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,6 y EDTA 1 mM). Finalmente las células se resuspendieron en 100 µl de AcLi/TE y se añadieron 20 µg de ADN de salmón (10 mg/ml) previamente hervido y 10 µl del ADN a transformar (plásmidos o productos de PCR). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 260 µl de AcLi/TE/PEG4000 40% y se incubó durante 40 minutos a 30°C. Después de este tiempo, se añadieron 43 µl de DMSO y las alícuotas se transfirieron a un baño a 42°C, 5 minutos. A continuación las células se recogieron por centrifugación, se lavaron, se resuspendieron en 500 µl de agua bidestilada estéril y finalmente se sembraron en placas de medio EMM2 selectivo.

En las transformaciones en las que la selección se realizó por resistencia a kanamicina o higromicina B, se procedió de manera similar, sembrando las células en placas de medio YES. Se incubaron 24 horas y se replicaron en medio YES con geneticina (g418) o higromicina B, con una concentración de 200 µg/ml de antibiótico. En todos los casos las placas se incubaron durante 4-5 días a 28°C.

7.- TRATAMIENTOS DE ESTRÉS

Las cepas se cultivaron en medio YES o EMM2 hasta fase exponencial temprana ($D.O_{600}=0,6-1$). A continuación se dividieron en alícuotas idénticas, que fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

➤ Choque hiperosmótico

Realizamos tratamientos de choque osmótico salino adicionando al cultivo KCl hasta una concentración final de 0,6 M.

➤ Choque térmico

Las células de cultivos en medio YES a 28°C se recogieron por filtración, y se resuspendieron en el mismo volumen de medio precalentado a 40°C, incubándose a esta temperatura durante la duración del tratamiento.

➤ Choque oxidativo

Los tratamientos de choque oxidativo se realizaron añadiendo distintos volúmenes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de una solución stock al 30% (p/p) hasta alcanzar concentraciones en el medio que oscilaron entre 1 y 5 mM. También se emplearon compuestos pro-oxidantes como el di-etil-maleato (DEM) 4 mM,

➤ Estrés nutricional

En el caso del ayuno de glucosa, las células se cultivaron en medio YES 7% glucosa hasta fase exponencial temprana ($D.O_{600}=0,5-0,6$). Posteriormente se recogieron por filtración a través de un filtro de 0,45 μm . A continuación, se lavaron 2 veces con medio YEG (glicerol en lugar de glucosa) y finalmente se transfirieron al mismo volumen de este medio para inducir el ayuno de glucosa. Se recogieron alícuotas del cultivo a distintos tiempos.

De manera similar, para el ayuno de nitrógeno, las células se cultivaron en EMM2, se filtraron, se lavaron 2 veces con medio EMM2-N (sin fuente de nitrógeno) y se transfirieron al mismo volumen de este medio. Esta estrategia fue también empleada en los ensayos de cambio de la fuente de nitrógeno o de carbono.

En todos los casos los cultivos se incubaron manteniendo simultáneamente una alícuota no tratada como control.

8.- ENSAYOS DE VIABILIDAD

➤ Viabilidad por siembra en placa

El efecto provocado por las distintas condiciones de estrés sobre el nivel de supervivencia celular se evaluó mediante un análisis comparativo de la viabilidad de los diferentes mutantes en comparación con una cepa control. Para esto se tomó una alícuota de 1 ml de cada uno de los cultivos celulares objeto de estudio en fase exponencial ($D.O_{600} = 0,6$). Una vez estimado el número de células por mililitro, se realizaron diferentes diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4}). De cada dilución se tomaron 200 μ l que se extendieron sobre placas Petri conteniendo medio YES y empleando un asa de Drigalski. El recuento del número de unidades formadoras de colonias por mililitro se efectuó tras la incubación a 28°C durante 5 días. Se emplearon al menos dos placas por dilución y el número de colonias contadas osciló entre 30 y 300. Finalmente, se calcularon los valores medios de los datos obtenidos y el porcentaje de supervivencia se refirió a una muestra sin tratar (100% de viabilidad).

➤ Diluciones seriadas en gota

Alternativamente, la viabilidad de las estirpes mutantes frente a distintos agentes estresantes (KCl, H_2O_2 , $MgCl_2$, FK506, caspofungina...) se realizó mediante la técnica de las diluciones seriadas en gota. Para ello se tomó una alícuota de cada cultivo en fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600} = 0,6$) y se determinó el número de células por mililitro. Posteriormente se ajustó la concentración celular de dicha alícuota a 10^7 células/ml. A partir de la misma se realizaron diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 , y se depositaron gotas de 10 μ l de cada dilución sobre placas Petri con los medios adecuados (por duplicado). Excepto que se especifique lo contrario, los resultados se registraron tras la incubación a 28°C durante 3 días.

9.- ENSAYO DE SENSIBILIDAD A β -GLUCANASAS

La resistencia de la pared celular de diferentes estirpes mutantes frente a la digestión con β -glucanasas se analizó según el método descrito por Loewith *et al.* (2000), con ligeras modificaciones. Las células se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial temprana ($D.O_{600} = 0,6$), se recogieron por centrifugación y se lavaron con el siguiente tampón: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM. A continuación, se incubaron a 30°C con agitación vigorosa en el mismo tampón al que se le añadió zimoliasa 20T (*Seikagaku Corporation*) a una concentración final de 100 μ g/ml. Paralelamente se mantuvieron los cultivos

sin tratar que se utilizaron como control. Se recogieron alícuotas cada 15 minutos, y se analizó la lisis celular midiendo el descenso de la D.O.₆₀₀.

10.- SINCRONIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

En el análisis de la progresión del ciclo celular se emplearon mutantes portadores de los alelos termosensibles *cdc25-22* o *cdc10-129*. Para su sincronización, las células se cultivaron en medio YES hasta una D.O.₆₀₀ próxima a 0,2-0,3 a 25°C (temperatura permisiva). A continuación, se incubaron a 37°C durante 3,5 - 4 horas (temperatura restrictiva) y al cabo de ese tiempo se transfirieron de nuevo a 25°C para permitir el reinicio sincronizado del crecimiento. A los tiempos indicados en cada caso, se tomaron alícuotas de los cultivos para preparar las células para ensayos de unión a cromatina (ver Apartado 10.2- Ensayos de unión a cromatina *in situ*), citometría (ver Apartado 10.1.- Citometría de flujo), obtención de muestras de proteína, y observación microscópica (ver Apartado 13.- Técnicas microscópicas). En este último caso, se realizaron preparaciones en fresco o se fijaron las células con formaldehído a una concentración final de 3,7%. La visualización y recuento de núcleos celulares y septos permitió establecer la etapa del ciclo en la que se encontraba el cultivo.

10.1.- Citometría de flujo

Los experimentos de citometría de flujo fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Pilar Pérez (Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca) siguiendo el protocolo descrito por Sazer y Sherwood (1990). Tras sincronizar los cultivos de las cepas 326 (*cdc10-129*, control) y AN-CC10 (*cdc10-129 Δcpc2*), se recogieron 10^7 células por centrifugación a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y se resuspendieron en 1 ml de etanol 70% frío. Posteriormente, 0,3 ml ($2-3 \times 10^6$ células) se lavaron con 3 ml de citrato sódico 50 mM y tras centrifugar (2000 r.p.m., 5 minutos) las células se mezclaron con 0,5 ml de citrato sódico 50 mM conteniendo RNasa A 0,1 mg/ml. Después de incubar a 37°C durante 2 horas, se procedió a teñir con ioduro de propidio, añadiendo 4 µg/ml. Las células se analizaron empleando un citómetro *Becton Dickinson FACSort* y el software asociado *CellQuest*.

10.2.- Ensayos de unión a cromatina *in situ*

El análisis de la transición G₁/S del ciclo celular por ensayos de unión a cromatina se realizó estudiando la localización de la proteína Mcm4-GFP, según el protocolo descrito por Kearsey *et al.* (2000) con ligeras modificaciones. Se añadieron 0,01 volúmenes de NaN₃ al 10% a 20 ml (10⁸ células) de los cultivos control (AN-CC21, *cdc10-129 cdc21(mcm4)-GFP*) y mutante (AN-CC22, *cdc10-129 cdc21(mcm4)-GFP Δcpc2*) sincronizados en la fase G₁ del ciclo celular (ver Apartado 10.- Sincronización y estudio de la progresión del ciclo celular). Las células recogidas por centrifugación (3200 r.p.m. durante un minuto) se lavaron en tampón ZM (citrato sódico 50 mM pH 5,6, sorbitol 1,2 M, acetato magnésico 0,5 mM y DTT 10 mM) y se resuspendieron en 500 µl del mismo tampón con 2 mg/ml de zimoliasa. Posteriormente, se incubaron a 32°C hasta permeabilizar la pared (10 minutos) y se añadieron 3 volúmenes del tampón STOP frío (MES 0,1 M pH 6,4, sorbitol 1,2 M, EDTA 1 mM y acetato magnésico 0,5 mM). A continuación, las células se centrifugaron a 1800 r.p.m. durante dos minutos y se lavaron dos veces con el mismo tampón. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron con 1 ml de tampón EB (PIPES-KOH 20 mM pH 6,8, sorbitol 0,4 M, acetato magnésico 2 mM y acetato potásico 150 mM) con 0,001 volumen de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Sigma*). La suspensión celular se dividió en dos partes: una mitad quedó sin tratar (control), y a la otra se añadieron 0,02 volúmenes de Tritón X-100 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado ese tiempo, las células se centrifugaron dos minutos a 1800 r.p.m. y se resuspendieron en metanol frío.

Finalmente las células se lavaron en tampón TBS con CaCl₂ 1 mM y se hicieron preparaciones para su observación al microscopio de fluorescencia, según se describe en el Apartado 11.- Técnicas microscópicas. Se analizaron un mínimo de 200 células por muestra para establecer en porcentaje el número de células con Mcm4-GFP unida de forma estable a la cromatina.

11.- TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

➤ Microscopía de contraste de fases

La observación directa de células de distintos cultivos de *S. pombe* se realizó mediante preparaciones en fresco y su observación empleando un microscopio Leica DM4000B.

➤ Microscopía de fluorescencia

Las observaciones se realizaron mediante un sistema de epifluorescencia por lámpara de mercurio de 100W en un microscopio Leica DM4000B acoplado a una cámara Leica DC 300F, y conectado al sistema informático de análisis de imagen IM50. El tratamiento de las imágenes capturadas se realizó con el programa Adobe Photoshop (*Adobe Systems*).

Para los estudios de localización subcelular de las proteínas de fusión Pap1-GFP, Cpc2-GFP y Cpc2(DE)-GFP las células se cultivaron en medio rico YES o EMM2 hasta una D.O.₆₀₀ de 0,2-0,3, y a continuación se sometieron a los tratamientos indicados en cada caso, o se dejaron sin tratar. Las muestras se analizaron bien *in vivo*, o tras su fijación con formaldehído a una concentración final de 3,7%. Para la observación de los núcleos las muestras se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los septos y la pared celular se visualizaron tras la tinción con el fluorocromo blanco de calcoflúor.

12.- FRACCIONAMIENTO DE POLISOMAS

Los experimentos de fraccionamiento de polisomas se realizaron según el método descrito por Shor y McLeod (2003) con ligeras modificaciones, y gracias a la inestimable colaboración del Prof. Javier Campoy (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Universidad de Murcia). Las células de las cepas control y mutante se cultivaron en 100 ml de medio YES hasta una D.O.₆₀₀ = 0,5, se trataron con 100 µg/ml de cicloheximida durante cinco minutos y se recogieron por centrifugación. Una vez lavadas con Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 30 mM, se lisaron con el mismo tampón suplementado con DTT 1 mM, en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Sigma-Aldrich*) y 0,5 U/µl de un inhibidor específico de RNasas (*RNasin, Ambion, Austin, TX*). Para la obtención de los extractos celulares se emplearon bolas de vidrio estériles y el sistema Fast-Prep FP120 (*Bio 101, Vista, CA*). La fracción insoluble de los extractos se descartó tras una centrifugación a 20000 g durante 30 minutos a 4°C.

Para realizar el fraccionamiento de los polisomas se depositaron 20 unidades (D.O.₂₆₀) de extracto total en tubos que contienen 11 ml de un gradiente de sacarosa del 7 al 47% (p/v) preparado en tampón Tris-HCl 15 mM pH 7,4, NH₄Cl 140 mM, MgOAc-4H₂O 8 mM, 100 µg/ml cicloheximida, e inhibidores. Los gradientes se sometieron a ultracentrifugación en un rotor SW41Ti (*Beckman Instruments, Fullerton, CA*) durante 3,5 horas a 40000 r.p.m. y 4°C. A

continuación, se recogieron fracciones de 600 μ l (Colector *Amersham – Biosciences Frac-100*) y la distribución de las subunidades ribosomales 40S, 60S, monosomas (80S) y polirribosomas a lo largo del gradiente se determinó midiendo la absorbancia a 254 nm en un equipo Nanodrop 1000 (*Thermo Scientific*). Finalmente se recogieron alícuotas de 50 μ l de cada fracción y se analizaron por *Western blot* para detectar las proteínas Cpc2-GFP y L7 (proteína ribosomal empleada como control).

13.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

13.1.- Obtención y manipulación de muestras de ADN

13.1.a) Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

El ADN plasmídico de *E. coli* se aisló siguiendo las instrucciones de un sistema comercial de purificación (*High Pure Plasmid Isolation Kit*) distribuido por *Roche*.

13.1.b) Aislamiento de ADN genómico de *S. pombe*

La técnica empleada incluye la obtención de protoplastos a partir de células vegetativas y la posterior extracción de los ácidos nucleicos con solventes orgánicos. Las levaduras se recogieron por centrifugación (5 minutos a 5000 r.p.m.) a partir de cultivos de 100 ml de medio líquido YES crecidos hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento. El precipitado celular se resuspendió en 5 ml de tampón citrato-fosfato 50 mM pH 5,6 conteniendo sorbitol 1,2 M, EDTA 40 mM pH 8,0 y 1-3 mg/ml de zimoliasa 20T. Esta suspensión se incubó a 37°C durante 30-60 minutos, hasta la obtención de protoplastos. Los protoplastos se recogieron mediante centrifugación a baja velocidad (3000 r.p.m., 5 minutos) y se resuspendieron en 15 ml de tampón T₅₀E₅ (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 5 mM pH 8,0) y 1,5 ml de SDS 10%, incubándose durante 20 minutos a 65°C. Posteriormente se añadieron 5 ml de acetato potásico 5 M, y el lisado obtenido se enfrió en hielo por un tiempo mínimo de 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, los lisados se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 10 minutos, y los ácidos nucleicos totales presentes en los sobrenadantes se precipitaron con un volumen igual de isopropanol frío (-20°C). Los ácidos nucleicos totales se lavaron con etanol a 70% y se resuspendieron en 3 ml de tampón T₅₀E₅ suplementado con 20 μ g/ml de RNAasa. Esta mezcla se incubó durante dos horas a 37°C. Al cabo de este tiempo, se realizaron dos extracciones con una mezcla de fenol y cloroformo con alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa resultante se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M. El precipitado de ADN total tras centrifugar, se lavó con etanol al 70%, se

dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 500 µl de tampón TE pH 7,5, guardándose a 4°C hasta su utilización.

13.1.c) Determinación de la concentración de ADN total

Las soluciones de ADN se cuantificaron empleando un equipo Nanodrop 100 (*Thermo Scientific*), que mide la absorbancia de la muestra a 260 nm y calcula automáticamente su concentración según la siguiente relación: una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN. Se utilizó la relación de absorbancia 260/280 para estimar el grado de pureza de la preparación (1,6 - 1,8 en el caso de ADN puro).

13.1.d) Digestión del ADN con enzimas de restricción

Se realizó siguiendo las recomendaciones especificadas por los suministradores de las enzimas de restricción (*Roche* y *Fermentas*) y las indicaciones generales descritas por Sambrook *et al.* (1998).

13.1.e) Electroforesis de ADN en geles de agarosa y purificación de ADN a partir de geles

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa preparados a la concentración adecuada (entre 0,8 y 1,5%) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Como marcadores de peso molecular se emplearon los fragmentos de DNA genómico del fago λ resultantes tras su digestión con *HindIII* (*Fermentas*). Las electroforesis se desarrollaron a voltaje constante entre 65 y 90 V. El tampón usado fue TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) y en los geles se incluyó bromuro de etidio (1,0 µg/ml) para visualizar el ADN tras la iluminación con luz ultravioleta.

El aislamiento y purificación de fragmentos específicos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó recortando bloques de agarosa que contenían los fragmentos de ADN de interés, y procesando las muestras con el sistema comercial *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*). Para la purificación de productos de PCR se utilizó el mismo producto siguiendo las recomendaciones específicas del fabricante.

13.1.f) Clonación de fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción

Los experimentos de clonación se realizaron mezclando cantidades variables de ADN tanto del inserto como de vector plasmídico (dependiendo de cada caso), siendo la suma total de ambos no superior a 300 ng en un volumen final de 20 µl. Para llevar a cabo las ligaciones se utilizó un kit comercial (*T4 DNA Ligase, Promega Corporation*). Las mezclas de ligación se

incubaron a 16°C durante 12-18 horas. A continuación, la mezcla de ligación se dializó con membranas de 0,022 µm de tamaño de poro. Se utilizó 1 µl de esta preparación para transformar mediante electroporación 40 µl de células competentes de la estirpe de *E. coli* utilizada en este trabajo.

13.1.g) Reacción de amplificación de ADN (PCR)

Las reacciones de amplificación de ADN por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) se realizaron empleando un termociclador de la casa comercial *Eppendorf* (modelo *Mastercycler Personal*). Cada reacción de 50 µl contenía: 50 pmoles de cada oligonucleótido sintético (*Roche*), 10 ng de ADN molde, 20 pmoles de una mezcla de desoxirribonucleótidos, 1,5 Unidades del enzima *Expand High Fidelity Polymerase* (*Roche*) y MgCl₂ 1,5 mM (añadido al tampón de reacción suministrado en el kit).

Las condiciones de amplificación variaron según el tamaño del ADN a amplificar y la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos. El primer paso fue una desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido de un número variable de ciclos (25 a 35), cada uno de ellos con un paso de desnaturalización (95°C, 1 minuto), hibridación (50-58°C, 30-90 segundos) y polimerización (72°C, 1-3 minutos). Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron, en caso necesario, a partir de geles de agarosa.

Los plásmidos utilizados como molde para la obtención de deleciones y fusiones génicas se indican en la Tabla MM.3. Los oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones de amplificación junto con su finalidad se muestran en la Tablas MM.4 a la MM.6.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	ORIGEN
pFA6a-KanMX6	Amplificación del casete de disrupción con el marcador de resistencia a kanamicina	J. Bähler, 1998
pFA6a-PhpMX6	Amplificación del casete de disrupción con el marcador de resistencia a higromicina B	J. Bähler, 1998
pFA6a-13Myc-KanMX6	Amplificación del casete para la fusión de proteínas con el epitopo 13-myc en el extremo carboxilo (contiene el marcador de resistencia a kanamicina)	J. Bähler, 1998
pFAa-GFP(S65T)-KanMX6	Amplificación del casete para la fusión de proteínas con el GFP en el extremo carboxilo (contiene el marcador de resistencia a kanamicina)	J. Bähler, 1998

Tabla MM.3.- Plásmidos empleados como molde de ADN en las reacciones de PCR.

NOMBRE	SECUENCIA	FINALIDAD
CPC2-5X	5' – TAT ATC TCG AGA TGC CAG AAC AAC TTG TGC TC 3'	pREP-cpc2
CPC2-3X	5' – TAT ATG GAT CCT TAC TTG GTA ACT TGC CAG AC 3'	

Tabla MM.4.- Oligonucleótidos empleados para la clonación en vectores de sobre-expresión.

NOMBRE	SECUENCIA	FINALIDAD
CPC2-5	5'– GTC ACA GTC CAT ATA GAA CAT TTT TTG AGC TAC CTA CAT CTC TCC TTC AAG ACA TCC CGA CCA GTC AAC ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA 3'	<i>cpc2::KanMX6</i>
CPC2-3	5' – TAA AGA AAA CGA TGC ACC CTA AAG CCA TTC ATC ATT ATC GTC TTA TGG GAC AAC AAT TAA AAT CTT ATT TGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC 3'	
PMPD-3	5' – ACC AAC TTA CAA CGG AAC TTG AAT AGA CAA AAT TTC CCT TTT TTT ATG GAT TTA TAA ATA ATT GGC ATT GGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC 3'	<i>pmp1::HygMX6</i>
PMPD-5	5' – AAG TCC TCA ACA AAT ATA GAA CGA AAA GAG TCT TCC TTA CAA CCG CTT CGA TCA AAA CTT CCT TTG AGA ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA 3'	

Tabla MM.5.- Oligonucleótidos empleados para la delección de los genes indicados.

NOMBRE	SECUENCIA	FINALIDAD
CPC2-F5	5' – GTC TCC TGA TGG CCA AAC TTT GTT CTC TGG CTG GAC TGA TAA TCT CAT TCG TGT CTG GCA AGT TAC CAA GCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA 3'	<i>cpc2- GFP::KanMX6</i>
CPC2-F3	5' – TAA AGA AAA CGA TCG ACC CTA AAG CCA TTC ATC ATT ATC GTC TTA TGG GAC AAC AAT TAA AAT CTT ATT TGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC 3'	
CTT1-F	5' – GAA GAA GAT GGA AGA AAA AGC CCC CAA GCC AAT TAA CAA GGG CGA ACC CCA TAT GTT CCA AGG AAG CTC ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA 3'	<i>ctt1- GFP::KanMX6</i>
CTT1-R	5' – ATT AAA ATA GTA GTC ATC CGA TAA ACC TAG CTG ACT CAA ATT TTT TAC AAA CTA ATT TCG CAT AAG CGC AGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC 3'	
PTC3-F5	5' – TGA AAC CGA TAT CGT AAA TTC TAA CAA AGA TGT TGC GGA TGA TCA TAA GGA GGC TGT GTC TGC AGC AGA TCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA 3'	<i>ptc3- 13myc::KanMX6</i>
PTC3-F3	5' – ATA ATG CTA ATT ACG AGG AAT ATT CCT AAA AGC AAG TTA CAT TGT GTA ATA TGC GTG AAG TAG GGA ATA AGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC 3'	

Tabla MM.6.- Oligonucleótidos empleados para la obtención de fusiones a diferentes epítotos.

13.1.h) Mutagénesis dirigida

Empleamos esencialmente el protocolo descrito por Higuchi *et al.* (1988) para obtener una versión de Cpc2 no unida al ribosoma. El gen *cpc2*⁺ se amplificó en dos fragmentos. El primero contenía el promotor hasta la región del gen a modificar, mientras que el segundo solapaba la zona a mutagenizar y se extendía hasta el extremo carboxilo. En una última reacción de PCR se mezclaron ambos fragmentos en cantidades equimoleculares (purificados previamente mediante electroforesis en gel de agarosa) junto a los oligonucleótidos externos no solapantes, y así obtener finalmente la versión completa de *cpc2*⁺ mutagenizada.

La presencia de los cambios deseados y la ausencia de mutaciones adicionales que pudieran haberse incorporado durante la amplificación se verificaron mediante secuenciación. La secuencia de los oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida se indica en la Tabla MM.7.

NOMBRE	SECUENCIA	FINALIDAD
CPC2GFP-5	5' – CCT TAT CTA GAC CAT ACT TTC ATA TAC GG 3'	Oligo externo 5'
CPC2GFP-3	5' – CCT TAG GAT CCC TCT TGG TAA CTT GCC AGA C 3'	Oligo externo 3'
R36DK38E-5	5' – CTT TCC GGT TCT GAT GAC GAG TCC ATC AT 3'	Mutación R36D y K38E
R36DK38E-3	5' – ATG ATG GAC TCG TCA TCA GAA CCG GAA AG 3'	

Tabla MM.7. - Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de mutagénesis dirigida de *cpc2*⁺. (Las bases modificadas se indican en negrita)

13.1.i) Secuenciación del ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo de forma automatizada utilizando un analizador de 4 capilares, modelo *ABI Prism 3130* de *Applied Biosystems* en el Servicio de Biología Molecular (SAI) de la Universidad de Murcia.

13.1.j) Comprobación de genotipos mediante PCR a partir de colonia

Se diseñaron oligonucleótidos que hibridaban en una posición específica de la secuencia del marcador introducido (generalmente el casete de resistencia a kanamicina, higromicina o uracilo) y en las secuencias adyacentes a la ORF del gen interrumpido. Los oligonucleótidos que se emplearon para la comprobación de las cepas generadas aparecen en la Tabla MM.8. Se prepararon tubos con reacciones de PCR y a cada uno se le añadió una colonia del correspondiente transformante. Las muestras se sometieron a las condiciones

estándar de amplificación descritas previamente. El producto obtenido se analizó en geles de agarosa.

NOMBRE	SECUENCIA	FINALIDAD
CPC2-CONF	5' – ATT CAG CCA CCC CAG CGA AGG 3'	Confirmación de cepas delecionadas en <i>cpc2</i> ⁺
HYG-CONF	5' – ACA TCT TCT TCT GGA GGC CG 3'	Comprobación de cepas que integren el casete de resistencia a higromicina B
KAN-COMP	5' – ACA GTT CTC ACA TCA CAT CCG 3'	Comprobación de cepas que integren el casete de resistencia a Kanamicina
PCK2-COMP	5' – GGC GGG TTT CAT TGA ATG TA 3'	Confirmación de cepas delecionadas en <i>pck2</i> ⁺
PMP1-COMP	5' – CCC AGA ACC AAA GAC TAG 3'	Confirmación de cepas delecionadas en <i>pmp1</i> ⁺
POM1-COMP	5' – GCA TGG TTG ACA CGT TGT AC 3'	Confirmación de cepas delecionadas en <i>pom1</i> ⁺
PYP1-CONF	5' – CTC TTG ATC ACG ACC ACT 3'	Confirmación de cepas delecionadas en <i>pyp1</i> ⁺
SPM1-CONF	5' – CTC TAC CAC AGA TAT ACT CGT TCA C 3'	Confirmación de cepas delecionadas en <i>pmk1</i> ⁺
STY1-CONF	5' – CCA TAG GCG GCG TTC CCA AC 3'	Confirmación de cepas delecionadas en <i>sty1</i> ⁺
URA-CONF-F	5' – TAC AGT GCC AGG CGA GGG TAT 3'	Comprobación de cepas delecionadas con el marcador <i>ura4</i>

Tabla MM.8.- Oligonucleótidos empleados para la comprobación de genotipos.

13.2.- Obtención y manipulación de muestras de ARN

13.2.a) Aislamiento del ARN total de *S. pombe*

El ARN total de las diferentes cepas de *S. pombe* se aisló según el método descrito por Moreno *et al.* (1991) con ligeras modificaciones. Para ello, las distintas estirpes celulares se cultivaron en medio YES hasta D.O.₆₀₀ = 0,6. Se tomaron alícuotas de 100 ml por centrifugación (2 minutos a 3000 r.p.m. y 4°C) de los cultivos sin tratar (y tratados con el agente estresante, en su caso, a los tiempos indicados). Se resuspendió el precipitado en 1 ml de tampón HE (HEPES 50 mM pH 7,9, EDTA 5 mM pH 8,0 y NaCl 100 mM) y se añadieron bolas de vidrio para lisar las células en un agitador vórtex durante 4 minutos, con intervalos alternativos de 1 minuto de agitación y de incubación en hielo. Tras la rotura, se pasó el sobrenadante a un tubo estéril con 1,5 ml de tampón HEPES (HEPES 200 mM pH 7,9, EDTA 10 mM, NaCl 200 mM,

SDS 2%) y 100 µg/ml de *proteínasa K*. Seguidamente, se incubó esta mezcla a 37°C y tras una hora se añadió 1 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Posteriormente, se añadió a la fase acuosa resultante 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Por último, se lavó el precipitado final con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 0,125 ml de agua bidestilada estéril. Estas preparaciones se almacenaron a -75°C.

13.2.b) Valoración de la concentración de ARN total

Al igual que en el caso del ADN total, las soluciones de ARN se cuantificaron empleando un equipo Nanodrop 100 (*Thermo Scientific*), calculando automáticamente la concentración según la siguiente relación: una unidad de absorbancia a 260 nm es equivalente a 40 µg/ml de ARN. Se utilizó la relación de absorbancia 260/280 para estimar el grado de pureza de la preparación (2,0 en el caso de ARN puro).

13.2.c) Análisis de la expresión génica mediante Northern blotting

I) Desnaturalización de ARN

Se llevó a cabo mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído, cuya composición fue la siguiente (para 150 ml): 1,8 g de agarosa, 133 ml de agua bidestilada estéril, 7,5 ml de 20x MOPS (MOPS 0,4 M pH 7,0, acetato sódico 160 mM y EDTA 20 mM pH 8,0) y 9 ml de formaldehído al 37% (v/v).

A cada 20 µg de ARN se añadieron 20 µl de formamida desionizada, 7,14 µl de formaldehído (37%), 2 µl de 20x MOPS, 0,43 µl de BPB y 1 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos. Una vez enfriada, se cargó en el gel de electroforesis y se desarrolló durante 2 horas a 85 voltios con recirculación del tampón de electroforesis (1X MOPS).

II) Transferencia del ARN a filtros

Antes de la transferencia, se lavó el gel durante 10 minutos en 10X SSC (a partir de una solución stock 20X: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M) para eliminar el formaldehído sobrante. Tras fotografiar el gel, el ARN se transfirió por capilaridad a un filtro de Nylon (*Hybond-XL*, *Amersham Biosciences*) mediante tampón 10X SSC. Una vez terminado el proceso se fijó el ARN retenido en la membrana por radiación ultravioleta.

III) Marcaje radiactivo de las sondas utilizadas e hibridación

Las sondas de ADN marcadas radiactivamente se utilizaron exclusivamente en experimentos de hibridación de ARN. Se amplificaron por PCR usando los oligonucleótidos indicados en la Tabla MM.9. El ADN purificado se marcó radiactivamente incorporando en la mezcla de reacción dCTP marcado con ^{32}P en la posición α (radiactividad específica >3000 Ci/mmol). Tanto para la reacción de marcaje como para la purificación de la sonda marcada se emplearon kits comerciales (*Amersham Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)* e

NOMBRE	SECUENCIA	FINALIDAD
A TF1-S5	5' – CTA GTA CCC TAA ATT GA 3'	1,7 Kpb del gen <i>aff1</i> *
A TF1-S3	5' – ATG TCC CCG TCT CCC GT 3'	
CDR1-5A	5' – GGG ACG TCT ATT TTG ATT GCC 3'	1,5 Kpb del gen <i>cdr1</i> *
CDR1-3A	5' – ATG GTG AAG CGA CAC AAA AAT 3'	
CDR2-5A	5' – GGA CGG ATT GTC GTT GAC GA 3'	1,2 Kpb del gen <i>cdr2</i> *
CDR2-3A	5' – AGC AGC ATC CAA CGG GC 3'	
CTT-5	5' – CGT CCC TGT TTA CAC 3'	1,5 Kpb del gen <i>ctt1</i> *
CTT-3	5' – GCT TCC TTG GAA CAT 3'	
GPX-5	5' – TTC TAC GAC TTG GCT 3'	0,4 Kpb del gen <i>gpx1</i> *
GPX-3	5' – ACA CTC TCG ATA TCG 3'	
LEU1-A	5' – TCG TCG TCT TAC CAG GAG 3'	1,0 Kpb del gen <i>leu1</i> *
LEU1-B	5' – CAA CAG CCT TAG TAA TAT 3'	
PYP1-5	5' – CAA TTG CTC CTT CGG GTT 3'	1 Kpb del gen <i>pyp1</i> *
PYP1-3	5' – CCG GGA AAT GAA CTT GAG 3'	
PYP2-5	5' – CCG AGA GCG TTT CTT GGA 3'	2,1 Kpb del gen <i>pyp2</i> *
PYP2-3	5' – AAG GGC TTG GAA GCC TGG 3'	
TPX1-5	5' – ATG AGT TTG CAA ATC GGT 3'	0,8 Kpb del gen <i>tpx1</i> *
TPX1-3	5' – CTA AGT GCT TGG AAA AGT ACT 3'	
TRR-5	5' – GTG ACT CAC AAC AAG 3'	0,9 Kpb del gen <i>trr1</i> *
TRR-3	5' – TAA TCG GTA TCT TCC 3'	
WEE1-5	5' – TCT CTC CAT TTG CAT CGG GC 3'	0,8 Kpb del gen <i>wee1</i> *
WEE1-3	5' – AGG AGG AGG ATC GAA CCT CA 3'	

Tabla MM.9.- Oligonucleótidos utilizados en la obtención de sondas para los estudios de expresión génica.

illustra™ MicroSpin G-50 Columns, GE Healthcare, respectivamente), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

IV) Hibridación

Los filtros con el ARN fijado se incubaron con 10 ml de solución de hibridación (*Amersham Rapid-hyb Buffer, GE Healthcare*) durante 1 hora a 65°C. A continuación, los filtros se hibridaron a 65°C durante 3 horas en la misma solución de hibridación a la que se añadió la sonda marcada radiactivamente y previamente desnaturalizada por calor. Al cabo de ese tiempo, los filtros se sometieron a los siguientes lavados: dos veces durante 10 minutos en 2X SSC, 0.1% SDS; y dos veces durante 20 minutos en 0.1 X SSC, 0.1% SDS a 65°C.

13.2.d) Autorradiografía y análisis densitométrico

Las señales presentes en los filtros procedentes de las hibridaciones tipo *Northern* se detectaron mediante exposición a -75°C sobre películas *Amersham Hyperfilm MP (GE Healthcare)* en casetes de autorradiografía con pantallas amplificadoras (*Dupont Conex L-plus*). Alternativamente, se expusieron las membranas en un equipo de detección automatizado (*Personal Molecular Imager FX, Bio-Rad*) del servicio de Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia (SAI), procediéndose a su correspondiente análisis densitométrico con el software asociado (*Quantity one 4.4, Bio-Rad*).

14.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

14.1.- Obtención de los extractos celulares y preparación de las muestras de proteína

Una vez realizados los tratamientos indicados, las células (50 ml de cultivo) se recogieron por centrifugación (4000 r.p.m) a 4°C, se lavaron una vez en tampón 1X PBS frío, y la masa celular obtenida se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para su procesamiento posterior. Los extractos celulares se obtuvieron, a menos que se indique lo contrario, en condiciones nativas. Para ello se resuspendieron las células en 1 ml del tampón de lisis: glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 0,1% junto con inhibidores específicos de proteasas y fosfatasa). La rotura celular se llevó a cabo por disrupción mecánica añadiendo 750 mg de bolas de vidrio (0,4 mm, Sigma) y empleando el sistema Fast-Prep FP120 (*Bio 101, Vista, CA*). Posteriormente se clarificaron los lisados mediante

centrifugación durante 15 minutos a 13000 r.p.m. A continuación, la concentración de proteína se determinó colorimétricamente utilizando el método de Bradford (1976), midiendo la A_{595} en un espectrofotómetro *Ultrospec 2100 Pro* (Amersham Biosciences). Una vez normalizada la concentración de los extractos celulares de *S. pombe* se tomaron cantidades equivalentes de los mismos y se les añadió 20 μ l de tampón de carga para geles poliacrilamida-SDS (Sambrook *et al.*, 1998).

Para la obtención de extractos en condiciones desnaturalizantes, las células se procesaron de manera similar empleando el tampón de lisis G (cloruro de guanidinio 8 M, Na_2HPO_4 0,1 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0), procediendo posteriormente a la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad como se describe en el siguiente apartado.

14.2.- Purificación de proteínas fusionadas a HA6H

En aquellos experimentos donde se emplean cepas con la proteína de interés fusionada al epítipo HA seguido de 6 histidinas consecutivas (HA6H), la fusión se purificó como se describe a continuación. Se incubaron cantidades equivalentes de extractos clarificados (obtenidos tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes), con 50 μ l de matriz de Ni^{2+} -NTA-agarosa (*Qiagen*) en una plataforma giratoria durante 2 horas a 4°C. Transcurrido dicho tiempo, la matriz se lavó 3 veces con tampón de lisis (glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 0,1% junto con inhibidores específicos de proteasas y fosfatasas), o Tris-HCl 50 mM pH 8,0 en el caso de condiciones desnaturalizantes. Finalmente, la matriz se resuspendió en 20 μ l de tampón de carga para geles de poliacrilamida-SDS (Sambrook *et al.*, 1998).

14.3.- Ensayos de inmunoprecipitación

Los experimentos de inmunoprecipitación de proteínas fusionadas al epítipo HA se realizaron incubando los extractos con 10 ng/ μ l del anticuerpo monoclonal anti-HA (12CA5, *Roche*) en una plataforma giratoria durante 2 horas a 4°C. A continuación se añadieron 50 μ l de proteína A-agarosa (*Roche*), y las muestras se incubaron durante al menos 3 horas en agitación a 4°C. Después de este tiempo, las matrices se lavaron dos veces durante 20 minutos con el tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato sódico 0,5% e inhibidores de proteasas), dos veces más con tampón de alta salinidad (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, NP-40 0,1%, desoxicolato sódico 0,05% e inhibidores de

proteasas) y finalmente una vez con tampón de baja salinidad (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NP-40 0,1%, desoxicolato sódico 0,05% e inhibidores de proteasas). Después de eliminar el sobrenadante, las muestras se resuspendieron en tampón de carga para geles de poliacrilamida-SDS (Sambrook *et al.*, 1998).

14.4.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas presentes en las diferentes muestras en función de su tamaño se realizó mediante la electroforesis de proteínas en geles verticales de poliacrilamida-SDS en condiciones desnaturalizantes según Laemmli (1970). Se prepararon los geles de poliacrilamida a partir de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida (30% y 0,8% respectivamente; *Protogel, National Diagnostics*). Se emplearon geles de una concentración del 6 al 12% para el gel de resolución, y del 5% para el concentrador. Se utilizaron dos equipos según el número de muestras a analizar: el sistema Mini Protean III para geles de 1,5 mm de grosor; y el sistema Protean II Xi, ambos proporcionados por *Bio-Rad*.

Las muestras, con el tampón de carga añadido, se incubaron a 100°C durante 10 minutos antes de cargar los geles. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante que varió según el sistema utilizado entre 125 V (Mini Protean) y 180 V (Protean II Xi). Como marcador de peso molecular se empleó el suministrado *Sigma (Prestained Molecular Weight Marker)* que proporciona un rango de resolución entre 26 y 180 kDa. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a un soporte sólido de nitrocelulosa para ser detectadas con anticuerpos específicos mediante la técnica de *Western* (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981).

14.5.- Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (*Western blotting*)

14.5.a) Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Amersham Hybond-ECL, GE Healthcare*) empleando un equipo *Semi-Dry Electroblothing Unit (Sigma)*, y tiras de papel de filtro Whatman 3MM Chr empapadas en tampones de ánodo (Tris-HCl 0,3 M y metanol 10% pH 10,4) y cátodo (Tris-HCl 25 mM, ácido aminocaproico 40 mM y metanol 20% pH 9,4). La transferencia se

realizó a temperatura ambiente y aplicando una intensidad de corriente constante de 225 mA durante 50 minutos.

14.5.b) Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa

Se utilizaron distintos tampones, concentraciones y anticuerpos secundarios (Tabla MM.10), dependiendo del anticuerpo primario empleado para la detección de la proteína de interés. Una vez finalizada la transferencia las membranas se sumergieron en una solución de bloqueo durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, la solución de bloqueo se eliminó mediante 3 lavados de 10 minutos con el tampón indicado, y las membranas se incubaron (mínimo 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C según experimento) en presencia del anticuerpo primario a la concentración indicada. Tras eliminar el exceso de anticuerpo con 3 lavados de 10 minutos, las membranas se incubaron durante 60 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante 3 lavados con el tampón adecuado.

Anticuerpo Primario (Organismo, Tipo) Casa comercial	Solución de bloqueo	Condiciones de uso	Anticuerpo Secundario (Organismo, Tipo) Casa comercial	Condiciones de uso
Anti-fosfo-p44/42 (Conejo, Policlona) Cell Signalling	TBST 0.1% + leche desnatada 5%	1.1000 en TBST 0.1% y BSA 5%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlona) GE Healthcare	1.1000 en TBST 0.1%+ leche desnatada 5%
Anti-HA (12CA5) (Ratón, Monoclona) Roche	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1.1000 (0.1 µg/ml) en PBST 0.05%	Anti-IgG ratón-HRP (Cabra, Policlona) Sigma	1.2000 en PBST 0.05%
Anti-cdc2 (Conejo, Policlona) Upstate	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1.1000 en PBST 0.05%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlona) GE Healthcare	1.2000 en PBST 0.05%
Anti-c-myc (9E10) (Ratón, Monoclona) Roche	PBST 0.05% + leche 5%	1.1000 (0.4 µg/ml) en PBST 0.05%	Anti-IgG ratón-HRP (Cabra, Policlona) Sigma	1.2000 en PBST 0.05%
Anti-GFP (Ratón, Monoclona) Roche	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1.1000 (0.4 µg/ml) en PBST 0.05%	Anti-IgG ratón-HRP (Cabra, Policlona) Sigma	1.2000 en PBST 0.05%
Anti-fosfo-p38 (Conejo, Monoclona) Cell Signalling	PBST 0.01% + leche 1%	1.1000 en PBST 0.01% y BSA 1%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlona) GE Healthcare	1.2000 en PBST 0.01% + leche desnatada 1%
Anti-fosfo-Tyr (pY99) (Ratón, Monoclona) Santa Cruz Biotech	TBST 0.05% + leche desnatada 1%	1.1000 en TBST 0.05% y BSA 1%	Anti-IgG ratón-HRP (Cabra, Policlona) Sigma	1.2000 en TBST 0.05% + leche 1%
Anti-cdc2 fosfo-Tyr15 (Conejo, Policlona) Chemicon International	TBST 0.1% + leche 5%	1.1000 en TBST 0.1% y BSA 1%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlona) GE Healthcare	1.1500 en TBST 0.1% + leche desnatada 1%
Anti RPL7 (Conejo, Policlona) Abcam	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1.1000 en PBST 0.05%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlona) GE Healthcare	1.2000 en PBST 0.05%

Tabla MM.10.- Anticuerpos y condiciones de uso empleadas en este trabajo.

Para el revelado se utilizó el sistema *Amersham ECL Western Blotting Detection (GE Healthcare)* que permite la detección de la actividad peroxidasa asociada al anticuerpo secundario mediante quimioluminiscencia. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron exponiendo las membranas sobre películas *Hyperfil ECL (GE Healthcare)* durante tiempos variables (1 a 20 minutos) en casetes de autorradiografía.

14.5.c) Análisis densitométrico

La cuantificación de la señal obtenida tras la inmunodetección se realizó mediante el programa *Alpha View (v.3.0.3.0; Alpha Innotech Corporation)*. Los valores de intensidad de cada punto se normalizan sustrayendo el fondo. Se calculó el valor de la inducción relativa como relación o cociente entre los niveles cuantificados de proteína a los tiempos indicados frente a los niveles medidos a tiempo 0 en el control (células sin tratar) o cepa silvestre. Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a los valores correspondientes a la proteína total (control de carga).

15.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Las secuencias de genes y proteínas se obtuvieron de la base de datos de *S. pombe* (*The Wellcome Trust Sanger Institute*) disponible en la siguiente dirección web:

<http://old.genedb.org/genedb/pombe/>

Con el fin de obtener los mapas de restricción de secuencias de ADN se recurrió a la aplicación *Webcutter 2.0* disponible en:

<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>

Para el alineamiento de secuencias de ADN y proteínas, así como la búsqueda de genes homólogos se empleó la aplicación del proyecto de *S. pombe* del *Sanger Institute* o alternativamente en la página web del *National Center for Biotechnology Information* presentes en las siguientes direcciones:

<http://old.genedb.org/genedb/pombe/blast.jsp>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

El análisis de los dominios estructurales presentes en las proteínas o predecibles a partir de su secuencia se realizó a través de las siguientes bases de datos:

<http://pfam.sanger.ac.uk/>

<http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/index.html>

La búsqueda bibliográfica se realizó en la base de datos disponible en la siguiente dirección web:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

RESULTADOS

Capítulo I:

**Cpc2 modula la actividad de las rutas de MAP
quinasas y la respuesta a estrés en *S. pombe***

1.- LOS NIVELES DE Cpc2 NO VARIAN EN RESPUESTA A CAMBIOS EN LAS CONDICIONES AMBIENTALES

La expresión de ASC1, el ortólogo a RACK1 en *S. cerevisiae*, se encuentra influenciada de manera importante por las condiciones nutricionales del medio. Así, se ha descrito que la expresión del ARN mensajero de ASC1 se reduce a la mitad cuando en lugar de glucosa se emplea una fuente de carbono no fermentable como el etanol (Kleinschmidt *et al.*, 2006). Asimismo, estudios realizados en *Drosophila* y *Xenopus* han evidenciado que la expresión de RACK1 varía a lo largo del desarrollo embrionario y según el tejido analizado (Kadmas *et al.*, 2007; Vani *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2001). Con estos antecedentes, y como paso previo para el inicio de nuestro estudio, decidimos analizar los niveles de expresión de Cpc2 en cultivos de *S. pombe* sometidos a distintas condiciones de crecimiento y estímulos ambientales.

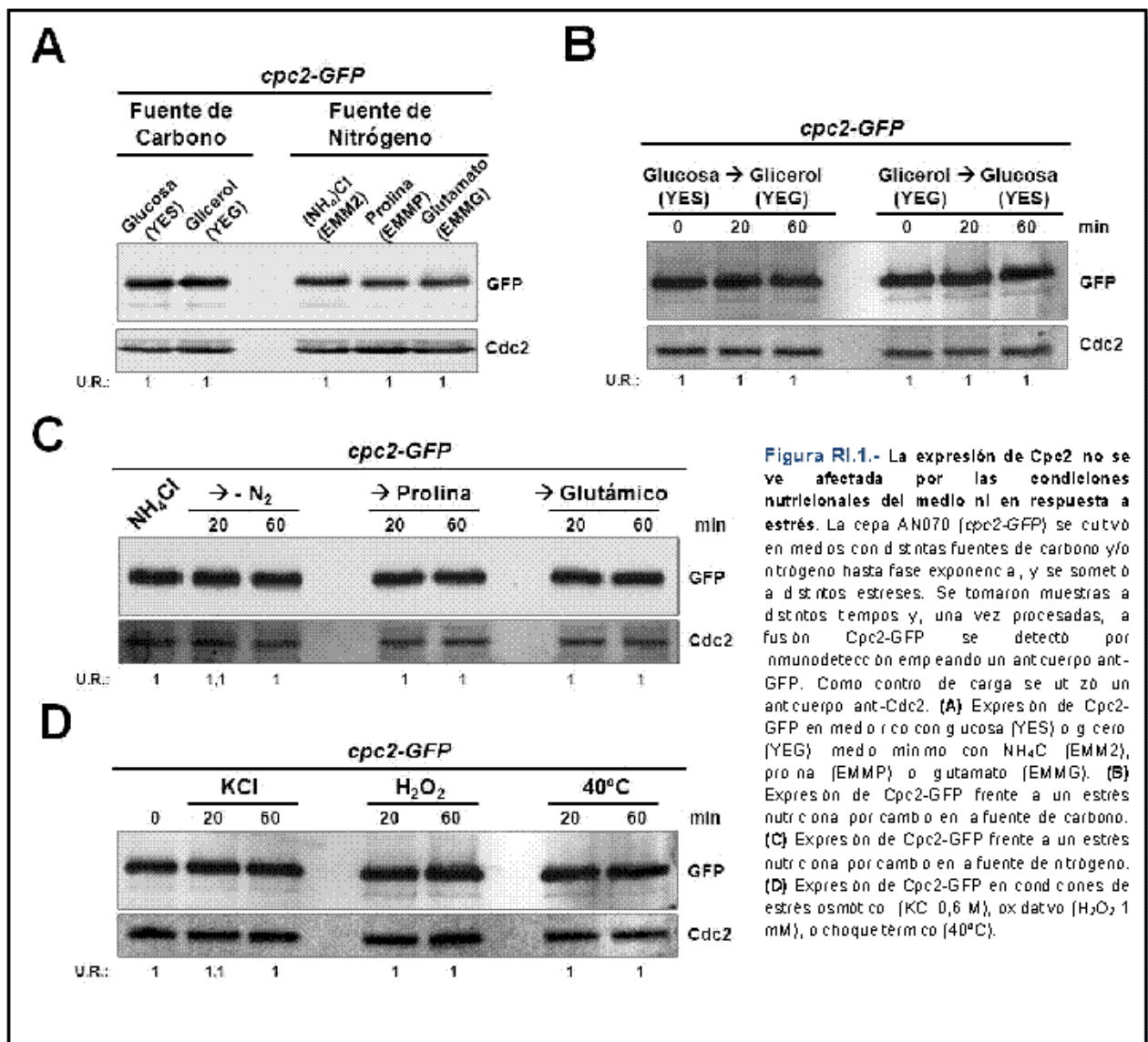


Figura RI.1.- La expresión de Cpc2 no se ve afectada por las condiciones nutricionales del medio ni en respuesta a estrés. La cepa AN070 (*cpc2-GFP*) se cultivó en medios con distintas fuentes de carbono y/o nitrógeno hasta fase exponencial, y se sometió a distintos estreses. Se tomaron muestras a distintos tiempos y, una vez procesadas, a fusión Cpc2-GFP se detectó por inmunodetección empleando un anticuerpo anti-GFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-Cdc2. **(A)** Expresión de Cpc2-GFP en medio rico con glucosa (YES) o glicerol (YEG) medio mínimo con NH₄Cl (EMM2), prolina (EMMP) o glutamato (EMMG). **(B)** Expresión de Cpc2-GFP frente a un estrés nutricional por cambio en la fuente de carbono. **(C)** Expresión de Cpc2-GFP frente a un estrés nutricional por cambio en la fuente de nitrógeno. **(D)** Expresión de Cpc2-GFP en condiciones de estrés osmótico [KCl 0,6 M], oxidativo [H₂O₂ 1 mM], o choque térmico (40°C).

Como muestra la Figura R1.1., los niveles de Cpc2, expresados como una versión genómica fusionada en su extremo C-terminal al epítipo GFP (cepa AN070), no variaron significativamente independientemente de la fuente de carbono (glucosa, glicerol) o de nitrógeno (amonio, glutamato, prolina) utilizadas en el medio de cultivo (Figura R1.1A). Solamente se observó una ligera disminución en el contenido de Cpc2 cuando las células se cultivaron en medio mínimo (EMM2, EMMP, EMMG), en comparación con el medio rico (YES, YEG). Los niveles de Cpc2 no variaron durante el crecimiento vegetativo en respuesta a cambios en la fuente de carbono (Figura R1.1B), o de nitrógeno (Figura R1.1C). Tampoco encontramos diferencias relevantes en los niveles de Cpc2 cuando los cultivos se sometieron a un tratamientos de estrés hiperosmótico (KCl), oxidativo (peróxido de hidrógeno), o choque térmico (40°C) (Figura R1.1D). La localización citoplasmática de Cpc2 tampoco varió en ninguna de las condiciones anteriores ni durante el ciclo celular (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que, a diferencia de *S. cerevisiae*, la expresión de Cpc2 en *S. pombe* no se ve afectada por las condiciones nutricionales del medio de cultivo o en respuesta a estrés.

2.- INTERACCIÓN DE Cpc2 CON LA RUTA DE MAP QUINASAS DE INTEGRIDAD CELULAR

Estudios recientes han demostrado que RACK1, el ortólogo de Cpc2 en células de mamíferos, se asocia con la MAP quinasa JNK actuando como una proteína de andamiaje ("scaffold") para facilitar su asociación con la proteína quinasa C (PKC) (López-Bergami *et al.*, 2005). En *Schizosaccharomyces pombe*, Cpc2 también se asocia a Pck2, uno de los dos ortólogos de la PKC presentes en la levadura (Won *et al.*, 2001). Según estos autores, Cpc2 regula de alguna manera la actividad de Pck2, puesto que la letalidad que provoca la sobre-expresión de *pck2*⁺ se corrige en parte al sobre-expresarse simultáneamente *cpc2*⁺ (Won *et al.*, 2001). Por otra parte, Pck2 es uno de los componentes de la ruta de MAPK de integridad celular que regula procesos tales como la morfogénesis, la organización de la pared celular, la citoquinesis y la homeostasis iónica (Ma *et al.*, 2006, Barba *et al.*, 2008). El elemento central de dicha ruta es la MAP quinasa Pmk1, que se activa específicamente durante la separación celular y en respuesta a múltiples formas de estrés (Madrid *et al.*, 2006, 2007; ver Introducción).

Dado el elevado grado de conservación estructural y funcional que presenta RACK1/Cpc2 en los organismos eucariotas, decidimos abordar el estudio de la posible

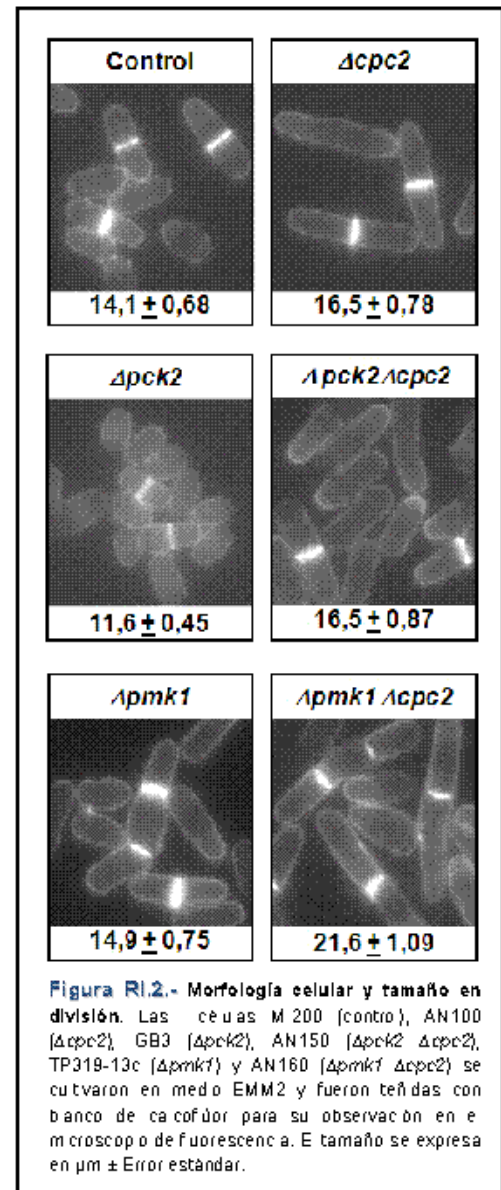
interacción existente entre Cpc2 y la ruta de MAPK de integridad celular empleando la levadura con fisión como modelo.

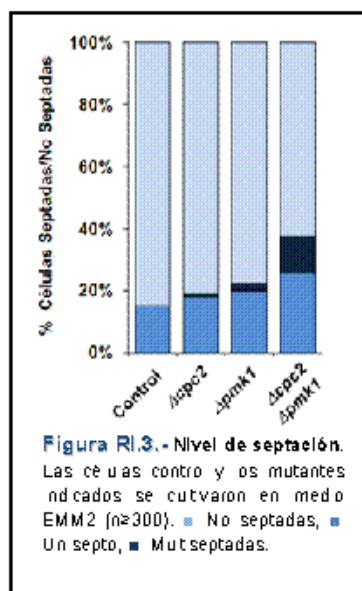
2.1.- Cpc2 regula la forma, el tamaño celular y la septación de manera independiente de la actividad de Pmk1

Los mutantes defectivos en distintos componentes de la ruta de MAPK de integridad celular poseen varios defectos morfológicos. Así, las células del mutante $\Delta pmk1$ son ligeramente alargadas y multiseptadas (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997), mientras que las células carentes de $pck2^+$ son ligeramente más cortas respecto al control (Figura RI.2). Como se comentó en la introducción, el mutante $\Delta cpc2$ presenta células con un tamaño en división más alargado que en el control. Al combinar la delección de $cpc2^+$ con la de $pck2^+$ o $pmk1^+$ observamos un aumento significativo del tamaño celular en división respecto al de las cepas parentales ($11,6 \pm 0,45 \mu\text{m}$ en las células $\Delta pck2$ frente a $16,5 \pm 0,87 \mu\text{m}$ en el mutante $\Delta pck2 \Delta cpc2$; $14,9 \pm 0,75 \mu\text{m}$ en el mutante $\Delta pmk1$ frente a $21,6 \pm 1,09 \mu\text{m}$ en el mutante doble $\Delta pmk1 \Delta cpc2$) (Figura RI.2).

Por otra parte, el fenotipo de multiseptación característico de las células carentes de $pmk1^+$ se agravó al eliminar simultáneamente $cpc2^+$ (12% de células multiseptadas en el mutante $\Delta pmk1 \Delta cpc2$ frente al 3% y 1% en los mutantes $\Delta pmk1$ y $\Delta cpc2$, respectivamente) (Figura RI.3).

Estos resultados sugieren que Cpc2 participa en la regulación de la forma, el tamaño celular y la septación mediante mecanismos alternativos a los que regula la MAP quinasa Pmk1.



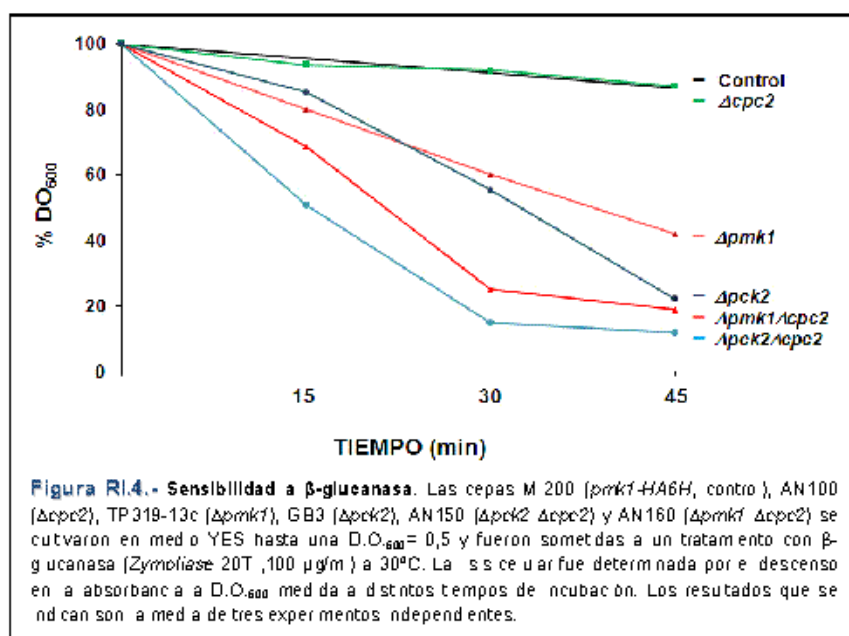


2.2.- Cpc2 participa en el mantenimiento de la integridad de la pared celular independiente de la actividad de Pmk1

Una forma habitual de valorar la integridad de la pared celular de *S. pombe* consiste en la determinación de su sensibilidad frente al tratamiento con enzimas líticas como la β -glucanasa. Así, los mutantes que poseen una pared alterada, como es el caso de los mutantes $\Delta pmk1$ o $\Delta pck2$ presentan una gran sensibilidad frente a la acción de este enzima (Toda *et al.*, 1996; Kobori *et al.*, 1994). Sin embargo, mientras que los mutantes carentes de $cpc2^+$ no fueron especialmente sensibles a su acción en comparación con las células control, la sensibilidad

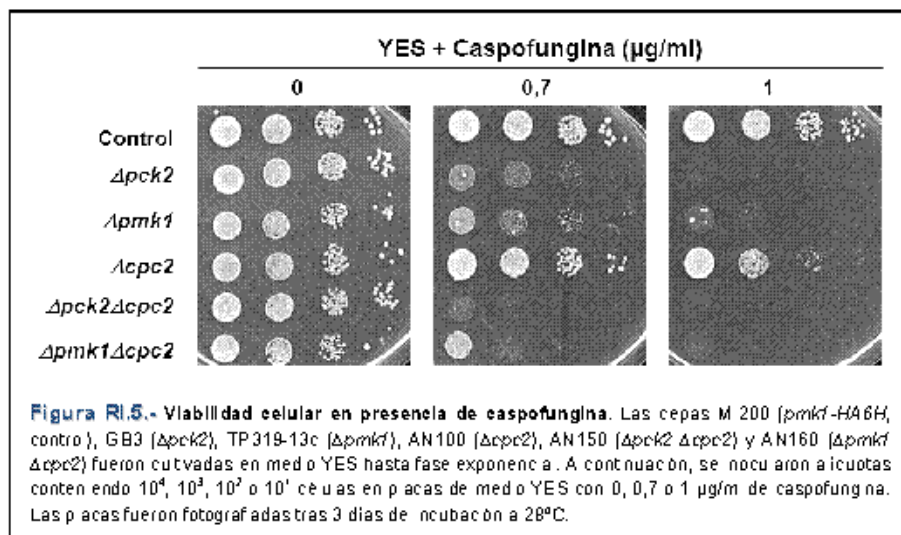
de los mutantes dobles $\Delta pmk1 \Delta cpc2$ y $\Delta pck2 \Delta cpc2$ fue claramente superior a la de los mutantes sencillos $\Delta pmk1$, $\Delta pck2$ o $\Delta cpc2$ (Figura R1.4). Ello sugiere que Cpc2 juega un papel relevante en el control de la organización de la pared celular en *S. pombe*.

Una estrategia alternativa a la anterior consistió en estudiar la sensibilidad celular al crecimiento en presencia de caspofungina. La caspofungina es un antimicótico lipopeptídico perteneciente al grupo de las equinocandinas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la actividad 1,3- β -glucanosintasa, responsable de la síntesis del beta-glucano, que es un componente esencial de las paredes fúngicas. La presencia de caspofungina en el medio de cultivo produce una disminución en la síntesis de glucano, generando paredes celulares debilitadas e incompletas, lo que provoca inestabilidad osmótica, lisis y la muerte celular. Por ello, los mutantes de *S. pombe* que presentan defectos de organización y estructura en la pared celular son especialmente sensibles al crecimiento en presencia de bajas concentraciones de este compuesto. Así, el mutante $\Delta cpc2$ mostró una



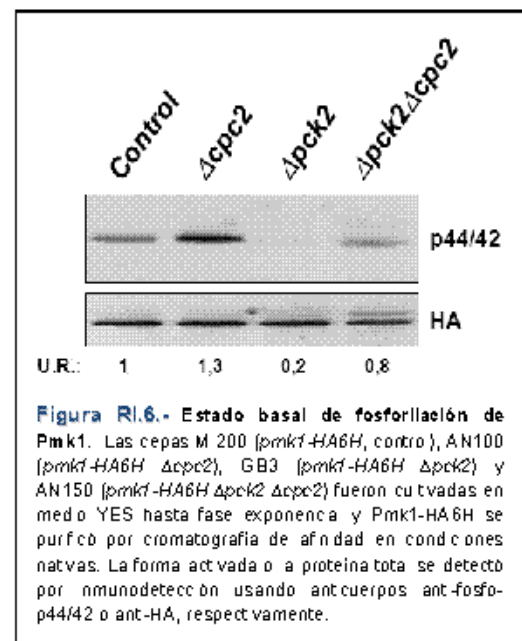
cierta sensibilidad al crecimiento en medio rico (YES) suplementado con 1 $\mu\text{g/ml}$ de este compuesto (Figura RI.5). Sin embargo, la hipersensibilidad frente a la caspofungina de los mutantes $\Delta pck2$ o $\Delta pmk1$ aumentó drásticamente en un fondo genético carente de $cpc2^+$ (mutantes dobles $\Delta pck2 \Delta cpc2$ y $\Delta pmk1 \Delta cpc2$).

En conjunto, estos datos apoyan la idea de que Cpc2 participa en el mantenimiento de la integridad de la pared celular de *S. pombe* de forma alternativa o aditiva a la ruta regulada por Pmk1.



2.3.- Cpc2 regula el estado basal de fosforilación de Pmk1

Como hemos mencionado anteriormente, en células humanas la presencia de RACK es necesaria para que PKC fosforile a la MAP quinasa JNK, lo que provoca un incremento en su actividad biológica (López-Bergami *et al.*, 2005). Puesto que Cpc2 interacciona *in vivo* con Pck2 (Won *et al.*, 2001) decidimos realizar un estudio comparativo del nivel basal de activación de la MAP quinasa Pmk1 en células creciendo vegetativamente de la cepa control y en los mutantes $\Delta cpc2$, $\Delta pck2$ y $\Delta pck2 \Delta cpc2$. Todas estas estirpes presentan una versión genómica de *pmk1*⁺ en su locus original fusionado en su extremo C-terminal a dos unidades del epítopo de hemaglutinina y 6 histidinas consecutivas (HA6H). Ello permite purificar la proteína de fusión

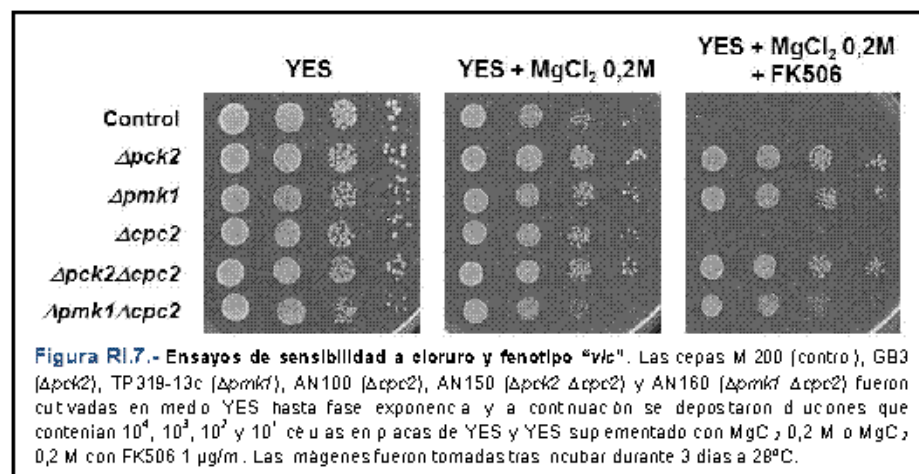


Pmk1-HA6H a partir de extractos totales mediante cromatografía de afinidad empleando una matriz de níquel (ver Materiales y Métodos). Una vez purificada, resuelta mediante SDS-PAGE, y transferida a membrana, el estado de fosforilación de Pmk1 se detectó tras la incubación con un anticuerpo policlonal anti-p44/42, que detecta la fosforilación dual de la MAP quinasa en los residuos conservados de treonina-186 (Thr¹⁸⁶) y tirosina-188 (Tyr¹⁸⁸) (Madrid *et al.*, 2006). La incubación posterior con un anticuerpo monoclonal anti-HA permite detectar los niveles totales de Pmk1 en cada muestra (control de carga).

Así, los resultados mostrados en la Figura R1.6 indican que las células carentes de *cpc2*⁺ presentan un incremento moderado pero reproducible en el grado de fosforilación basal de Pmk1 respecto al control. Previamente, nuestro laboratorio había descrito que la delección de *pck2*⁺ reduce drásticamente la fosforilación basal de la MAP quinasa Pmk1 (Barba *et al.*, 2008). Sin embargo, el nivel basal de fosforilación de Pmk1 fue mayor en el doble mutante $\Delta pck2 \Delta cpc2$ que en el mutante sencillo $\Delta pck2$ (Figura R1.6), lo que sugiere que Cpc2p regula de manera negativa el estado basal de fosforilación de Pmk1 actuando por debajo de Pck2 en la ruta de integridad celular.

2.4.- Cpc2 controla negativamente la homeostasis celular del cloruro

En *S. pombe*, la calcineurina y Pmk1 desempeñan papeles antagónicos en la homeostasis del cloruro, de forma que la hiperactivación de Pmk1 provoca una gran sensibilidad frente a este anión (Sugiura *et al.*, 1998). Por el contrario, un descenso de la actividad de Pmk1, como sucede en los mutantes $\Delta pck2$ o $\Delta pmk1$, provoca una mayor resistencia al crecimiento en presencia de concentraciones elevadas de dicho anión. Dado que



la fosforilación basal de Pmk1 en el mutante $\Delta cpc2$ está aumentada con respecto a la cepa control, decidimos estudiar la sensibilidad al cloruro en dicho mutante. Contrariamente a lo

esperado, la falta de *cpc2*⁺ no aumentó la sensibilidad celular frente al cloruro al emplear placas de medio YES suplementado con distintas concentraciones de $MgCl_2$ (Figura R1.7).

Analizamos al mismo tiempo la supervivencia de los mutantes anteriores en presencia de FK506 (ciclosporina) y $MgCl_2$ (fenotipo "VIC": "Viable en presencia del Inmunodepresor FK506 e iones Cloruro). El FK506/ciclosporina es un inmunodepresor que inhibe específicamente la actividad de la calcineurina. Su adición al medio de cultivo junto con $MgCl_2$ permite identificar mutantes defectivos en la ruta de integridad celular, puesto que solamente los mutantes con una actividad baja o nula de Pmk1 son capaces de crecer en este medio (cepas VIC-positivo). Nuestro estudio mostró que el fenotipo VIC-negativo de los mutantes $\Delta cpc2$ revierte al deletar conjuntamente $pck2^+$ o $pmk1^+$ (Figura R1.7). Este resultado sugiere que Cpc2p actúa como un regulador negativo de la homeostasis del cloruro independientemente de la actividad de Pmk1 y/o de la calcineurina.

Para confirmar el resultado aparentemente contradictorio de que la delección de $cpc2^+$ confiere mayor resistencia al cloruro a pesar de presentar un incremento de la actividad basal de Pmk1,

estudiamos la sensibilidad al cloruro en otros fondos genéticos. La fosfatasa dual Pmp1 actúa como regulador negativo de la actividad de Pmk1 desfosforilando a la MAP quinasa (Sugiura *et al.*, 1998). En consecuencia, la delección del gen correspondiente ($pmp1^+$) incrementa la fosforilación basal de Pmk1 y provoca una clara hipersensibilidad frente al $MgCl_2$. De acuerdo con la hipótesis anterior, y como muestra la Figura R1.8, el mutante doble $\Delta pmp1 \Delta cpc2$ incrementó la actividad basal de Pmk1 respecto a los mutantes sencillos $\Delta pmp1$ y $\Delta cpc2$. Por otra parte, las células $\Delta pmp1$ mostraron menor sensibilidad al crecimiento en presencia de

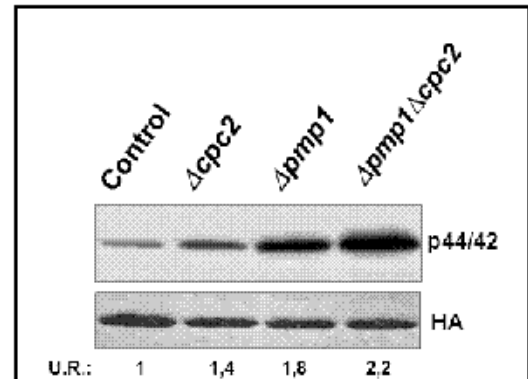


Figura R1.8.- Estado basal de fosforilación de Pmk1. Las cepas M 200 [$pmk1$ -HA6H, control], AN100 [$pmk1$ -HA6H $\Delta cpc2$], M 212 [$pmk1$ -HA6H $\Delta pmp1$] y AN170 [$pmk1$ -HA6H $\Delta pmp1 \Delta cpc2$] fueron cultivadas en medio YES hasta fase exponencial y Pmk1-HA6H se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones nativas. La forma activada o la proteína total se detectó por inmunodetección usando anticuerpos anti-fosfo-p44/42 o anti-HA, respectivamente.

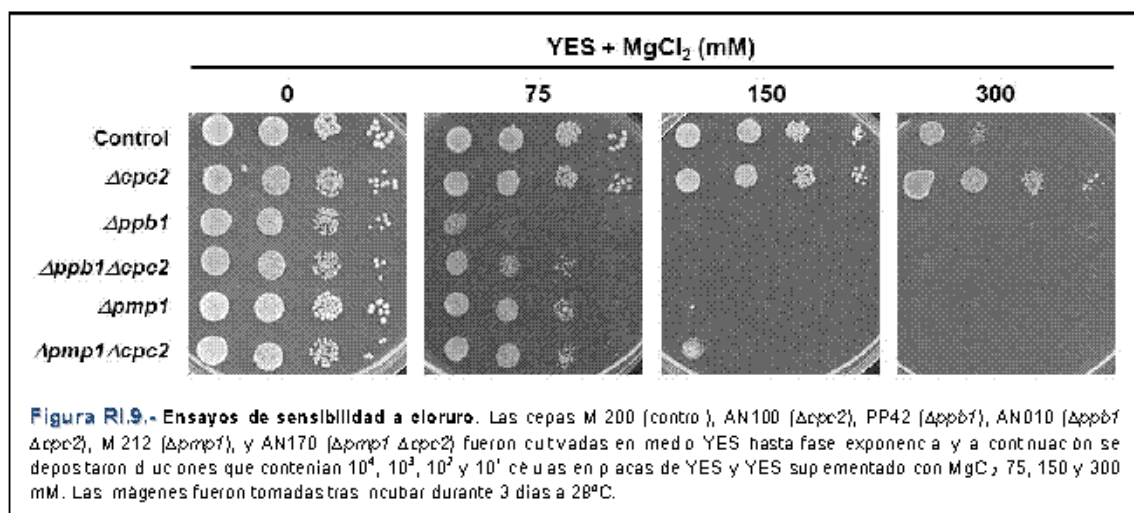


Figura R1.9.- Ensayos de sensibilidad a cloruro. Las cepas M 200 (control), AN100 [$\Delta cpc2$], PP42 [$\Delta pmp1$], AN010 [$\Delta pmp1 \Delta cpc2$], M 212 [$\Delta pmp1$], y AN170 [$\Delta pmp1 \Delta cpc2$] fueron cultivadas en medio YES hasta fase exponencial y a continuación se depositaron diluciones que contenían 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 células en placas de YES y YES suplementado con $MgCl_2$ 75, 150 y 300 mM. Las imágenes fueron tomadas tras incubación durante 3 días a 28°C.

MgCl₂ que cuando se deletionó conjuntamente el gen *cpc2*⁺ (Figura RI.9).

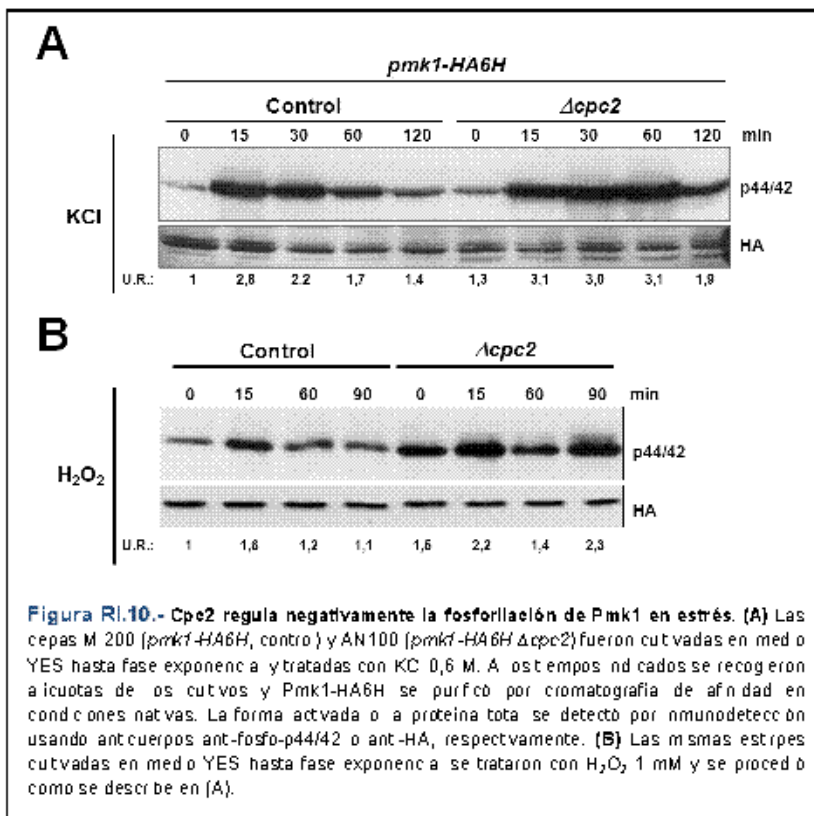
Además, el mutante $\Delta ppb1$, carente de la subunidad catalítica de la calcineurina (Yoshida *et al.*, 1994) y que presenta una sensibilidad apreciable a bajas concentraciones de MgCl₂, recuperó parcialmente la tolerancia a dicho compuesto tras deletionarse conjuntamente *cpc2*⁺ (mutante doble $\Delta ppb1 \Delta cpc2$; Figura RI.9).

En conjunto, todos estos datos apuntan a que Cpc2 actúa en *S. pombe* como un regulador negativo en la homeostasis del cloruro de manera alternativa a Pmk1p.

2.5.- Cpc2 está implicada en la regulación de la fosforilación de Pmk1 en respuesta a estrés

El nivel de fosforilación de Pmk1 incrementa de forma rápida y transitoria cuando las células de *S. pombe* se someten a un estrés osmótico salino inducido tras el tratamiento con KCl (Madrid *et al.*, 2006). Habiendo demostrado que los mutantes $\Delta cpc2$ presentan un incremento en la fosforilación basal de Pmk1, decidimos estudiar la cinética de activación de la MAP quinasa en respuesta a estrés (Figura RI.10). Las cepas MI200 (*pmk1-HA6H*, control) y AN100 (*pmk1-HA6H \Delta cpc2*) se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial y se trataron

con KCl hasta una concentración final de 0,6 M. Se tomaron alícuotas de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo y se procesaron para detectar Pmk1 en su forma fosforilada y total mediante experimentos tipo *Western*. Como puede observarse en la Figura RI.10A, comparado con las células control, el grado de fosforilación de Pmk1 en un mutante $\Delta cpc2$ se mantuvo elevado a tiempos más largos. Además, esta fosforilación mantenida se



observó en respuesta a otros tipos de estrés, como el oxidativo, inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura RI.10B) o tras la inhibición de la síntesis de pared celular por caspofungina (datos no mostrados).

Para confirmar que el mantenimiento de la activación de Pmk1 es debido a la ausencia de Cpc2, realizamos un experimento de sobre-expresión. Para ello, transformamos la cepa AN100 (*pmk1-HA6H Δcpc2*) con el plásmido pREP3X-*cpc2*⁺ que expresa Cpc2 bajo el control de una versión fuerte del promotor del gen *nmt1*⁺ regulado por la presencia de tiamina en el medio. El transformante se cultivó en medio EMM2 con (+B1) y sin (-B1) tiamina durante 16 horas. Tras este tiempo se trataron ambos cultivos con KCl 0,6 M y se procesaron como se indicó anteriormente. Los resultados

obtenidos (Figura RI.11), muestran que, en ausencia de tiamina (sobre-expresión de *cpc2*⁺), se reduce el grado de fosforilación de Pmk1 tanto en células vegetativas como en respuesta a estrés. También se observa una reducción en el tamaño celular en división, lo que confirma la funcionalidad de la construcción.

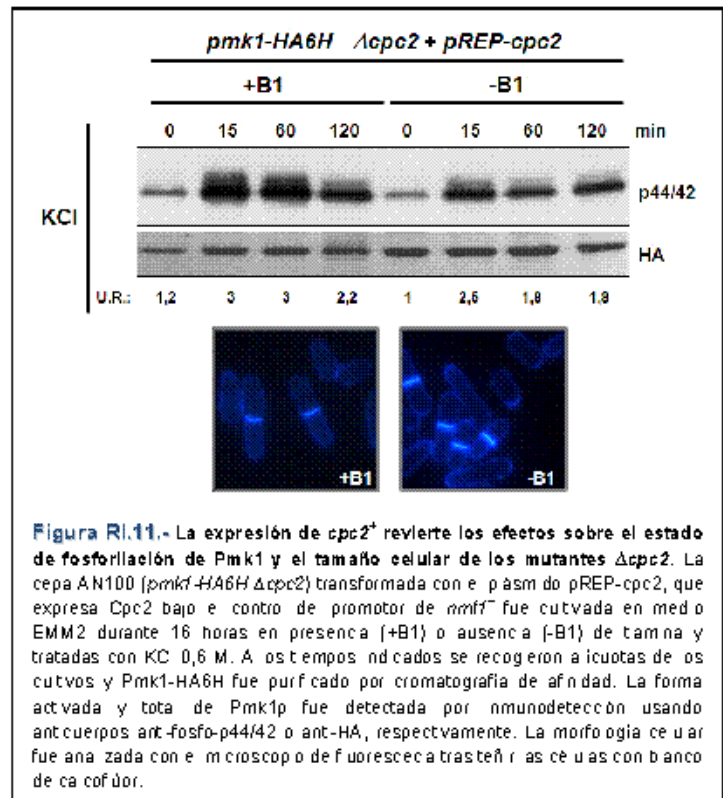


Figura RI.11.- La expresión de *cpc2*⁺ revierte los efectos sobre el estado de fosforilación de Pmk1 y el tamaño celular de los mutantes $\Delta cpc2$. La cepa AN100 [*pmk1-HA6H Δcpc2*] transformada con el plásmido pREP-*cpc2*, que expresa Cpc2 bajo el control de promotor de *nmt1*⁺ fue cultivada en medio EMM2 durante 16 horas en presencia (+B1) o ausencia (-B1) de tiamina y tratada con KCl 0,6 M. A los tiempos indicados se recogieron alicuotas de los cultivos y Pmk1-HA6H fue purificado por cromatografía de afinidad. La forma activada y total de Pmk1p fue detectada por inmunodetección usando anticuerpos anti-fosfo-p44/42 o anti-HA, respectivamente. La morfología celular fue analizada con el microscopio de fluorescencia tras tetrastear las células con un banco de cámara confocal.

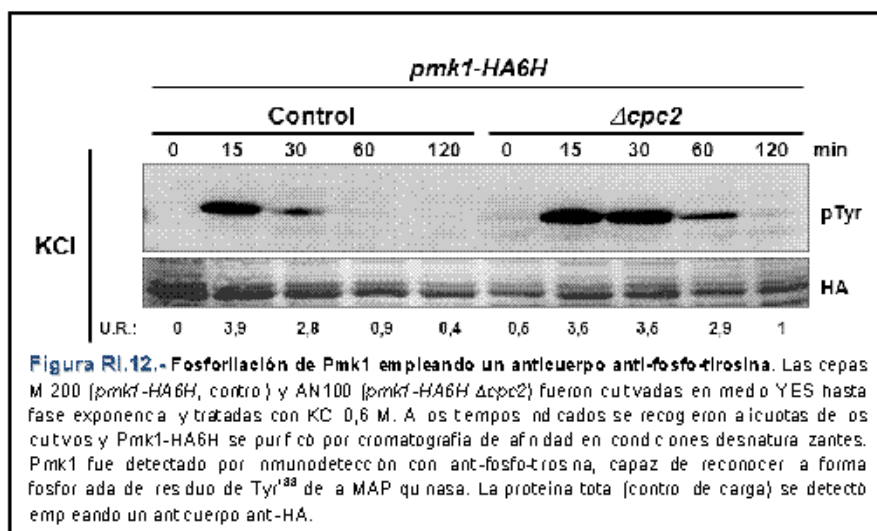


Figura RI.12.- Fosforilación de Pmk1 empleando un anticuerpo anti-fosfo-tirosina. Las cepas M 200 [*pmk1-HA6H*, control] y AN100 [*pmk1-HA6H Δcpc2*] fueron cultivadas en medio YES hasta fase exponencial y tratadas con KCl 0,6 M. A los tiempos indicados se recogieron alicuotas de los cultivos y Pmk1-HA6H se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes. Pmk1 fue detectado por inmunodetección con anti-fosfo-tirosina, capaz de reconocer a forma fosforilada de residuo de Tyr³² de la MAP quinasa. La proteína total (control de carga) se detectó empleando un anticuerpo anti-HA.

Para la detección de la forma fosforilada de Pmk1 en los experimentos anteriores empleamos un anticuerpo que reconoce la fosforilación dual de la MAP quinasa (p44/42). Decidimos a continuación analizar el

estado de fosforilación de Pmk1 en cultivos sometidos a estrés osmótico salino utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (pTyr), capaz de detectar el residuo fosforilado de la tirosina-188 (Tyr¹⁸⁸) presente en la MAP quinasa. Los resultados mostrados en la Figura RI.12 confirmaron los obtenidos anteriormente: el mutante $\Delta cpc2$ presenta un incremento en los niveles de fosforilación basal y en respuesta a estrés de Pmk1, lo que confirma el papel de Cpc2 como un regulador negativo del estado de fosforilación de la MAP quinasa de integridad celular.

3.- REGULACIÓN DE LA RUTA SAPK POR Cpc2

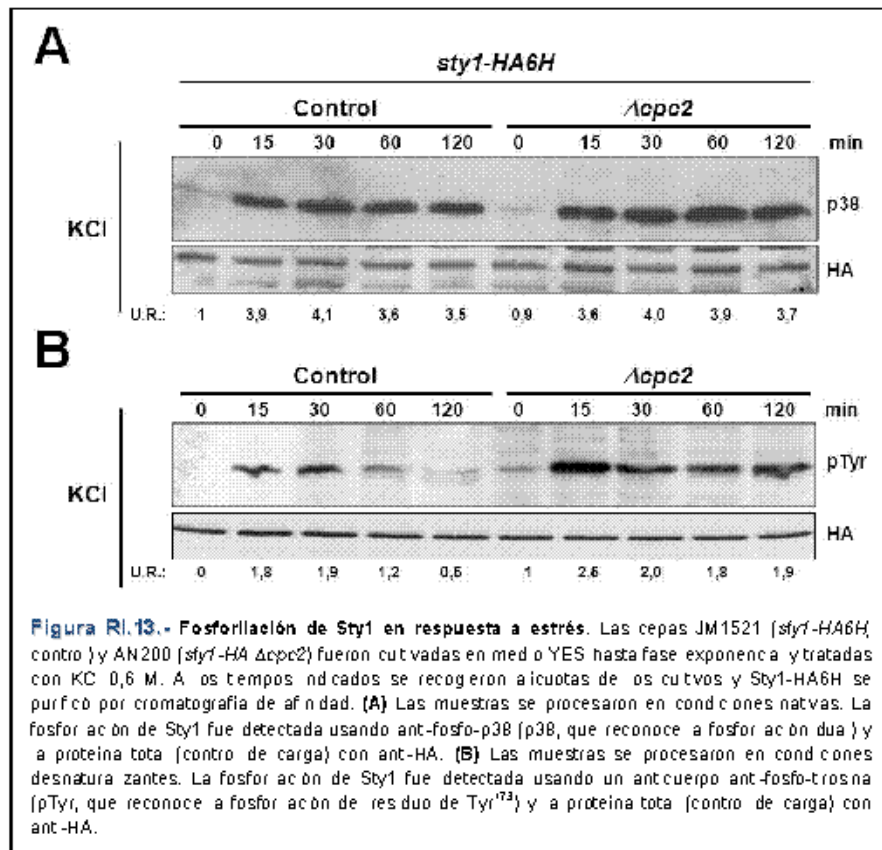
Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían la existencia de una relación funcional entre Cpc2 y la ruta de MAP quinasa de Pmk1. Previamente, nuestro grupo había descrito la existencia de interconexión (*crossstalk*) entre las rutas SAPK y de integridad celular mediada por proteínas fosfatasa (Madrid *et al.*, 2007, ver Introducción). Por otra parte, un trabajo reciente ha descrito que Pmk1 puede fosforilar en determinadas condiciones a Atf1 (Takada *et al.*, 2007), que es el factor de transcripción clave implicado en la activación de la expresión de múltiples genes de respuesta a estrés y cuya actividad es regulada por la MAPK Sty1 (Wilkinson *et al.*, 1996), principal efector de la ruta SAPK. Con estos antecedentes nos planteamos estudiar la posible conexión de Cpc2 con la ruta de respuesta a estrés y Sty1.

3.1.- Los mutantes carentes de $cpc2^+$ presentan una fosforilación defectiva de Sty1 en respuesta a estrés

Como se ha comentado, los mutantes $\Delta cpc2$ presentan unos niveles alterados en el estado de fosforilación de Pmk1, tanto en cultivos vegetativos como en respuesta a estrés. Decimos analizar a continuación los niveles de fosforilación de la MAP quinasa Sty1.

Para ello empleamos la cepa JM1521, que expresa una versión genómica de $sty1^+$ fusionada en el extremo C-terminal al epítipo de hemaglutinina y seis histidinas consecutivas (HA6H), permitiendo su purificación por cromatografía de afinidad (ver Materiales y Métodos). Sobre este fondo genético deletionamos el gen $cpc2^+$, obteniendo así la estirpe AN200 ($sty1$ -HA6H $\Delta cpc2$). Para la detección del estado de fosforilación de Sty1 empleamos un anticuerpo monoclonal anti-fosfo-p38, que es capaz de reconocer la fosforilación dual en Thr¹⁷¹ y Tyr¹⁷³ de dicha MAP quinasa Sty1. Como se observa en la Figura RI.13A, y a diferencia de lo observado en el estudio de la activación de Pmk1, la cinética de fosforilación dual de Sty1 en respuesta a

estrés osmótico por KCl no mostró diferencias significativas en el mutante $\Delta cpc2$ con respecto a la cepa control. Sin embargo, cuando empleamos un anticuerpo anti-fosfo-tirosina (pTyr) que detecta específicamente la fosforilación de Sty en Tyr¹⁷³, observamos que, al igual que en el



caso de Pmk1, los mutantes $\Delta cpc2$ mostraron un incremento tanto en el nivel basal de fosforilación de la MAP quinasa como durante la respuesta al estrés osmótico salino. En este caso se puede observar que, comparado con el control, la fosforilación en tirosina de Sty1 se mantiene durante periodos de tiempo más largos durante el tratamiento (Figura RI.13B). En conjunto,

estos resultados sugieren que Cpc2 es un regulador negativo del grado de fosforilación en tirosina de las MAP quinasa Sty1 y Pmk1.

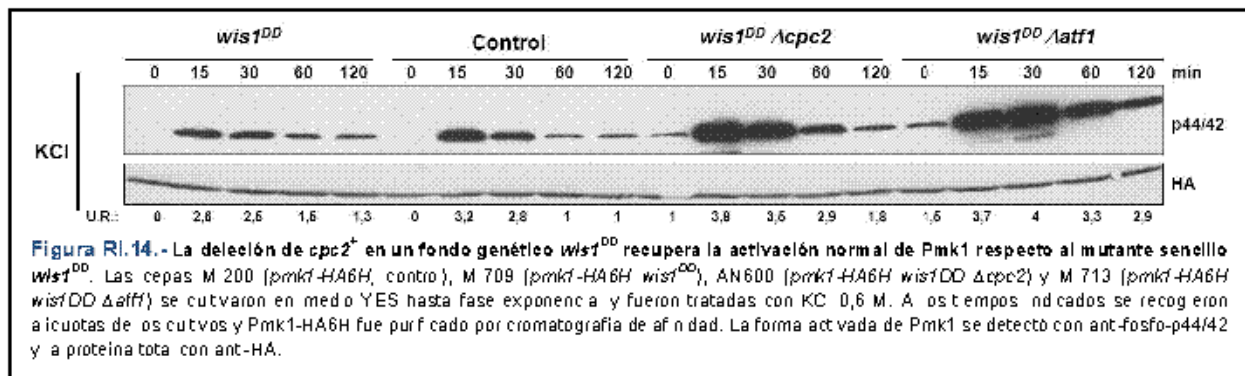
3.2.- Cpc2 regula positivamente los niveles de las fosfatasa de tirosina Pyp1 y Pyp2

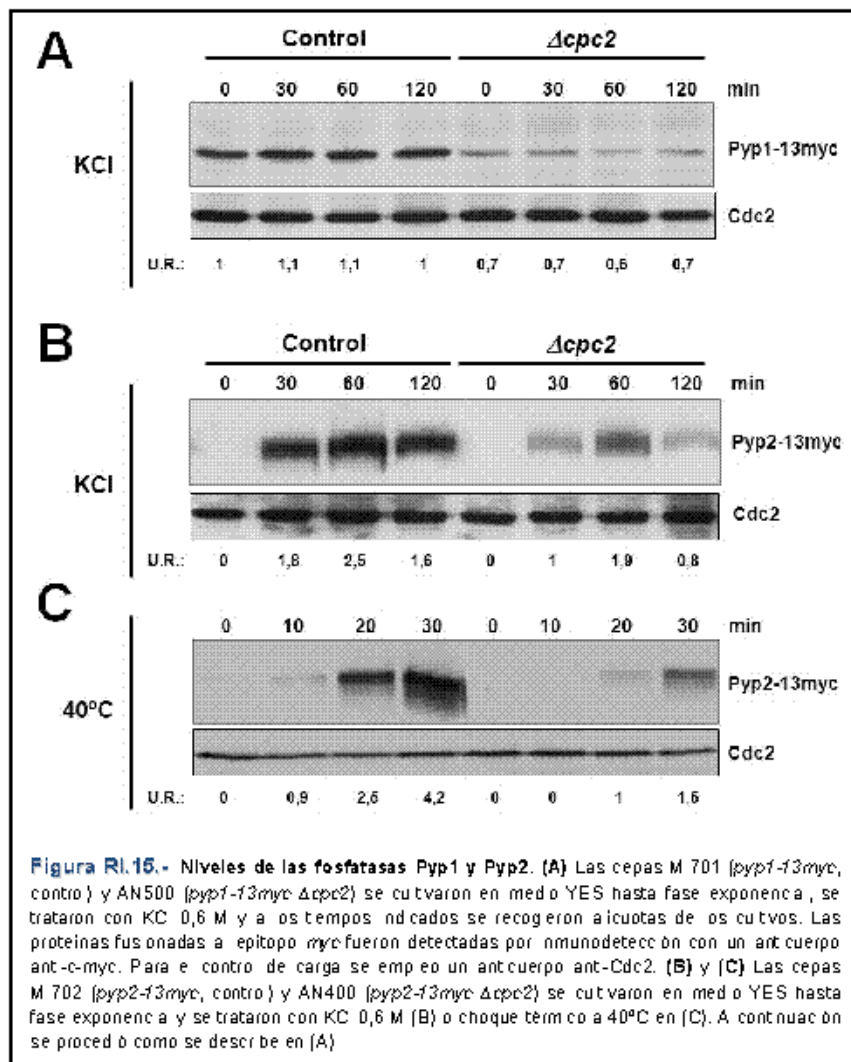
El nivel de activación de las rutas de MAPK a nivel basal y en respuesta a estrés se encuentra regulado negativamente por medio de fosfatasa específicas que desfosforilan a dichas quinasa para mantener un nivel adecuado de activación y evitar así que la ruta permanezca activada constitutivamente (ver Introducción). Como ya se ha mencionado, la ruta de integridad celular y la ruta SAPK interrelacionan entre sí por medio de fosfatasa (Madrid *et al.*, 2007), de manera que la actividad de Sty1 y su efector el factor de transcripción Atf1 son necesarias para una correcta desactivación de Pmk1 en respuesta a estrés. De hecho, las fosfatasa de tirosina Pyp1 y Pyp2, así como la fosfatasa de treonina Ptc1, cuya inducción transcripcional depende de Sty1-Atf1 (Degols *et al.*, 1996; Shiozaki and Russell, 1996;

Wilkinson *et al.*, 1996), participan en la desfosforilación de la MAPK Pmk1 en respuesta a estrés hiperosmótico (Madrid *et al.*, 2007). Recientemente se ha propuesto que la fosfatasa Ptc3 también podría estar implicada en esta respuesta (Takada *et al.*, 2007) mientras que la fosfatasa de especificidad dual Pmp1 solamente desfosforila a Pmk1 durante el crecimiento vegetativo y la separación celular (Madrid *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que el incremento observado en el estado de fosforilación de Sty1 y Pmk1 tanto en células vegetativas como en respuesta a estrés osmótico podía deberse a un déficit en los niveles proteicos de alguna de las fosfatasas mencionadas.

El mutante *wis1^{DD}* expresa una versión activa constitutivamente de dicha MAPKK que provoca que Sty1 se encuentre permanentemente activada, lo que trae consigo un incremento en los niveles de las fosfatasas Pyp1, Pyp2 y Ptc1 (Madrid *et al.*, 2007). Como consecuencia, la desfosforilación de Pmk1 en respuesta a estrés osmótico es más rápida que en la cepa control (Madrid *et al.*, 2007; Figura RI.14). Si Cpc2 regula positivamente los niveles de estas fosfatasas, la delección del gen correspondiente en un fondo genético *wis1^{DD}* debería recuperar en parte la cinética de activación "normal" de Pmk1, detectándose unos niveles de fosforilación más elevados que en el mutante sencillo *wis1^{DD}*. Los resultados que se muestran en la Figura RI.14 indican que esta predicción es correcta, ya que el nivel de activación de Pmk1 en respuesta a estrés del mutante *wis1^{DD} Δcpc2* fue claramente superior al del mutante sencillo *wis1^{DD}*. Sin embargo, no alcanzó el grado de activación del mutante *wis1^{DD} Δatf1* (Figura RI.14), lo que sugiere que los niveles de fosfatasas no se encuentran tan afectados como en ausencia del factor de transcripción Atf1 (ver más adelante).





En el caso de Pyp2 (cuya presencia en células vegetativas es casi indetectable al inducirse su síntesis de forma específica por estrés; Degols *et al.*, 1996), en respuesta a estrés osmótico se observó de nuevo una reducción clara en sus niveles en el mutante $\Delta cpc2$ en comparación con las células control (Figura RI.15B). Además, el defecto en la síntesis de Pyp2 asociado a la falta de Cpc2 no es exclusivo del estrés osmótico salino, ya que también se observó en otros tratamientos, como el choque térmico (Figura RI.15C) o el estrés oxidativo (ver Apartado 3.2).

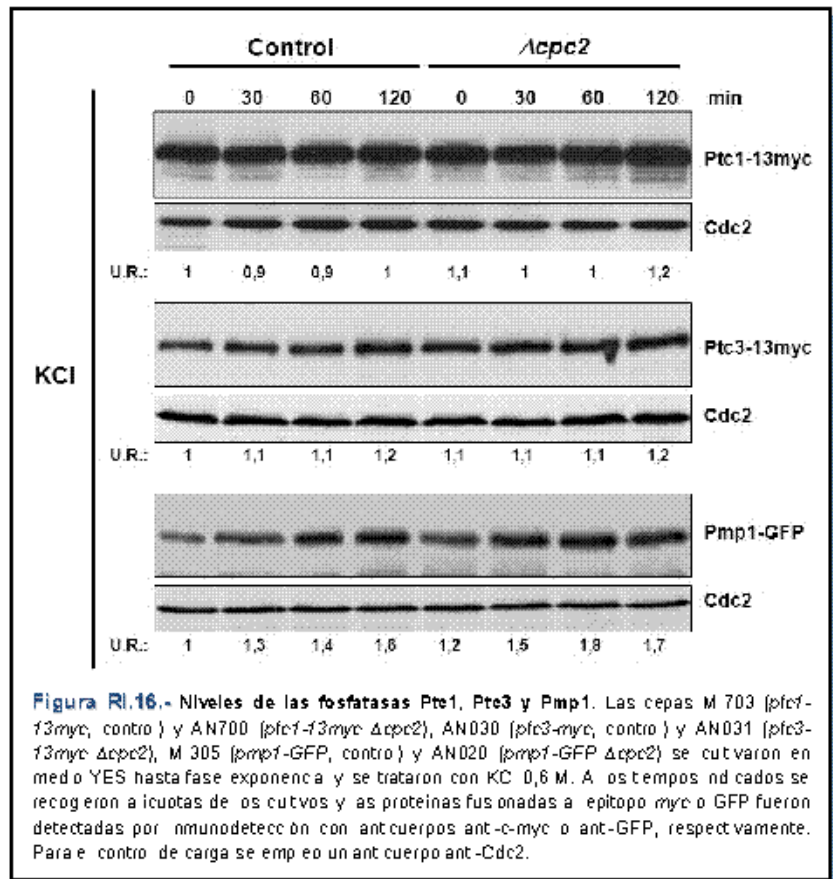
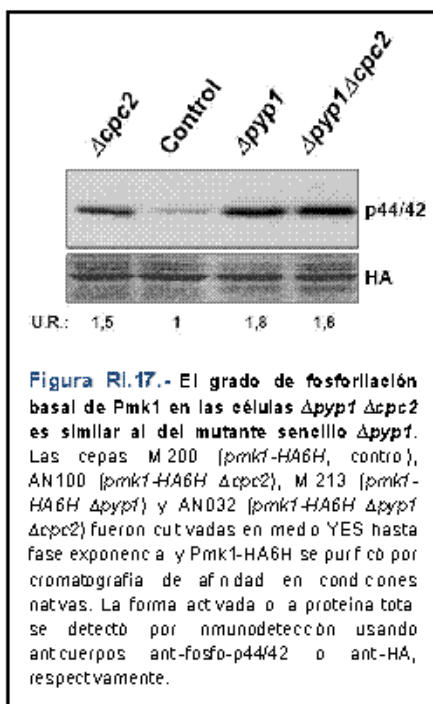
Por el contrario, no encontramos diferencias significativas en los niveles de las fosfatasas Ptc1 y Ptc3, ni en la fosfatasa de especificidad dual Pmp1 tanto en las células control como en el mutante $\Delta cpc2$ creciendo vegetativamente o en respuesta a estrés (Figura RI.16).

En una segunda aproximación, realizamos un estudio comparativo de los niveles de las fosfatasas Pyp1, Pyp2, Ptc1, Ptc3 y Pmp1 (expresadas como versiones genómicas fusionadas a distintos epítomos) en cultivos exponenciales de la cepa control y del mutante $\Delta cpc2$ sometidos a un estrés osmótico salino. La Figura RI.15A muestra que en las células carentes de *cpc2*⁺, los niveles de la fosfatasa de tirosina Pyp1 fueron menores que en el control durante el crecimiento vegetativo y a lo largo del tratamiento salino.

Un aspecto relevante de este estudio fue la constatación de que el aumento del nivel basal de fosforilación de Pmk1 en células creciendo vegetativamente del mutante sencillo $\Delta pyp1$ no incrementó tras la delección conjunta de $cpc2^+$ (Figura R1.17), lo que indica que la hiperactivación basal de Pmk1 en el mutante $\Delta cpc2$ es consecuencia de un defecto en los niveles de la fosfatasa de tirosina Pyp1.

En conjunto, nuestros resultados indican que en *S. pombe* Cpc2 regula de forma

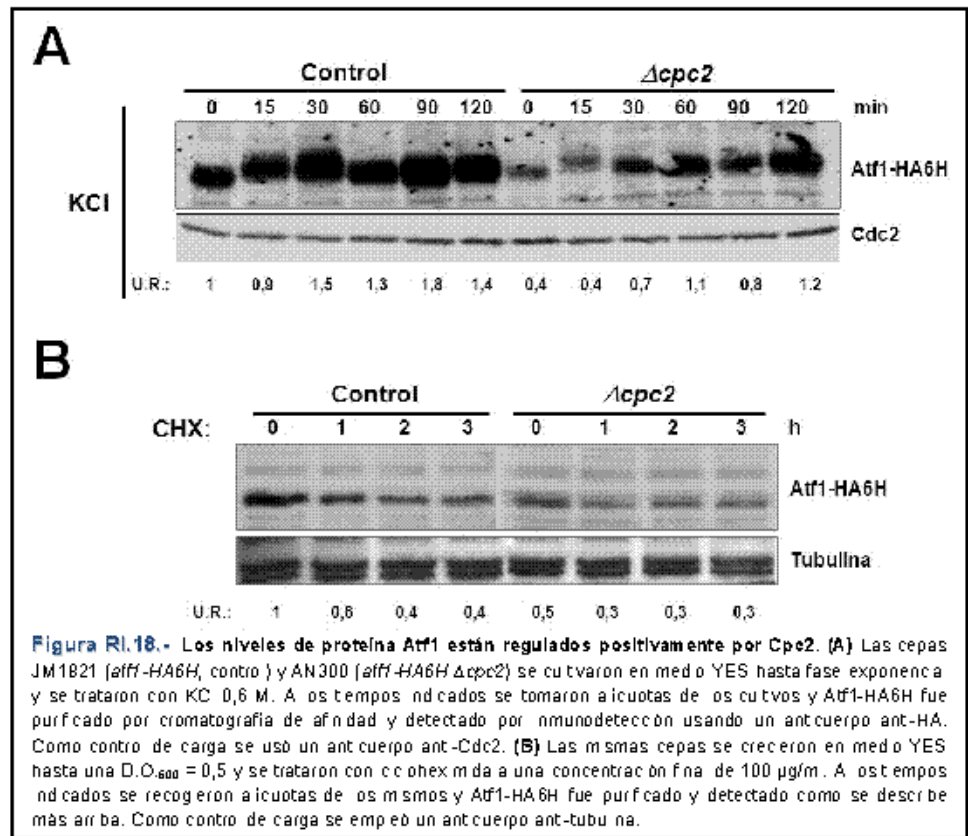
positiva los niveles de las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2. En estas condiciones, la falta de los niveles adecuados de Pyp1 y Pyp2 sería responsable de la hiperactivación de Pmk1 en células vegetativas y en respuesta a estrés, respectivamente.



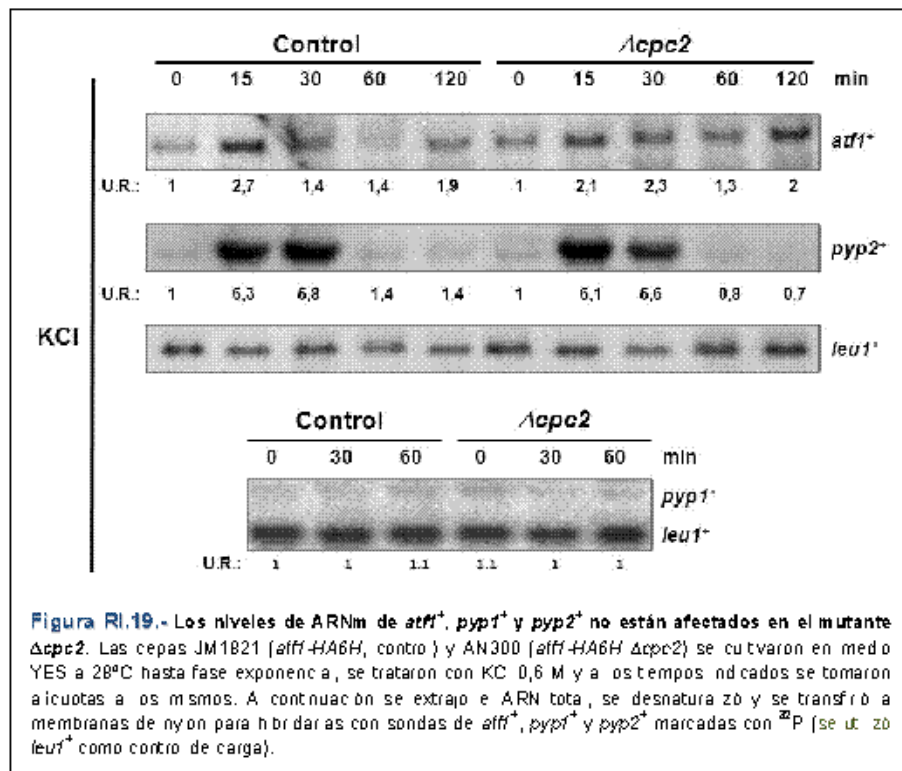
3.3.- Cpc2 regula los niveles del factor de transcripción Atf1

En *S. pombe* la inducción en respuesta a estrés de la expresión de los genes *pyp1⁺* y *pyp2⁺* está regulada por Sty1 por medio de Atf1 (Degols *et al.*, 1996; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Por tanto, consideramos la posibilidad de que el descenso en los niveles de Pyp1 y Pyp2 en el mutante $\Delta cpc2$ pudiera ser a su vez consecuencia de un defecto en la disponibilidad de dicho factor transcripcional. Para resolver esta cuestión

estimamos los niveles de proteína Atf1 tras someter cultivos de la cepa control (JM1821) y un mutante $\Delta cpc2$ (cepa AN300), que presenta el gen *atf1*⁺ fusionado en su extremo C-terminal a dos copias del epítipo de hemaglutinina y seis histidinas (HA6H), a un estrés osmótico salino por KCl. Como se muestra



en la Figura RI.18A, la delección de *cpc2*⁺ produjo un descenso evidente en los niveles de Atf1, tanto a nivel basal como en cultivos inducidos por estrés. La disminución en los niveles de Atf1



podía ser debida a una menor estabilidad del factor de transcripción. Sin embargo, la vida media de Atf1 no mostró diferencias significativas entre las células control y el mutante delecionado en *cpc2*⁺ (Figura RI.18B).

Puesto que Atf1 regula positivamente su propia expresión a nivel transcripcional

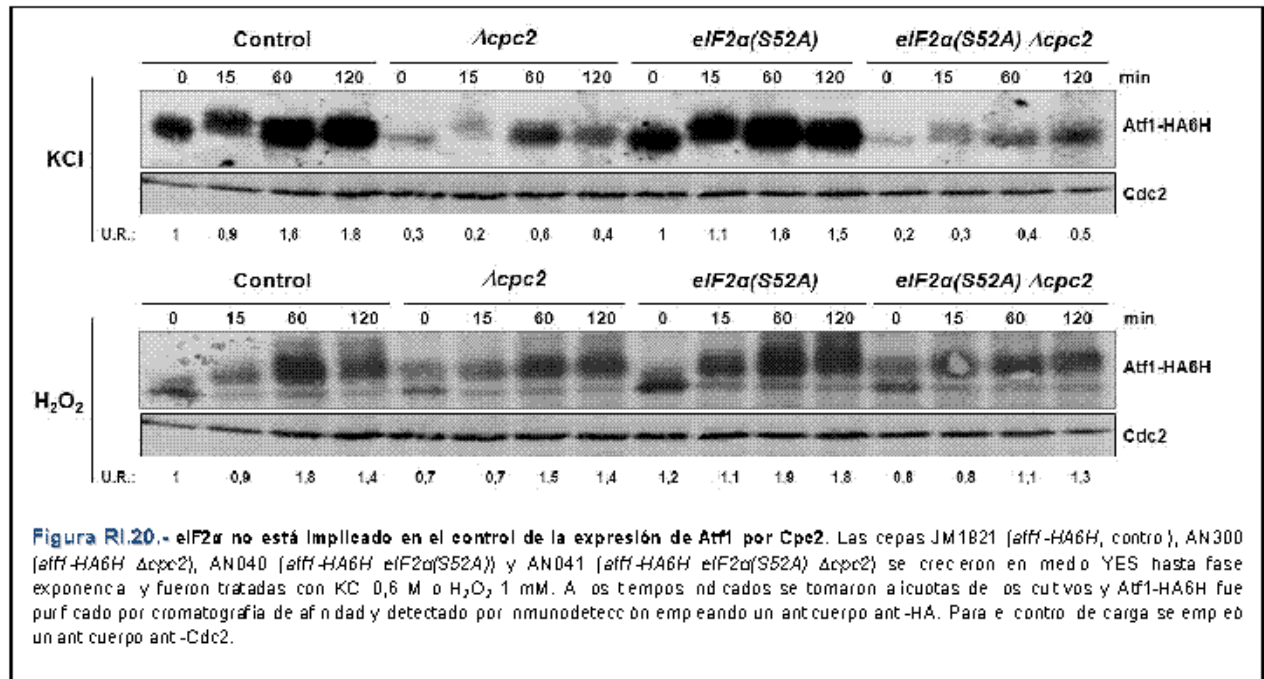
(Wilkinson *et al.*, 1996), el descenso de sus niveles proteicos en el mutante $\Delta cpc2$ podría ser consecuencia de un déficit en la expresión a nivel transcripcional. Para comprobarlo, analizamos los niveles de expresión del ARNm de *atf1*⁺ tanto en el control como en el mutante $\Delta cpc2$ tras someter a los respectivos cultivos a un estrés por KCl mediante experimentos tipo *Northern*. Los resultados expuestos en la Figura RI.19 muestran que los niveles del ARNm de *atf1*⁺ en células vegetativas y en respuesta a estrés no se vieron afectados significativamente por la ausencia de Cpc2.

A continuación analizamos los niveles de expresión de *pyp1*⁺ y *pyp2*⁺. Aunque previamente habíamos descrito que los niveles de Pyp1 y Pyp2 están disminuidos en el mutante $\Delta cpc2$, la expresión de los respectivos ARNm fue similar a la de las células control (Figura RI.19).

Estos resultados sugieren que Cpc2 ejerce una regulación positiva sobre la expresión de Atf1, Pyp1 y Pyp2 a nivel traduccional promoviendo la traducción de sus correspondientes ARN mensajeros.

3.4.- El factor de inicio de la traducción eIF2 α no está implicado en la regulación de la expresión de Atf1 por Cpc2

En *S. pombe*, la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 α en un residuo de serina en posición 52 (Ser⁵¹ en eucariotas superiores) es crítica para la inhibición global del inicio de la traducción proteica que experimenta esta levadura en respuesta a múltiples tipos de estrés (Zhan *et al.*, 2002). Para investigar la posible relación entre Cpc2 y la fosforilación del eIF2 α en el control de la traducción de Atf1 bajo condiciones de estrés, deletamos *cpc2*⁺ en una estirpe que expresa una versión no fosforilable en Ser⁵² de eIF2 α (*eIF2 α (S52A)*; Tvegård *et al.*, 2007). Como se muestra en la Figura RI.20, la falta de fosforilación de eIF2 α en Ser⁵² no afectó de manera significativa a la traducción de Atf1 en respuesta a estrés osmótico u oxidativo por H₂O₂. Además, los niveles de Atf1 en células vegetativas y en respuesta a estrés se vieron comprometidos de manera similar tanto en células $\Delta cpc2$ como en el doble mutante $\Delta cpc2$ *eIF2 α (S52A)* (Figura RI.20). Estos datos sugieren que el papel de Cpc2 como regulador positivo de la traducción de Atf1 es totalmente independiente de la función de eIF2 α como regulador del inicio de la traducción.



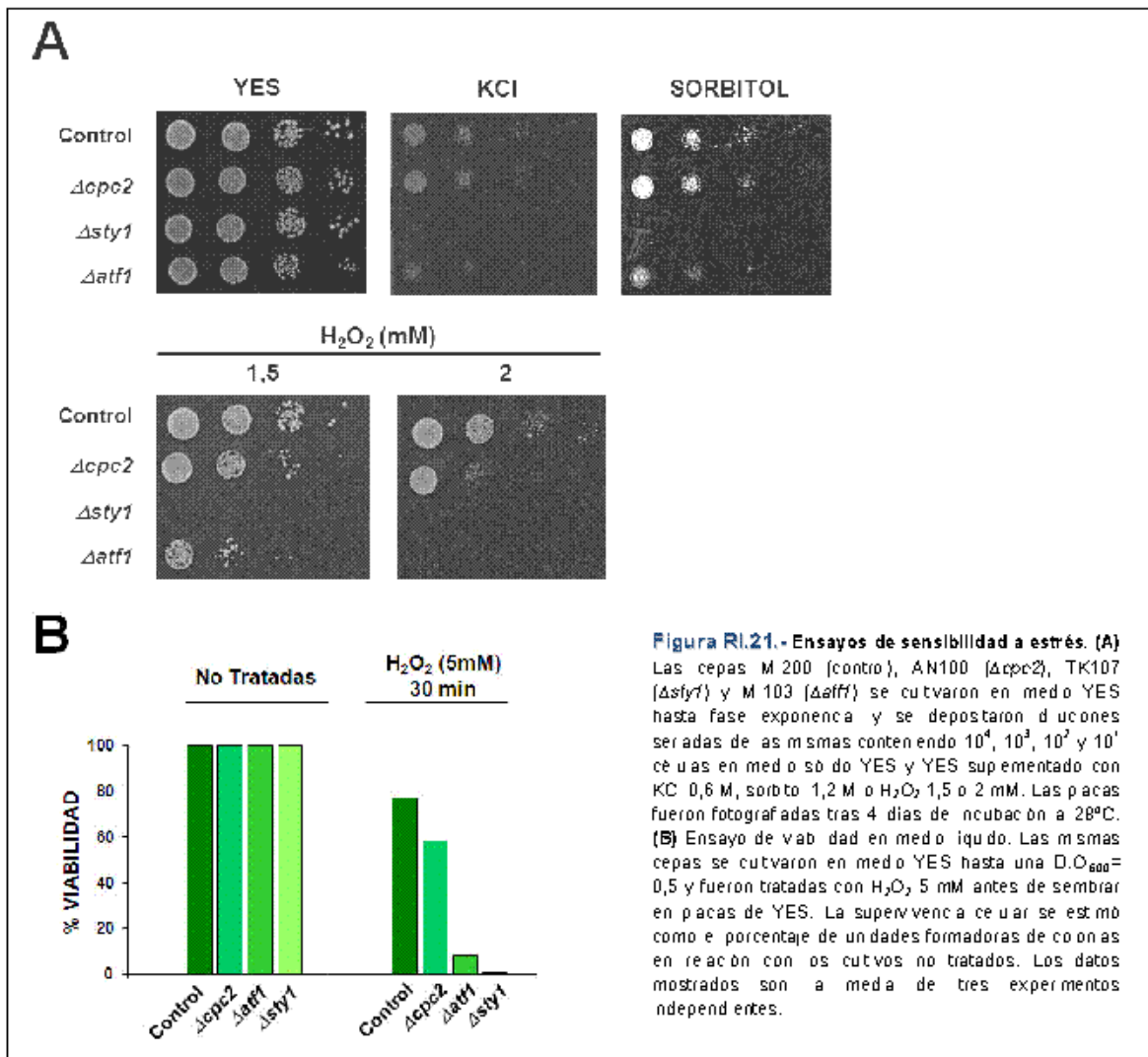
4.- Cpc2 PARTICIPA EN LA RESPUESTA DE *S. pombe* FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

4.1.- Sensibilidad a estrés del mutante nulo $\Delta cpc2$

Los mutantes de *S. pombe* carentes de la MAP quinasa Sty1 o del factor transcripcional Atf1 son sensibles frente a diversos tipos de estrés (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1995, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Decidimos a continuación estudiar si la disminución en los niveles de Atf1 que presentan los mutantes $\Delta cpc2$ afectaba a la viabilidad celular en condiciones de estrés. Para ello comparamos el crecimiento de células control, $\Delta sty1$, $\Delta atf1$ y $\Delta cpc2$ en medio sólido suplementado con compuestos como el KCl (estrés osmótico salino), sorbitol (estrés osmótico no salino) y H₂O₂ (estrés oxidativo).

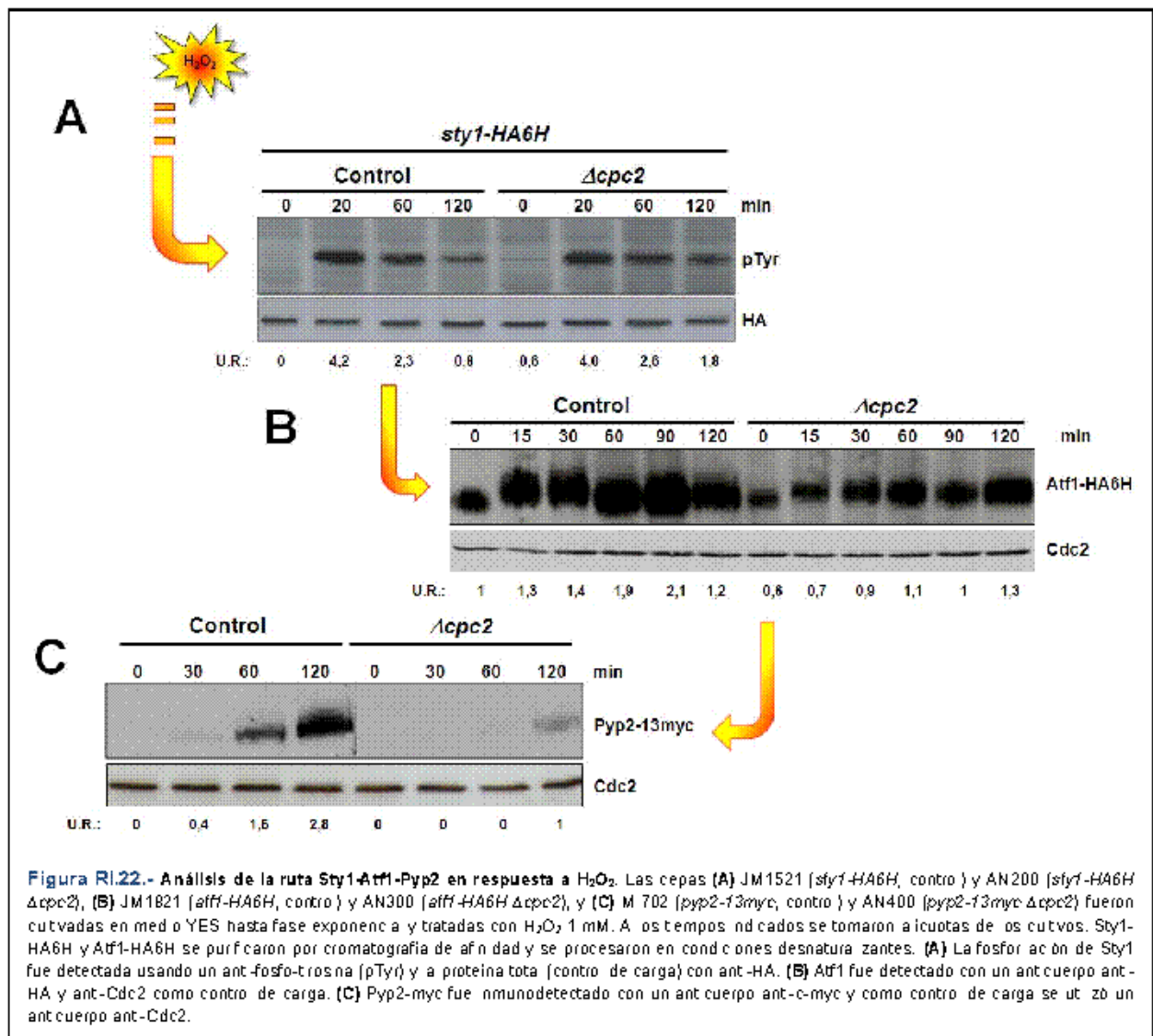
A diferencia de los mutantes $\Delta sty1$ o $\Delta atf1$, el mutante $\Delta cpc2$ no presentó inhibición del crecimiento en presencia de KCl o sorbitol. Sin embargo, sí se observaba una cierta sensibilidad al crecimiento en presencia de H₂O₂, aunque mucho menos acusada que en los mutantes Δsty o $\Delta atf1$ (Figura RI.21A).

Encontramos una respuesta muy similar al comparar la viabilidad de cultivos líquidos de las mismas cepas tras ser sometidas a un tratamiento con H₂O₂ 5 mM durante 30 minutos (Figura RI.21B).



4.2.- La actividad de Cpc2 es importante en la respuesta a estrés oxidativo

Dado que la sensibilidad que muestra el mutante $\Delta cpc2$ frente al H₂O₂ no es muy pronunciada, tratamos de estudiar esta respuesta con más detalle. Así, analizamos la cinética de activación de Sty1 y los niveles de Atf1 y Pyp2 en cultivos de células control y del mutante $\Delta cpc2$ en respuesta al estrés. Como muestra la Figura RI.22, en células carentes de $cpc2^+$ el grado de fosforilación de Sty1 en Tyr¹⁷³ permaneció elevado tanto en condiciones basales como en respuesta a H₂O₂ 1 mM (Figura RI.22A). Los niveles de Atf1 y Pyp2 también fueron menores en el mutante durante el tratamiento con H₂O₂ (Figura RI.22B y RI.22C). Estos datos confirman que Cpc2 es un regulador positivo global que también controla los niveles de ambas proteínas durante el estrés oxidativo mediado por H₂O₂.



4.3.- La cinética de acumulación nuclear de Pap1 en respuesta al peróxido de hidrógeno está alterada en el mutante $\Delta cpc2$

Con objeto de profundizar en el análisis de la sensibilidad al peróxido del mutante $\Delta cpc2$ diseñamos una estrategia basada en el uso de Pap1p como indicador del estado *redox* de la célula. Pap1 es un importante factor de transcripción implicado en la respuesta de *S. pombe* frente a estrés oxidativo a dosis moderadas o bajas de peróxido de hidrógeno (Vivancos *et al.* 2006). En células creciendo vegetativamente, Pap1p permanece en el citoplasma, sin embargo, en respuesta al H_2O_2 , sufre una oxidación reversible de ciertos residuos de cisteína

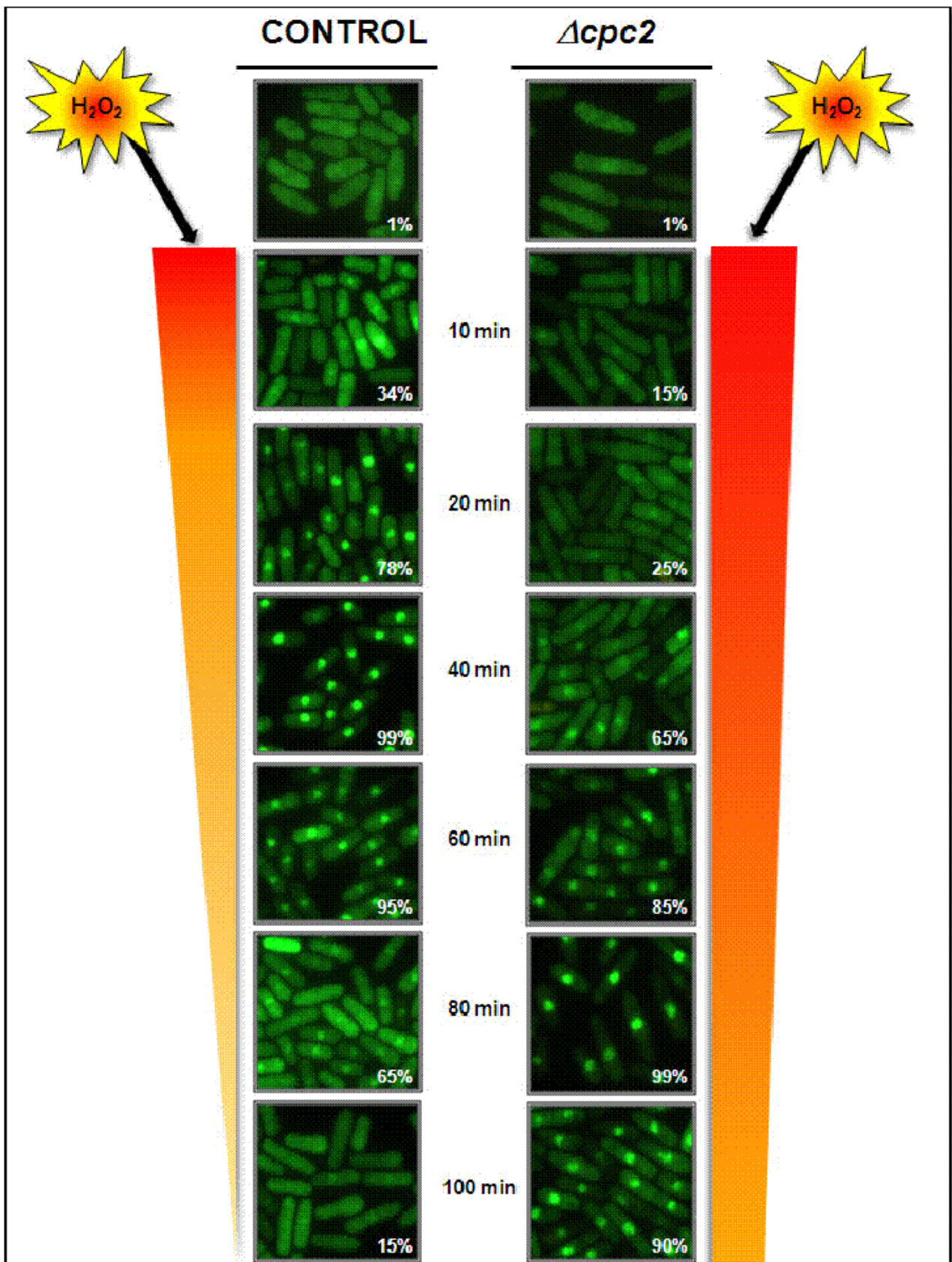


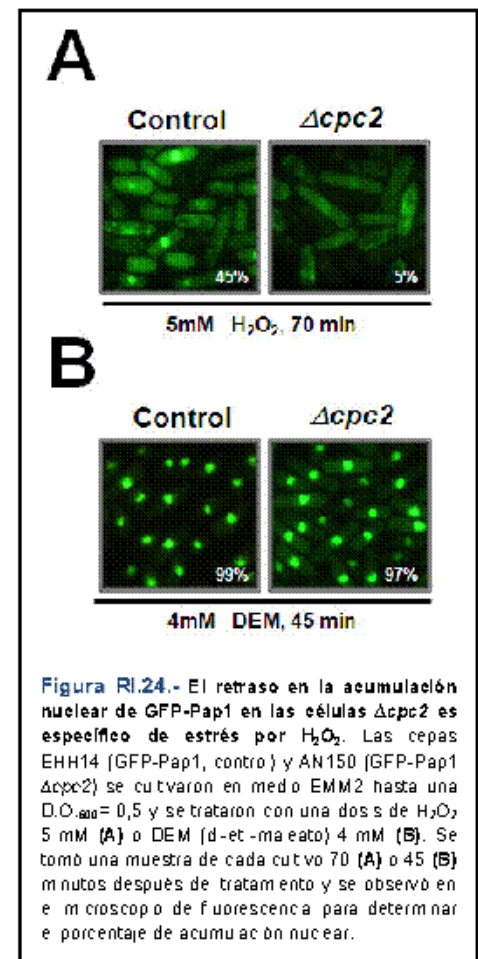
Figura RI.23.- La acumulación nuclear de GFP-Pap1 está retrasada en las células $\Delta cpc2$. Las cepas EHH14 (GFP-Pap1, control) y AN150 (GFP-Pap1 $\Delta cpc2$) se cultivaron en medio EMM2 hasta una $D.O_{600} = 0,5$ y se trataron con H_2O_2 1 mM. A los tiempos indicados se tomaron 5 microlitros de los cultivos y el porcentaje de acumulación nuclear de GFP-Pap1 se determinó por observación a microscopio de fluorescencia.

que promueve su acumulación nuclear y la consecuente activación transcripcional de genes esenciales para la respuesta defensiva al estrés oxidativo (Vivancos *et al.*, 2006). En presencia de concentraciones moderadas o altas concentraciones de H_2O_2 (como ocurre por ejemplo durante el ayuno de glucosa), el tiempo necesario para que tenga lugar la acumulación nuclear de Pap1 se retrasa hasta que la actividad transcripcional mediada por la ruta Sty1-Atf1 reduce el H_2O_2 intracelular hasta unos niveles que permiten a Pap1 adquirir su conformación oxidada. Es decir, en presencia de peróxido de hidrógeno el tiempo necesario para observar la acumulación nuclear de Pap1 incrementa proporcionalmente con la dosis del agente oxidante. Es entonces cuando Pap1 activa la expresión de genes detoxificantes específicos (Madrid *et al.*, 2004; Vivancos *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta estos precedentes, analizamos la cinética de localización celular de Pap1p en la cepa EHH14 (control) y en el mutante AN050 ($\Delta cpc2$) tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno 1 mM. Ambas cepas expresan una versión de Pap1 fusionada en su extremo N-terminal a GFP y cuya expresión se encuentra regulada por una versión atenuada (41X) del promotor *nmt1* (Vivancos *et al.*, 2004). Como se ha descrito anteriormente (Vivancos *et al.*, 2004) y se observa en la Figura RI.23, la acumulación nuclear de Pap1 es máxima 40-50 minutos después del tratamiento, relocalizándose lentamente al citoplasma a partir de ese momento. Sin embargo, la ausencia de *cpc2*⁺ produjo un claro retraso (una media de 30 minutos en tres experimentos independientes) en la acumulación nuclear de Pap1 en las mismas condiciones (Figura RI.23). Observamos un retraso muy similar cuando empleamos concentraciones más altas del oxidante (5 mM, Figura RI.24A).

Es importante destacar que el defecto observado no se debe a diferencias en los niveles de Pap1, ya que estos son prácticamente idénticos en el control y en el mutante $\Delta cpc2$ (datos no mostrados).

Además, se trata de un defecto específico en la respuesta al peróxido de hidrógeno, ya que la cinética de acumulación nuclear de Pap1 fue idéntica en ambas cepas tras el tratamiento con DEM (Di-Etil-Maleato), un pro-oxidante que provoca una modificación irreversible de



Pap1 no relacionada con la producida por el H₂O₂ (Figura RI.24B). El retraso observado en el tiempo de acumulación de Pap1 en el mutante $\Delta cpc2$ en relación al control sugiere que estos mutantes no detoxifican correctamente los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno.

4.4.- Cpc2 modula la respuesta al estrés por H₂O₂ a nivel transcripcional y traduccional

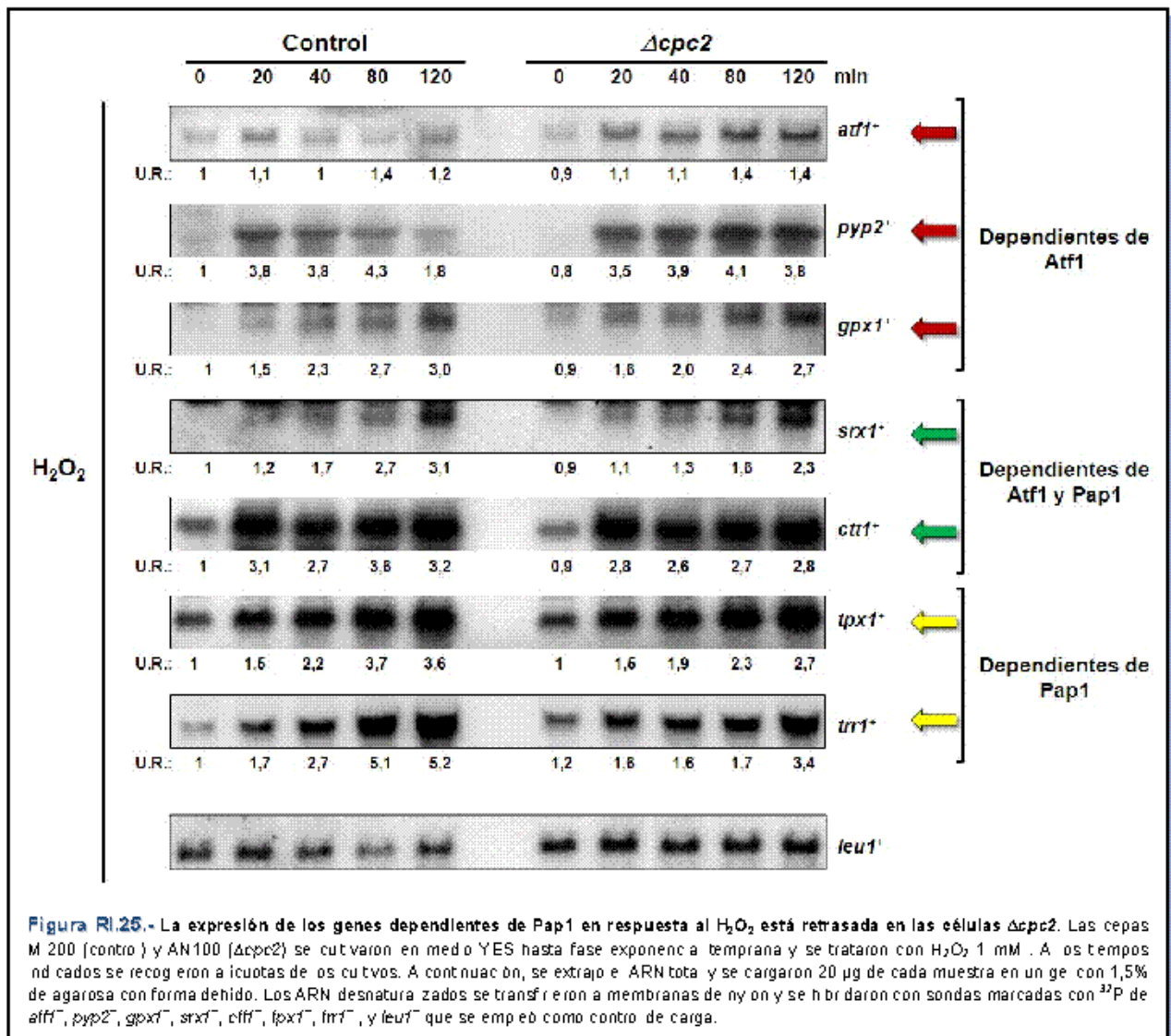
El siguiente paso para estudiar el papel de Cpc2 en la respuesta al estrés oxidativo consistió en realizar un análisis comparativo mediante experimentos tipo *Northern* de la expresión de los genes específicamente inducidos por Sty1-Atf1 y Pap1 en cultivos de células control y el mutante $\Delta cpc2$ tratados con H₂O₂.

Como se observa en la Figura RI.25, la inducción transcripcional por H₂O₂ 1 mM de los genes dependientes exclusivamente de Atf1, como *atf1*⁺, *pyp2*⁺ o *gpx1*⁺ (que codifica una glutatión peroxidasa; Yamada *et al.*, 1999) no se vio afectada de manera significativa por la deleción de *cpc2*⁺. Este resultado sugiere que la presencia de menores niveles de Atf1 en el mutante $\Delta cpc2$ no compromete la respuesta transcripcional frente al estrés oxidativo mediada por este factor transcripcional.

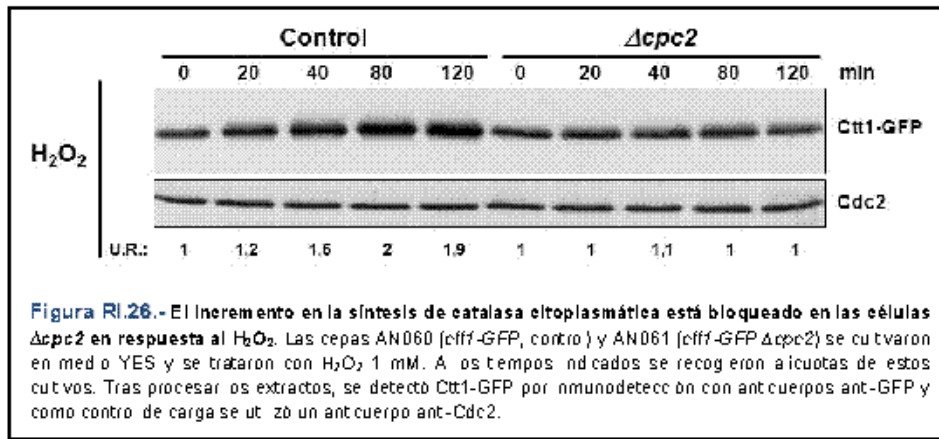
En comparación con el control, el mutante $\Delta cpc2$ mostró una pequeña disminución en los niveles de activación transcripcional de los genes *srx1*⁺ (sulforredoxina; Quinn *et al.*, 2002) y *ctt1*⁺ (catalasa citoplasmática; Degols and Russell, 1997), cuya expresión es dependiente tanto de Atf1 como Pap1 (Quinn *et al.*, 2002) (Figura RI.25). Por el contrario, la cinética de inducción de los genes dependientes únicamente de Pap1, como *tpx1*⁺ (tioredoxina peroxidasa; Benko *et al.*, 1998), y particularmente de *trr1*⁺ (tioredoxina reductasa) experimentó un retraso significativo en un fondo genético $\Delta cpc2$, coincidiendo con el retraso en la acumulación nuclear de Pap1 (Figura RI.23).

Sin embargo, los defectos mínimos observados en la transcripción de los genes dependientes de Atf1 no parecían justificar el retraso en la acumulación nuclear de Pap1 en el mutante $\Delta cpc2$ en presencia de H₂O₂. Por ello, decidimos determinar los niveles celulares de la catalasa citoplasmática (Ctt1), un enzima clave implicado en la detoxificación del estrés oxidativo en las células eucariotas y cuya expresión es dependiente de Atf1 y Pap1. Para ello construimos cepas que expresan versiones genómicas de Ctt1 fusionadas a un epítipo de GFP. Como muestra la Figura RI.26, mientras en las células control tratadas con peróxido 1 mM se detecta un incremento moderado pero reproducible en la síntesis de Ctt1 a lo largo del tiempo, dicho incremento no se observa en ausencia de Cpc2. Por tanto, parece que Cpc2 es

un regulador positivo de los niveles intracelulares de la catalasa citoplasmática en respuesta a peróxido de hidrógeno.



En definitiva, el conjunto de estos resultados sugiere que Cpc2 ejerce en *S. pombe* un papel importante a nivel traduccional en la defensa celular frente a altas dosis de peróxido de hidrógeno, favoreciendo la síntesis de enzimas como la catalasa citoplasmática, cuya actividad detoxificante es esencial para permitir la posterior expresión de genes detoxificantes dependientes de Pap1.

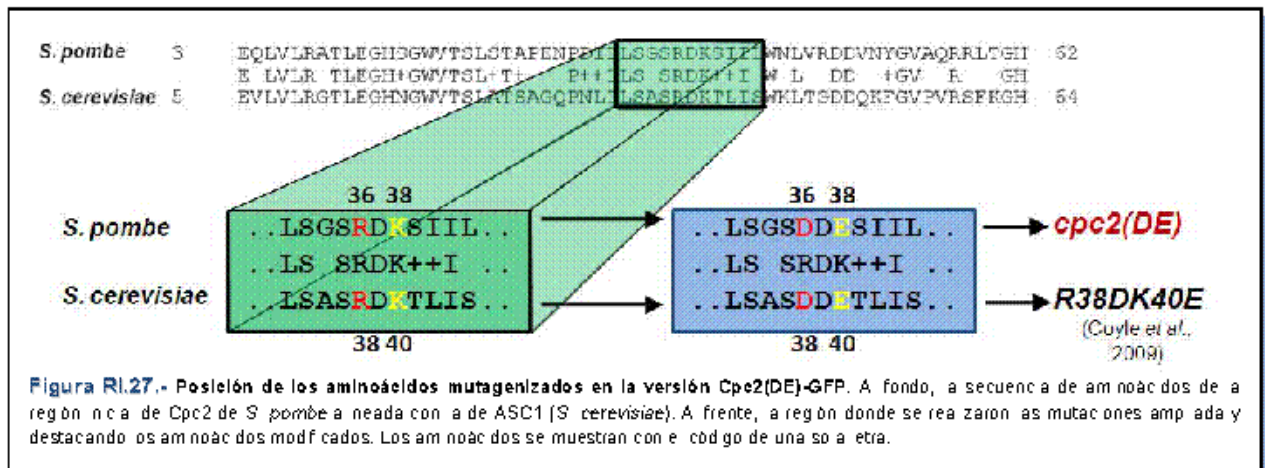


5.- RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE Cpc2 EN EL RIBOSOMA

Un trabajo publicado recientemente ha demostrado que ciertos aminoácidos presentes en *ASC1*, el ortólogo de *RACK1* de *Saccharomyces cerevisiae*, son esenciales para su unión al ribosoma (Coyle *et al.*, 2009). Los resultados presentados hasta ahora en el presente trabajo destacan la importancia de *Cpc2* como un elemento que, de manera selectiva, regula la expresión a nivel traduccional de proteínas moduladoras de la actividad de las rutas de MAP quininas y la respuesta a estrés. Por ello, decidimos centrar nuestro esfuerzo en estudiar la significación de la unión de *Cpc2* al ribosoma sobre su actividad biológica.

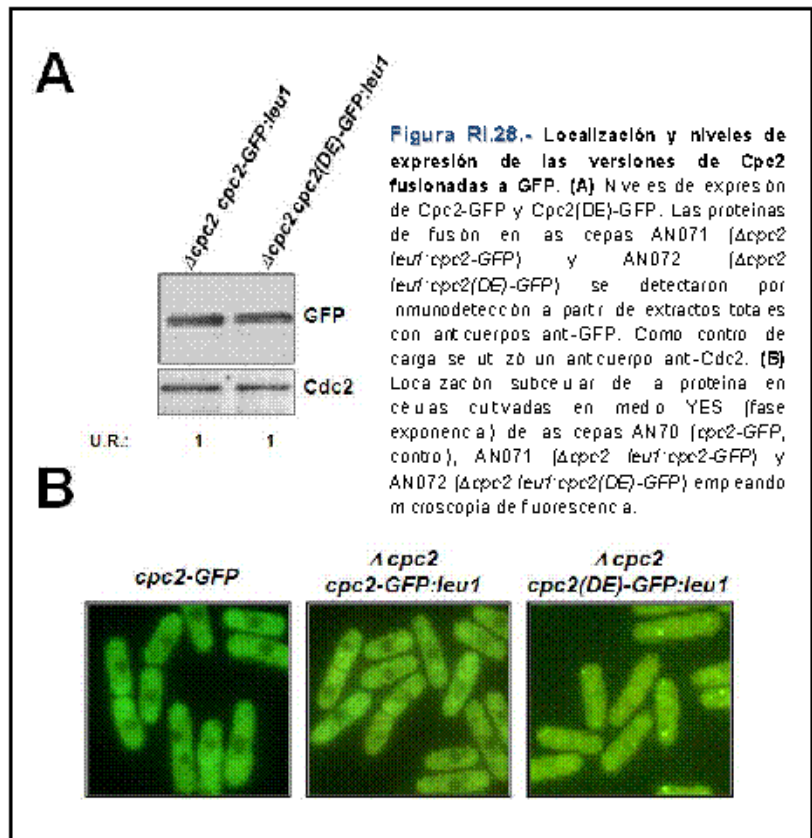
5.1.- Los residuos de Arginina-36 y Lisina-38 son esenciales para la interacción de *Cpc2* con el ribosoma

Los aminoácidos cargados positivamente Arg^{36} y Lys^{40} , presentes en una de las hélices beta de *ASC1*, son esenciales para de su unión *in vivo* a la subunidad 40S del ribosoma (Coyle *et al.*, 2009). Basándonos en el alto grado de identidad existente entre *ASC1* y *Cpc2*, obtuvimos mediante mutagénesis dirigida una versión de *Cpc2* en la que los residuos conservados Arg^{36} y Lys^{38} fueron sustituidos por ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente (Figura RI.27). Esta nueva versión de *Cpc2*, denominada *Cpc2(DE)*, se clonó junto con su promotor endógeno en un plásmido integrativo como una fusión en su extremo C-terminal a un epítipo de GFP (plásmido *pIL-cpc2(DE)-GFP*; ver Materiales y Métodos).



Esta construcción y una versión silvestre del gen (plásmido *pIL-cpc2-GFP*) se introdujeron por separado en un fondo genético $\Delta cpc2$, procediendo a continuación a analizar la expresión y localización subcelular de ambas fusiones mediante microscopía de fluorescencia. Como se puede ver en la Figura RI.28A, los niveles de expresión de la versión control (Cpc2-GFP) y mutante (Cpc2(DE)-GFP) de Cpc2 son muy similares. Ambas fusiones localizaron en el citoplasma, de manera similar a una cepa que expresa una versión genómica de Cpc2-GFP desde su propio locus (cepa AN070) (Figura RI.28B) y tal y como había sido descrito en un trabajo anterior (Shor et al., 2003).

Sin embargo, la localización citoplasmática de la versión mutante es más difusa, y en algunas células se observan acúmulos proteicos distribuidos de forma aleatoria (Figura RI.28B).



Un análisis del perfil de polisomas mediante fraccionamiento en gradiente de sacarosa (ver Materiales y Métodos) permitió determinar la distribución subcelular de ambas versiones de Cpc2. Tal como había sido descrito previamente, la versión control (Cpc2-GFP) localizó preferentemente en las fracciones correspondientes a la subunidad 40S, así como en monosomas (80S) y polisomas (Figura RI.29). Por el contrario, la versión mutante Cpc2(DE)-GFP perdió completamente la capacidad para unirse al ribosoma *in vivo*, fraccionando en su totalidad en la fracción soluble no particulada (Figura RI.29). Estos resultados demuestran que, de manera similar a lo que ocurre con ASC1, los residuos conservados con carga positiva Arg³⁶ y Lys³⁸ son esenciales para la interacción de Cpc2 con la subunidad 40S del ribosoma en *S. pombe*.

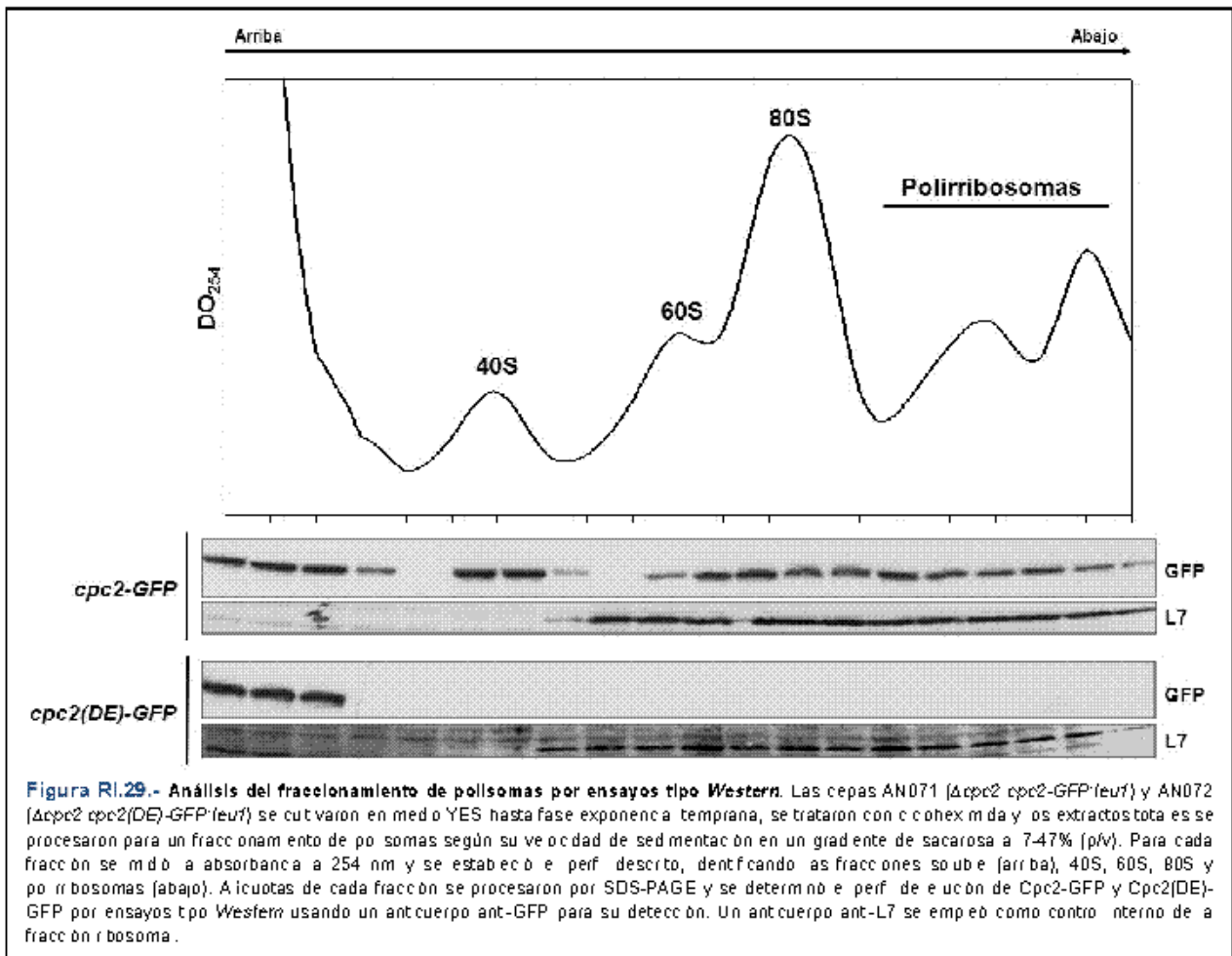


Figura RI.29.- Análisis del fraccionamiento de polisomas por ensayos tipo Western. Las cepas AN071 ($\Delta cpc2$ cpc2-GFP^{leu1}) y AN072 ($\Delta cpc2$ cpc2(DE)-GFP^{leu1}) se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial temprana, se trataron con cicloheximida y los extractos totales se procesaron para un fraccionamiento de polisomas según su velocidad de sedimentación en un gradiente de sacarosa a 7-47% (p/v). Para cada fracción se midió la absorbancia a 254 nm y se estableció el perfil descrito, definiendo las fracciones soluble (arriba), 40S, 60S, 80S y polirribosomas (abajo). Aliquotas de cada fracción se procesaron por SDS-PAGE y se determinó el perfil de ubicación de Cpc2-GFP y Cpc2(DE)-GFP por ensayos tipo Western usando un anticuerpo anti-GFP para su detección. Un anticuerpo anti-L7 se empleó como control interno de la fracción ribosoma.

5.2.- La presencia de Cpc2 en el ribosoma es necesaria para su función como regulador positivo de distintas proteínas reguladoras de la respuesta a estrés

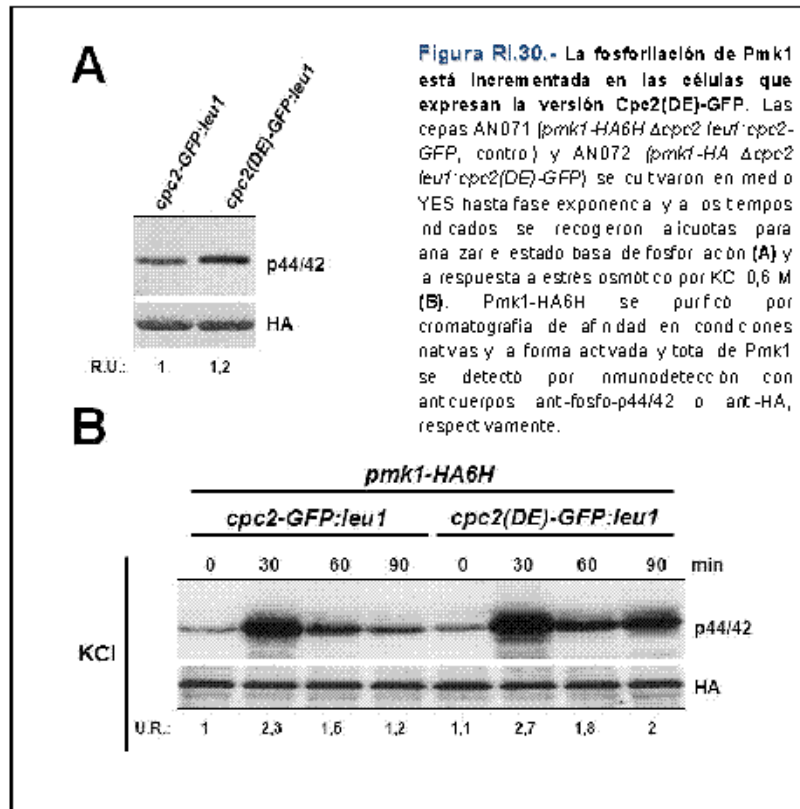


Figura RI.30.- La fosforilación de Pmk1 está incrementada en las células que expresan la versión Cpc2(DE)-GFP. Las cepas AN071 (*pmk1-HA6H Δcpc2 leu1:cpc2-GFP*, control) y AN072 (*pmk1-HA Δcpc2 leu1:cpc2(DE)-GFP*) se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial y a los tiempos indicados se recogieron alicuotas para analizar el estado basal de fosforilación (A) y a respuesta a estrés osmótico por KCl 0,6 M (B). Pmk1-HA6H se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones nativas y a forma activada y total de Pmk1 se detectó por inmunodetección con anticuerpos anti-fosfo-p44/42 o anti-HA, respectivamente.

Una vez que comprobamos que la versión de Cpc2(DE) no se une al ribosoma, disponíamos de una herramienta ideal para valorar la relevancia de dicha asociación para la función biológica de Cpc2.

En el caso de la ruta de MAPK de integridad celular, la fosforilación basal de Pmk1 se vio incrementada ligeramente en un fondo que expresa la versión "no ribosomal" de Cpc2 en comparación con el control (Figura RI.30A), lo que confirma la importancia de la

localización ribosomal de Cpc2 en la regulación negativa de dicha MAP quinasa. Además, la desfosforilación de Pmk1 durante un estrés osmótico salino (KCl 0,6 M) fue más lenta en la estirpe mutante en comparación al control (Figura RI.30B), presentando unos niveles de activación elevados durante un tiempo más prolongado.

Nuestro siguiente paso consistió en estimar los niveles de expresión de las fosfatasa de tirosina Pyp1 y Pyp2 en respuesta a estrés. Los resultados de la Figura RI.31, indican que las células que expresan la versión no ribosomal de Cpc2 presentan menores

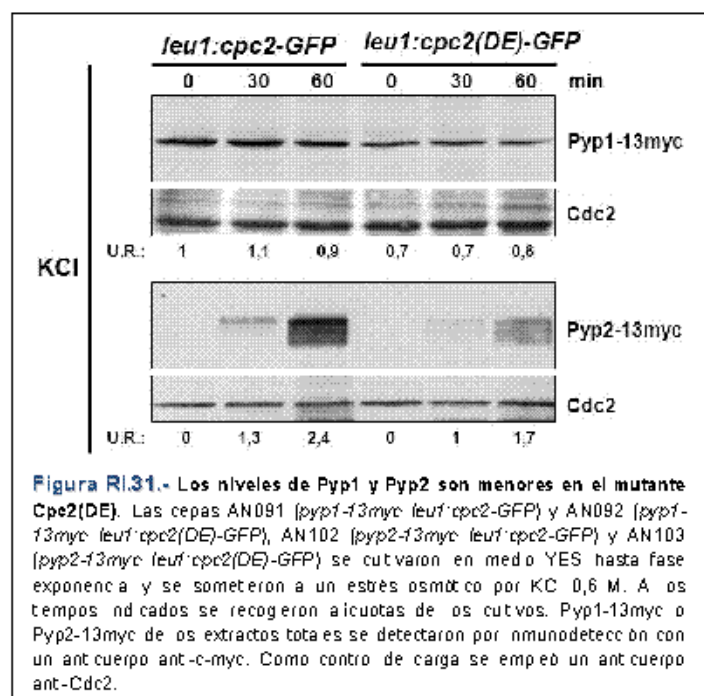
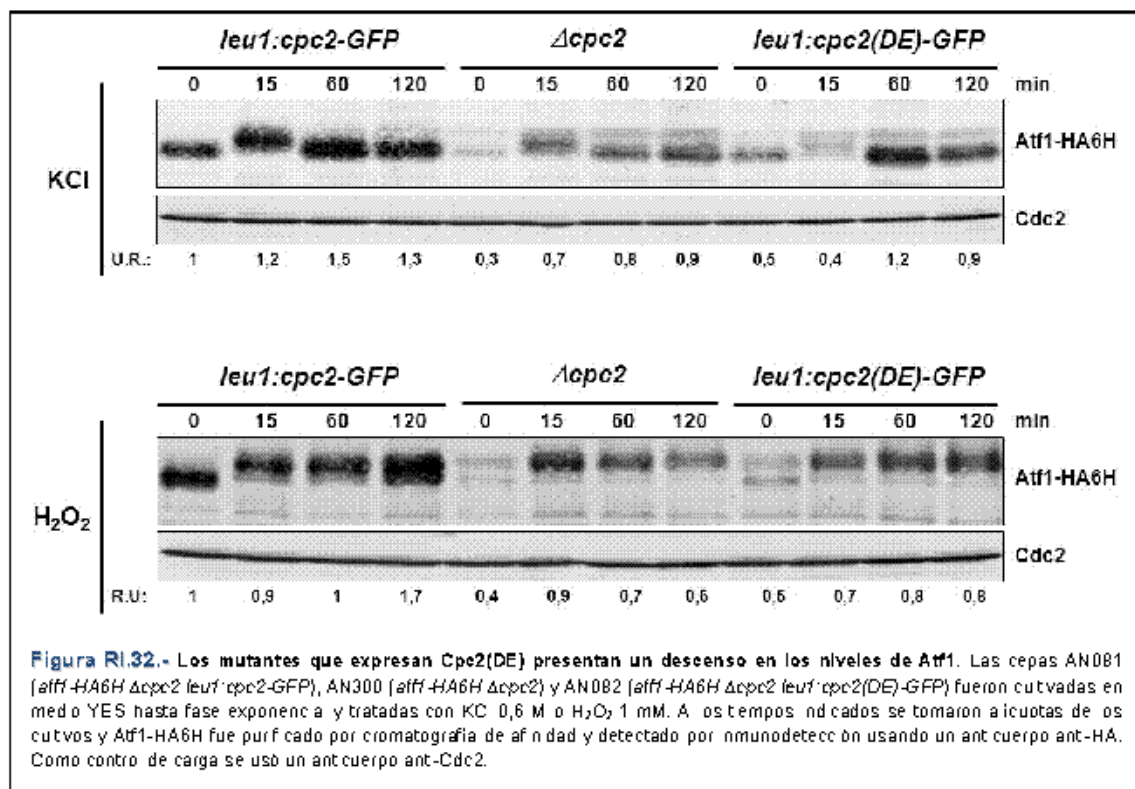


Figura RI.31.- Los niveles de Pyp1 y Pyp2 son menores en el mutante Cpc2(DE). Las cepas AN091 (*pyp1-13myc leu1:cpc2-GFP*) y AN092 (*pyp1-13myc leu1:cpc2(DE)-GFP*), AN102 (*pyp2-13myc leu1:cpc2-GFP*) y AN103 (*pyp2-13myc leu1:cpc2(DE)-GFP*) se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial y se sometieron a un estrés osmótico por KCl 0,6 M. A los tiempos indicados se recogieron alicuotas de los cultivos. Pyp1-13myc o Pyp2-13myc de los extractos totales se detectaron por inmunodetección con un anticuerpo anti-c-myc. Como control de carga se empleó un anticuerpo anti-Cdc2.

niveles de Pyp1 y Pyp2 durante el estrés osmótico que la cepa que expresa la versión silvestre (control), lo que explicaría el incremento en el nivel basal y el defecto en la desactivación de la MAP quinasa Pmk1 mostrado anteriormente.

A continuación, analizamos los niveles del factor de transcripción Atf1, tanto en células vegetativas como en cultivos sometidos a distintos tipos de estrés (osmótico salino por KCl y oxidativo por peróxido de hidrógeno). Como se observa en la Figura R1.32, el mutante que expresa la versión no ribosomal de Cpc2 presenta unos niveles significativamente más bajos de Atf1 que el control (tanto a nivel basal como tras la inducción por estrés) y más parecidos a los del mutante carente de Cpc2.



En conjunto, nuestros resultados confirman que la unión de Cpc2 al ribosoma es esencial para una traducción eficiente de las fosfatasa Pyp1 y Pyp2 que regulan negativamente el estado de fosforilación y la actividad de las rutas de MAP quinasas activable por estrés (Sty1) y de integridad celular (Pmk1), así como del factor transcripcional Atf1, diana de Sty1 y elemento clave en la defensa global al estrés en *S. pombe*.

Role for RACK1 Orthologue Cpc2 in the Modulation of Stress Response in Fission Yeast

Andrés Núñez, Alejandro Franco, Marisa Madrid,* Teresa Soto, Jero Vicente, Mariano Gacto, and José Cansado

Yeast Physiology Group, Department of Genetics and Microbiology, Facultad de Biología, University of Murcia, 30071 Murcia, Spain

Submitted May 13, 2009; Revised July 2, 2009; Accepted July 9, 2009
Monitoring Editor: Daniel J. Lew

The receptor of activated C kinase (RACK1) is a protein highly conserved among eukaryotes. In mammalian cells, RACK1 functions as an adaptor to favor protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation and subsequent activation of c-Jun NH₂-terminal kinase mitogen-activated protein kinase. Cpc2, the RACK1 orthologue in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, is involved in the control of G2/M transition and interacts with Pck2, a PKC-type protein member of the cell integrity Pmk1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Both RACK1 and Cpc2 are structural components of the 40S ribosomal subunit, and recent data suggest that they might be involved in the control of translation. In this work, we present data supporting that Cpc2 negatively regulates the cell integrity transduction pathway by favoring translation of the tyrosine-phosphatases Pyp1 and Pyp2 that deactivate Pmk1. In addition, Cpc2 positively regulates the synthesis of the stress-responsive transcription factor Atf1 and the cytoplasmic catalase, a detoxificant enzyme induced by treatment with hydrogen peroxide. These results provide for the first time strong evidence that the RACK1-type Cpc2 protein controls from the ribosome the extent of the activation of MAPK cascades, the cellular defense against oxidative stress, and the progression of the cell cycle by regulating positively the translation of specific gene products involved in key biological processes.

INTRODUCTION

Receptor of activated protein C kinase (RACK1) is a 36-kDa protein highly conserved in eukaryotic cells and a member of the family of proteins with WD repeats (McCahill *et al.*, 2002). This group includes a large number of proteins involved in the regulation of key biological functions such as signal transduction, cell cycle control, vesicular trafficking, chromatin organization, and programmed cell death (Smith *et al.*, 1999). Cryo-electron microscopy and x-ray crystallographic data indicate that RACK1 displays a β -propeller structure, with seven blades corresponding to the WD repeat domains, in a general conformation closely resembling the β -subunit structure of heterotrimeric G proteins (Sengupta *et al.*, 2004; Chaudhuri *et al.*, 2008; Coyle *et al.*, 2009). RACK1 was initially identified by its ability to interact with protein kinase C isoforms, but later studies demonstrated that also binds in vivo other proteins related to signal transduction pathways, leading to the suggestion that it might act as scaffold to recruit elements involved in cell

signaling (McCahill *et al.*, 2002; Sengupta *et al.*, 2004). In particular, mammalian RACK1 seems relevant to the regulation of angiogenesis, tumor growth, neuronal response, and apoptosis (McCahill *et al.*, 2002). Recently, a direct relationship has been established between RACK1 and the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) signal transduction pathway because RACK1 favors the protein kinase C (PKC)-mediated Ser129 phosphorylation and subsequent activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase JNK induced by phorbol esters, tumor necrosis factor- α , and UV radiation (López-Bergami *et al.*, 2005).

Schizosaccharomyces pombe contains an orthologue of RACK1, named Cpc2, whose amino acid sequence shows ~70% identity with the human version (McLeod *et al.*, 2000). The *cpc2*⁺ gene was identified in fission yeast through its action on protein kinase Ran1/Pat1, which inhibits sexual development by regulating the transition from mitosis to meiosis (McLeod *et al.*, 2000). Mutants lacking Cpc2 show distinct phenotypes such as delayed G2/M transition with increased cell size, defective G1 arrest under nitrogen deprivation, and inability to grow at high temperature (McLeod *et al.*, 2000). Another relevant biological function of Cpc2/RACK1 is related to translation. This protein has been shown as a structural component of the 40S ribosomal subunit (Shor and McLeod, 2003; Baum *et al.*, 2004; Coyle *et al.*, 2009). Recent analyses of the Cpc2 orthologue Asc1 in *Saccharomyces cerevisiae* indicate a location close to the exit tunnel for mRNAs through an interaction that is dependent on WD domain I (Coyle *et al.*, 2009). In *S. pombe*, the absence of Cpc2 decreases the synthesis of some proteins in a selective manner (Shor and McLeod, 2003). However, the exact role of RACK1/Cpc2/Asc1 as a regulator in translation remains to be established (Nilsson *et al.*, 2004).

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E09-05-0388>) on July 22, 2009.

* Present address: Paterson Institute for Cancer Research, University of Manchester, Manchester M20 4BX, United Kingdom.

Address correspondence to: Mariano Gacto (maga@um.es).

Abbreviations used: EMM2, Edinburgh minimal medium 2; GFP, green fluorescent protein; HA6H, epitope comprising hemagglutinin antigen plus six histidine residues; HA, hemagglutinin; MAPK, mitogen activated protein kinase; PKC, protein kinase C; SAPK, stress activated protein kinase; YES, yeast extract plus supplements.

Similar to RACK1, Cpc2 associates in vivo with Pck2, one of the two C-type protein kinases present in the fission yeast (Won *et al.*, 2001). Also, it seems likely that Cpc2 may somehow regulate Pck2-dependent cell signaling in this yeast because the lethal effect of *pck2*⁺ overexpression is attenuated by simultaneous overexpression of *cpc2*⁺ (Won *et al.*, 2001). In this context, several researchers, including ourselves, have shown that Pck2 is a member of the cell integrity pathway that regulates morphogenesis, cell wall construction, cytokinesis, and ion homeostasis (Ma *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2008). The key element of this transduction pathway is MAP kinase Pmk1, which is activated during cell separation and in response to many adverse conditions such as hyper- and hypo-osmotic stress, glucose withdrawal, presence of compounds disturbing the cell wall, and oxidative stress induced by hydroperoxides or pro-oxidant stressors (Madrid *et al.*, 2006, 2007). In addition, *S. pombe* shows an MAP kinase pathway activatable by stress (SAPK), homologue to the metazoan SAPK, whose central element is MAPK Sty1, which results activated under various stressing conditions (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1995; Degols *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 2002). Once activated, Sty1 associates in vivo and phosphorylates Atf1, a leucine zipper domain transcription factor orthologue to ATF-2 in higher cells, which regulates gene expression determining the adaptive response of *S. pombe* to different stresses (Degols *et al.*, 1996; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003). Among the various phosphatases able to dephosphorylate Sty1 are tyrosine phosphatases Pyp1 and Pyp2, and serine-threonine phosphatases Ptc1 and Ptc2 (Hohmann, 2002). We have recently shown that Pyp1, Pyp2, and Ptc1, whose transcriptional activation is dependent on Sty1-Atf1 function, interact also with Pmk1 in vivo and may participate in its dephosphorylation, thus providing a first evidence for the existence of "cross-talk" between the two MAP kinase (MAPK) pathways in *S. pombe* (Madrid *et al.*, 2007).

Extensive experimental evidence supports a high functional homology among the intracellular signaling pathways of the fission yeast and higher eukaryotes. This feature endows *S. pombe* with advantages as a suitable experimental model to study control mechanisms of general significance carried out by RACK1/Cpc2. In this article, we characterize the involvement of Cpc2 in the regulation of key signaling pathways of the fission yeast.

MATERIALS AND METHODS

Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The *S. pombe* strains (Table 1) were grown with shaking at 28°C in either yeast extract plus supplements (YES) medium or Edinburgh minimal medium 2 (EMM2) (Moreno *et al.*, 1991) with 2% of glucose, and supplemented with adenine, leucine, histidine, or uracil (100 mg/l; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) depending on their particular requirements. Transformation of yeast strains was performed by the lithium acetate method (Moreno *et al.*, 1991). Mutant strains were obtained by transformation or by mating and selecting diploids in EMM2 medium without supplements. Spores were purified by glucanase treatment (Soto *et al.*, 2002) and allowed to germinate in EMM2 plus the appropriate requirements. Correct construction of strains was verified by polymerase chain reaction (PCR), and Western blot analyses (see below). Plasmid pREP3X-cpc2 was constructed to obtain strains expressing Cpc2 under the control of the full-strength thiamine repressible promoter. In brief, *cpc2*⁺ open reading frame (ORF) was amplified by PCR using genomic *S. pombe* DNA as template and the oligonucleotides CPC2-SX (TATATCTC-CAGATGCCAGAACAACTTGTGCTC, XbaI site is underlined) and CPC2-JX (TATATGGATCCCTTACTTGCTAACTGCCACAC, BamHI site is underlined). The resulting ~1.4-kbp DNA fragment was digested with XbaI and BamHI and cloned in to plasmid pREP3X. In experiments employing pREP3X-cpc2, the transformants were grown in EMM2 with or without thiamine (5 mg/l) for 12–24 h. To visualize the localization of a GFP-Pap1 fusion in cultures treated with either hydrogen peroxide or diethylmaleate (DEM),

we used strains EHH14 and AN050 (Table 1), which harbor an integrated copy of the wild-type green fluorescent protein (GFP)-Pap1 chimeric gene under the control of the mid-strength thiamine repressible promoter *rxm1* (Madrid *et al.*, 2004), both in wild-type and *cpc2Δ* backgrounds, respectively.

Gene Disruption and Epitope Tagging

The *cpc2*⁺ null mutants were obtained by entire deletion of the corresponding coding sequence and its replacement with the KanMX6 cassette by PCR-mediated strategy using plasmid pFA6a-kanMX6 as template (Bahler *et al.*, 1998). To construct strains expressing C-terminal 13-myc or GFP-tagged versions of either *pyp1*⁺, *pyp2*⁺, *ptc1*⁺, *ptc3*⁺, *pmp1*⁺, *cff1*⁺, and *cpc2*⁺, we used plasmids pFA6a-13Myc-kanMX6 and pFA6a-GFP-kanMX6, respectively (Bahler *et al.*, 1998). Primer sequences used in each case are available upon request. Strains expressing genomic versions of Pmk1 fused to HA6H epitope at its C terminus in different genetic backgrounds were constructed either by transformation with integrative plasmid pIH-pmk1-ura (Madrid *et al.*, 2006), or after random spore analysis of appropriate crosses. This procedure was also used to obtain strains expressing C-terminal HA6H-tagged versions of Sty1 or Atf1.

Site-directed Mutagenesis

A 2-kbp DNA fragment with the *cpc2*⁺ ORF plus regulatory sequences was amplified by PCR employing the 5'-oligonucleotide CPC2GFP-5 (sequence CCTTATCTAGACCATATCTTCATATACGG; which hybridizes at positions -585 to -567 upstream of the *cpc2*⁺ ATG start codon and contains a XbaI site), and the 3'-oligonucleotide CPC2GFP-3 (sequence CCTTAGGATC-CCTCTTGGTAACCTGCCACAC, which hybridizes at the 3' end of *cpc2*⁺ ORF and incorporates a BamHI site upstream of the TAA stop codon). The DNA fragment was then digested with XbaI and BamHI and cloned into integrative plasmid pIL-GFP to generate pIL-Cpc2-GFP, which incorporates a Cpc2 C-terminal fusion with the GFP tag, and contains the *S. pombe* *leu1*⁺ gene as selectable marker. The Cpc2 R36D K38E mutant was created by the overlap extension method with the use of PCR (Higuchi *et al.*, 1988). Two separate amplification reactions were performed with plasmid pIL-Cpc2-GFP as template with the use of a first pair of primers, CPC2GFP-5 and DE-3 (ATGATCGACTCGTACATCAGAACCCGAAAC; the nucleotide substitutions are indicated in bold) and a second pair of primers, CPC2GFP-3 and DE-5 (CTTTCGGTCTCTGATGACGAGTCCATCAT; the nucleotide substitutions are indicated in bold). The two pairs of PCR products were purified by agarose gel electrophoresis, mixed, and subjected again to PCR with primers CPC2GFP-5 and CPC2GFP-3. The purified PCR product was purified, digested with XbaI and BamHI, and cloned into integrative plasmid pIL-GFP to generate pIL-Cpc2(DE)-GFP. Plasmids pIL-Cpc2-GFP and pIL-Cpc2(DE)-GFP were digested at the unique NruI site within *leu1*⁺, and the linear fragments transformed into *cpc2*-disrupted strains. Transformants *leu1*⁺ were obtained and the correct integration of the Cpc2-GFP fusion plus regulatory sequences was verified by sequencing and Western blot analysis.

Purification and Detection of Activated Pmk1-HA6H and Sty1-HA6H Proteins

To investigate Pmk1 activation under stress, we used log phase cell cultures (A_{600} of 0.5) growing at 28°C in YES medium that were then subjected to the appropriate treatment. In all cases, 30 ml of culture was harvested by centrifugation at 4°C, the cells washed with cold phosphate-buffered saline buffer, and the yeast pellets immediately frozen in liquid nitrogen for analysis. To analyze Pmk1 dual phosphorylation, total cell homogenates were prepared under native conditions employing chilled acid-washed glass beads and lysis buffer [10% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P40, plus specific protease and phosphatase inhibitor cocktails for fungal and yeast extracts (obtained from Sigma-Aldrich)]. The lysates were cleared by centrifugation at 20,000 × g for 20 min. HA6H-tagged Pmk1 was purified by using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni²⁺-NTA)-agarose beads (QIAGEN, Valencia, CA), as reported previously (Soto *et al.*, 2002). The purified proteins were resolved in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, transferred to Hybond-ECL membranes (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, United Kingdom), and incubated with either mouse polyclonal anti-phospho-p42/44 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) or mouse monoclonal anti-hemagglutinin (HA) antibodies (clone 12CA5, loading control; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). To analyze tyrosine phosphorylation status in both Pmk1 and Sty1, cells were lysed into denaturing lysis buffer (6 M guanidine HCl, 0.1 M sodium phosphate, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) as described by Shiozaki and Russell (1997), and HA6H-Pmk1 and HA6H-Sty1 fusions were purified after incubation with Ni²⁺-NTA-agarose beads. After processing the purified proteins for Western blot analysis as described above, the membranes were hybridized with either a mouse monoclonal anti-phosphotyrosine (PY99; Santa Cruz Biotechnology) or mouse monoclonal anti-HA (loading control) antibodies. In all cases the immunoreactive bands were revealed with an anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich) and the ECL system (GE Healthcare). Densitometric quantification of Western blot signals

Table 1. *S. pombe* strains used in this study

Strain	Genotype	Source/reference
MM1	h ⁺ <i>ade6 M216 leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2004)
MM2	h ⁻ <i>ade6 M210 leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2004)
AN001	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2::KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN002	h ⁻ <i>ade6 M210 cpc2::KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
MI200	h ⁺ <i>ade6 M216 pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2006)
MI201	h ⁻ <i>ade6 M210 pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2006)
AN100	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2::KanR pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN101	h ⁻ <i>ade6 M216 cpc2::KanR pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2006)
CB3	h ⁺ <i>ade6 M216 pck2::KanR pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2006)
AN150	h ⁺ <i>ade6 M216 pck2::KanR cpc2::KanR pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
TP319 13c	h ⁻ <i>pmk1::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Toda et al. (1996)
AN160	h ⁻ <i>ade6 M216 cpc2::KanR pmk1::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
MI212	h ⁺ <i>ade6 M216 pmp1::KanR pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2007)
AN170	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2::KanR pmp1::HygR pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
PP42	h ⁻ <i>ade6 M210 ppb1::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	P. Pérez
AN010	h ⁻ <i>ade6 M210 cpc2::KanR ppb1::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
JM1521	h ⁺ <i>ade6 M216 his7 366 sty1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	J. B. Millar
AN200	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2::KanR sty1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
MI709	h ⁻ <i>wis1DD 12myc::ura4⁺ pmk1 HA6H::ura4⁺ leu1 32 ura4 D18</i>	Madrid et al. (2006)
MI713	h ⁻ <i>wis1DD 12myc::ura4⁺ pmk1 HA6H::ura4⁺ atf1::ura4⁺ leu1 32 ura4 D18</i>	Madrid et al. (2006)
AN600	h ⁻ <i>wis1DD 12myc::ura4⁺ pmk1 HA6H::ura4⁺ cpc2::KanR leu1 32 ura4 D18</i>	This work
MI701	h ⁺ <i>ade6 M216 pyp1 13myc:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2006)
AN700	h ⁺ <i>ade6 M216 pyp1 13myc:: KanR cpc2::KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
MI702	h ⁺ <i>pyp2 13myc:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	J. B. Millar
AN400	h ⁻ <i>pyp2 13myc:: ura4⁺ cpc2:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
MI703	h ⁺ <i>ade6 M216 pic1 13myc:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2006)
AN500	h ⁺ <i>ade6 M216 pic1 13myc:: KanR cpc2:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
MI305	h ⁺ <i>ade6 M216 pmp1 GFP:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2006)
AN020	h ⁺ <i>ade6 M216 pmp1 GFP:: KanR cpc2:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN030	h ⁺ <i>ade6 M216 pic3 13myc:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN031	h ⁺ <i>ade6 M216 pic1 13myc:: KanR cpc2:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
MI213	h ⁺ <i>ade6 M216 pyp1::KanR pmk1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2007)
AN032	h ⁺ <i>ade6 M216 pyp1::KanR cpc2:: KanR pmk1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
JM1821	h ⁻ <i>ade6 M216 his7 366 atf11 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	J. B. Millar
AN300	h ⁻ <i>ade6 M216 atf11 HA6H:: ura4⁺ cpc2:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
1243	h ⁻ <i>ade6 M210 eIF2α(S52A):: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Tvegård et al. (2007)
AN040	h ⁻ <i>ade6 M210 eIF2α(S52A):: ura4⁺ atf11 HA6H:: ura4 leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN041	h ⁻ <i>ade6 M210 eIF2α(S52A):: ura4⁺ atf11 HA6H:: ura4 cpc2:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
TK107	h ⁻ <i>sty1:: ura4⁺ leu1 32 ura4 D18</i>	T. Kato
MI103	h ⁺ <i>ade6 M216 atf1:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2007)
EHH14	h ⁻ <i>his2 nmt41:pap1 GFP:: leu1⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	Madrid et al. (2004)
AN050	h ⁻ <i>his2 nmt41:pap1 GFP:: leu1⁺ cpc2:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN060	h ⁺ <i>ade6 M216 ctf1 GFP:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN061	h ⁺ <i>ade6 M216 ctf11 GFP:: KanR cpc2::KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN070	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2 GFP:: KanR leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN071	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2:: KanR cpc2 GFP::leu1⁺ pmk1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN072	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2:: KanR cpc2(R36D K38E) GFP:: leu1⁺ pmk1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN081	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2:: KanR cpc2 GFP:: leu1⁺ atf1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN082	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2:: KanR cpc2(R36D K38E) GFP:: leu1⁺ atf1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN091	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2:: KanR cpc2 GFP:: leu1⁺ pyp1 13myc:: KanR pmk1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN092	h ⁺ <i>ade6 M216 cpc2:: KanR cpc2(R36D K38E) GFP:: leu1⁺ pyp1 13myc:: KanR pmk1 HA6H:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN102	h ⁻ <i>cpc2:: KanR cpc2 GFP:: leu1⁺ pyp2 13myc:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work
AN103	h ⁻ <i>cpc2:: KanR cpc2(R36D K38E) GFP::leu1⁺ pyp2 13myc:: ura4⁺ leu1 32 ura4D 18</i>	This work

was performed using Molecular Analyst software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Purification and Detection of Atf1-HA6H

Atf1 protein was isolated by affinity precipitation on Ni²⁺-NTA-agarose beads with cells extracts obtained under denaturing conditions as described above. The purified proteins were resolved in 6% SDS-PAGE gels, transferred to Hybond-ECL membranes, and incubated with a mouse anti-HA antibody (12CA5). In parallel, cell extracts were incubated with polyclonal rabbit anti-Cdc2 antibody (PSTAIR; Millipore, Billerica, MA) as a loading control.

Detection of Myc- and GFP-tagged Fusions

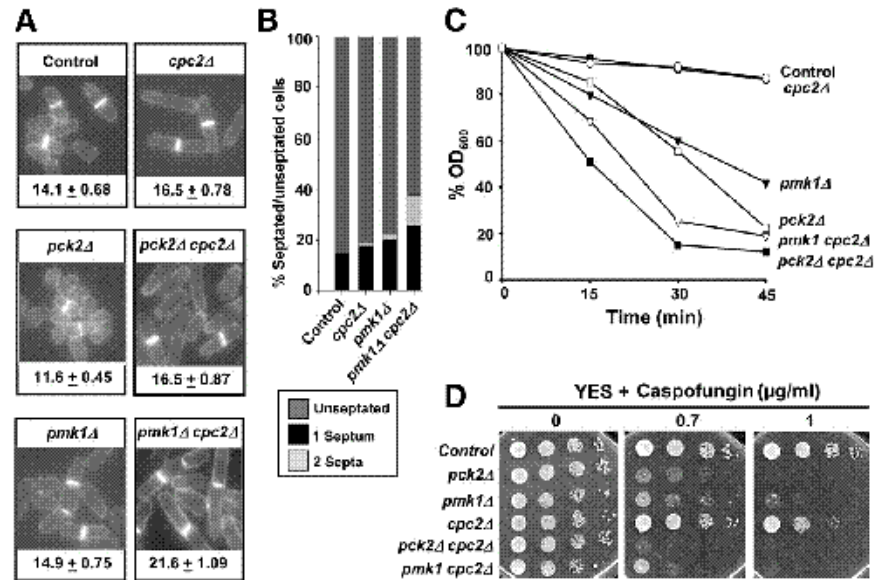
Cell extracts were prepared under native conditions (see above). The cleared lysates were resolved in 8 or 10% SDS-PAGE gels, depending on the relative size

of the fusion protein, transferred to filters, and incubated with monoclonal mouse anti-myc antibody (clone 9E10; Roche Molecular Biochemicals) or polyclonal rabbit anti-GFP antibody (Cell Signaling Technology). Rabbit anti-Cdc2 antibody was used as loading control. Immunoreactive bands were detected using anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich) and the SuperSignal system (Pierce Chemical, Rockford, IL).

Assays of Cell Sensitivity for Growth under Different Stresses

In plate assays, wild type and mutant strains of *S. pombe* were grown in YES liquid medium to an A_{600} of 0.6. Appropriate dilutions were spotted per duplicate on YES solid media containing 2% (wt/vol) bacto-agar (Difco, Detroit, MI) and supplemented with any of the following compounds: caspofungin (a kind gift from Merck, Darmstadt, Germany), MgCl₂ (Sigma-AI-

Figure 1. Role of Cpc2 in the regulation of cell size, septation, and cell wall integrity is independent of the Pmk1 MAPK pathway. (A) Cell morphology and size at division (micrometers \pm SD) in strains M1200 (control), AN100 (*cpc2* Δ), CB3 (*pck2* Δ), AN150 (*pck2* Δ *cpc2* Δ), TP319 13c (*pmk1* Δ), and AN160 (*pmk1* Δ *cpc2* Δ), growing in EMM2 medium after staining with calcofluor white. (B) Septation status of the cells in the above cultures ($n \approx 400$). (C) The same strains were grown in YES medium ($OD_{600} = 0.5$) and assayed for β glucanase sensitivity by treatment with 100 μ g/ml Zymolyase 20-T at 30°C. Cell lysis was monitored by measuring decay in OD_{600} at different incubation periods, and the results shown are the mean value of three independent experiments. (D) Cell survival in the presence of Caspofungin. Samples containing 10^4 , 10^3 , 10^2 or 10^1 cells of wild type and single and double mutant strains grown in YES medium were spotted onto YES plates supplemented with 0, 0.7, or 1 μ g/ml caspofungin and incubated for 3 d at 28°C before being photographed.



drich), FK506 (cyclosporin; Alexis Biochemicals, San Diego, CA), potassium chloride (Sigma-Aldrich), sorbitol (Sigma-Aldrich), or hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich). Plates were incubated at 28°C for 3 d and then photographed. When determining cell survival in liquid cultures, cells were grown in YES liquid medium to an A_{600} of 0.6 and treated with 5 mM hydrogen peroxide for 30 min. Then, cell samples were collected, appropriately diluted, and spread in triplicate onto YES plates. The viability of the cells was measured by their ability to form colonies after incubation at 28°C for 5 d. The survival fraction was calculated as a percentage relative to control samples that received no treatment.

β -1,3-Glucanase Sensitivity Assay

To analyze resistance to β -1,3-glucanase in different mutants, we followed the method of Loewith *et al.* (2000), with some modifications. Strains were grown in YES medium to an A_{600} of 0.6; washed with 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol; and incubated with vigorous shaking at 30°C in the same buffer supplemented with 100 μ g/ml Zymolyase 20-T (Seikagaku America, Rockville, MD). Samples were taken every 15 min, and cell lysis monitored by measuring A_{600} decay.

Preparation and Fractionation of Polysomes

Polysomes were obtained as described previously (Shor and McLeod, 2003), with some modifications. Strains grown in YES medium ($OD_{600} = 0.5$) were treated with 100 μ g/ml cycloheximide before centrifugation. The pelleted cells were washed, resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, and 100 μ g/ml cycloheximide), and supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and 0.5 U/ μ l RNase inhibitor (RNasin; Ambion, Austin, TX). Total cell homogenates were obtained in a Fast-Prep instrument (Bio 101, Vista, CA) with chilled acid-washed glass beads, and the crude extracts clarified by centrifugation at 20,000 \times g for 30 min. To show the polysome profile, 20 OD_{600} units of clarified extracts were applied to 11.2 ml of 7–47% (wt/vol) sucrose gradients in lysis buffer plus inhibitors and centrifuged in a SW41Ti rotor (Beckman Instruments, Fullerton, CA) at 4°C for 3.5 h at 40,000 rpm. Fractions of 600 μ l were collected, and 50- μ l aliquots were used to detect either Cpc2 or ribosomal protein L7 (internal control) by SDS-PAGE and Western blot analysis.

Northern Blot Analysis

Yeast cells grown in YES medium to an OD_{600} of 0.8, subjected to the appropriate stress treatment, and volumes of 50 ml of the cultures were recovered at different times. Total RNA preparations were obtained as described and resolved through 1.3% agarose-formaldehyde gels. Northern (RNA) hybridization analyses were performed as described previously (Soto *et al.*, 2002). The probes used were amplified by PCR and included: a 1.7-kbp fragment of the *rfi1*⁺ gene that was amplified with the 5'-oligonucleotide ATGTCCTCCGCTCTCCCGT and the 3'-oligonucleotide CTAGTACCCTAAATTGA; a 0.4-kbp fragment of the *gpx1*⁺ gene amplified with the 5'-oligonucleotide TTCTACGACTTGGCT and the 3'-oligonucleotide ACACTCTCGATATCC; a 0.9-kbp fragment of the *trp1*⁺ gene amplified with the 5'-oligonucleotide GTGACTCACAACAAG and the 3'-oligonucleotide TAATCGGTA TCTTCC; a 2.1-kbp fragment of the *pyp2*⁺ gene amplified with the 5'-oligonucleotide CCCAGACCCGTTTCTTCCGA and the 3'-oligo-

nucleotide AAGGGCTTGGAGCCCTCC; a 1-kbp fragment of the *pyp1*⁺ gene amplified with the 5'-oligonucleotide GCTCCTTCGGCTTCATGT and the 3'-oligonucleotide CCTTGGCAAGCCGATGTAA; a 1.5-kbp fragment of the *ctf1*⁺ gene amplified with the 5'-oligonucleotide CGTCCCTGTTTACAC and the 3'-oligonucleotide GCTTCCCTTGGAAACAT; a 1.1-kbp fragment of the *tpx1*⁺ gene amplified with the 5'-oligonucleotide ATGACTTTGCCAAATCCGGT and the 3'-oligonucleotide CATAAGTCTTGGAAAAGTACT; and a 1-kbp fragment of the *leu1*⁺ gene amplified with the 5'-oligonucleotide TCGTCTCTTACCAG-CAG and the 3'-oligonucleotide CAACAGCCTTACTAATAT. Ready-To-Go DNA labeling beads (GE Healthcare) was used for DNA labeling. To establish quantitative conclusions, the level of mRNAs was determined in a PhosphorImager (GE Healthcare) and compared with the internal control (*leu1*⁺ mRNA).

Fluorescence Microscopy

To determine cell size at division and percentage of multiseptated cells, yeast strains were grown in EMM2 medium to an OD_{600} of 0.5 and stained with calcofluor white, which specifically stains cell wall and septum (Alfa *et al.*, 1993). A minimum of 400 septated cells were scored for each mutant. To localize the Pcp1-CFP fusion, yeast cultures grown in EMM2 medium to an OD_{600} of 0.5 and treated with hydrogen peroxide (final concentration, 1–5 mM) or DEM (final concentration, 4 mM). Small aliquots (10 μ l) of the yeast cultures were loaded onto poly L-lysine coated slides, and the remaining suspension was withdrawn by aspiration. A DM 4000B fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with 40 \times and 100 \times objectives was used, and images were captured with a cooled DC 300F camera and IM50 software (Leica), and then imported into PhotoShop CS3 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

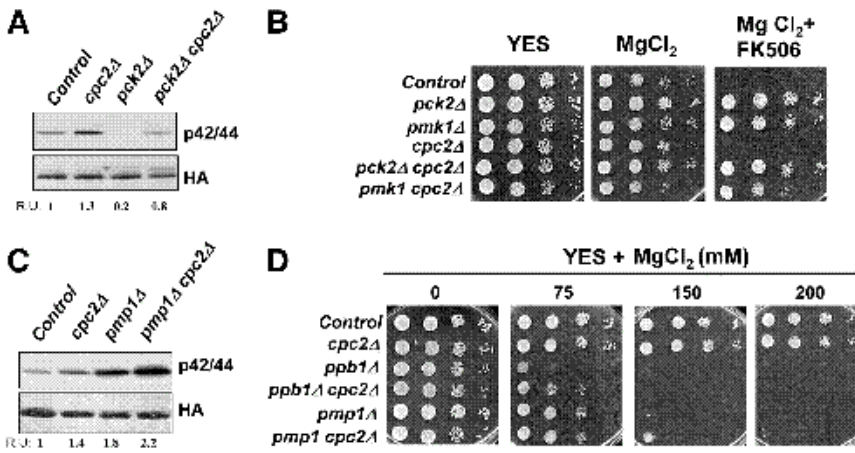
Reproducibility of Results

All experiments were repeated at least three times with similar results. Representative results are shown.

RESULTS

Cross-Talk between Cpc2 and the Pmk1 Cell Integrity Pathway

To study a possible role for Cpc2 in the functional Pmk1 cell integrity pathway, we first explored cell size, morphology, and septation in different mutants. As described previously, exponentially growing *cpc2* Δ cells are elongated (McLeod *et al.*, 2000; Figure 1A) and *pck2* Δ cells are somewhat short, whereas *pmk1* Δ cells are slightly longer than control cells and display a mild multiseptate phenotype (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997; Figure 1A). Significantly, *cpc2* Δ deletion increased cell size at division in both *pck2* Δ and *pmk1* Δ cells (Figure 1A) and enhanced the separation defect due to *pmk1*⁺ deletion (12% multiseptation in



28°C before being photographed. (C) Strains MI200 (*pmk1 HA6H*, control), AN100 (*pmk1 HA6H, cpc2Δ*), MI212 (*pmk1 HA6H, pmp1Δ*), and AN170 (*pmk1 HA6H, pmp1Δ cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log phase and total Pmk1 HA6H was purified and detected as described above. (D) Chloride sensitivity assays for strains MI200 (control), AN100 (*cpc2Δ*), PP42 (*ppb1Δ*), AN010 (*ppb1Δ cpc2Δ*), MI212 (*pmp1Δ*), and AN170 (*pmp1Δ cpc2Δ*). After growth in YES medium, cells were spotted onto YES plates supplemented with 75, 150, or 200 mM $MgCl_2$ and incubated for 3 d at 28°C.

double *cpc2Δ pmk1Δ* cells vs. 3 and 1% in either single *pmk1Δ* and *cpc2Δ* mutants, respectively) (Figure 1B). Sensitivity of the cell wall to digestion with β -glucanase in *cpc2Δ pck2Δ* or *cpc2Δ pmk1Δ* double mutants was higher than in *pck2Δ* or *pmk1Δ* cells (Figure 1C). Moreover, whereas *cpc2Δ* cells displayed some sensitivity toward the β -glucan synthase inhibitor caspofungin, this compound strongly affected cell growth in *pck2Δ* or *pmk1Δ* cells and particularly, in *cpc2Δ pck2Δ* and *cpc2Δ pmk1Δ* mutants (Figure 1D). Together, these results suggest that Cpc2 participates in the regulation of cell size, septation and cell wall integrity in an alternative manner or in addition to the Pmk1 pathway.

In human cells, RACK1 is required for PKC to phosphorylate JNK and increase its degree of activation (López-Bergami et al., 2005). Because fission yeast Cpc2 is also able to interact with Pck2 (Won et al., 2001), this precedent prompted us to perform a comparative analysis of basal MAPK activity in control versus *cpc2Δ*, *pck2Δ*, and *pck2Δ cpc2Δ* cells expressing a HA6H-tagged version of Pmk1, and by using an anti-p42/44 antibody that detects dual phosphorylation of Pmk1 at threonine and tyrosine residues (Madrid et al., 2006). As shown in Figure 2A, a moderate but reproducible increase in basal Pmk1 phosphorylation was evident in *cpc2Δ* cells compared with control cells. As described previously (Barba et al., 2008), *pck2Δ* deletion induced a very strong decrease in basal Pmk1 phosphorylation (Figure 2A). Notably, the basal level of Pmk1 phosphorylation was higher in *pck2Δ cpc2Δ* cells than in the single *pck2Δ* mutant (Figure 2A), suggesting that Cpc2 negatively regulates Pmk1 downstream to Pck2.

In *S. pombe*, calcineurin and Pmk1 play antagonistic roles in chloride homeostasis, and Pmk1 hyperactivation leads to strong sensitivity to this anion (Sugiura et al., 1998). Unexpectedly, cells lacking *cpc2+* did not show growth inhibition in rich medium supplemented with 0.2 M $MgCl_2$ (Figure 2B), whereas the *vic*-negative phenotype (*vic*, viable in the presence of FK506 and chloride; Ma et al., 2006) of the *cpc2+*-deleted mutant was rescued by additional deletion of *pck2+* or *pmk1+* genes (Figure 2B). These results point to Cpc2 as negative regulator of chloride homeostasis in a way that is independent of Pmk1 and/or calcineurin. In agreement with this prediction, a *cpc2Δ pmp1Δ* double mutant strain, which shows a higher Pmk1 activity than its parental

single mutant counterparts (Figure 2C), displayed some growth in medium with higher concentration of $MgCl_2$ than the *pmp1Δ* mutant (Figure 2D). Moreover, disruption of *cpc2+* in a *ppb1Δ* strain (devoid of the catalytic subunit of calcineurin phosphatase; Yoshida et al., 1994) clearly increased tolerance against chloride anion compared with the single *ppb1Δ* mutant strain (Figure 2D). Hence, Cpc2 plays a role as a negative regulator for chloride homeostasis alternatively to Pmk1 in fission yeast.

Cpc2 Is Important for Both Pmk1 and Sty1 Tyrosine Dephosphorylation in Growing Cells and under Stress

The level of Pmk1 phosphorylation increases in a quick and transient manner when *S. pombe* is subjected to a salt-induced osmotic stress with KCl (Madrid et al., 2006). As shown in Figure 3A (top), the stress-induced Pmk1 activation in a strain deleted in *cpc2+* was maintained for longer times than in control cells and, as described above, exhibited a moderate increase in basal Pmk1 phosphorylation (Figure 3A, top). On the contrary, ectopic expression of the *cpc2+* gene in *cpc2Δ* cells caused a clear reduction in the levels Pmk1 phosphorylation both in growing cells and in response to hyperosmotic stress (Figure 3B). The positive role of Cpc2 in Pmk1 deactivation was also evident under other stressful situations such as oxidative stress with hydrogen peroxide (Figure 3C) or cell wall synthesis inhibition with caspofungin. Importantly, the basal and the stress induced Pmk1 phosphorylation levels were also higher in *cpc2Δ* than in control cells when using a specific anti-phosphotyrosine antibody (pY99) (Figure 3A, bottom). Moreover, deletion of *cpc2+* also resulted in increased basal level of Sty1 tyrosine phosphorylation and delayed deactivation kinetics under osmotic stress (Figure 3D). Together, these results suggest that Cpc2 acts as a negative regulator of the tyrosine phosphorylation status of both Pmk1 and Sty1 MAPKs.

Cpc2 Positively Regulates the Protein Levels of Pyp1 and Pyp2 Tyrosine Phosphatases

Recently, we described that MAPK Sty1 is essential for proper deactivation of Pmk1 under hypertonic stress in a process regulated by transcription factor Atf1 through the action of tyrosine phosphatases Pyp1 and Pyp2, and serine/

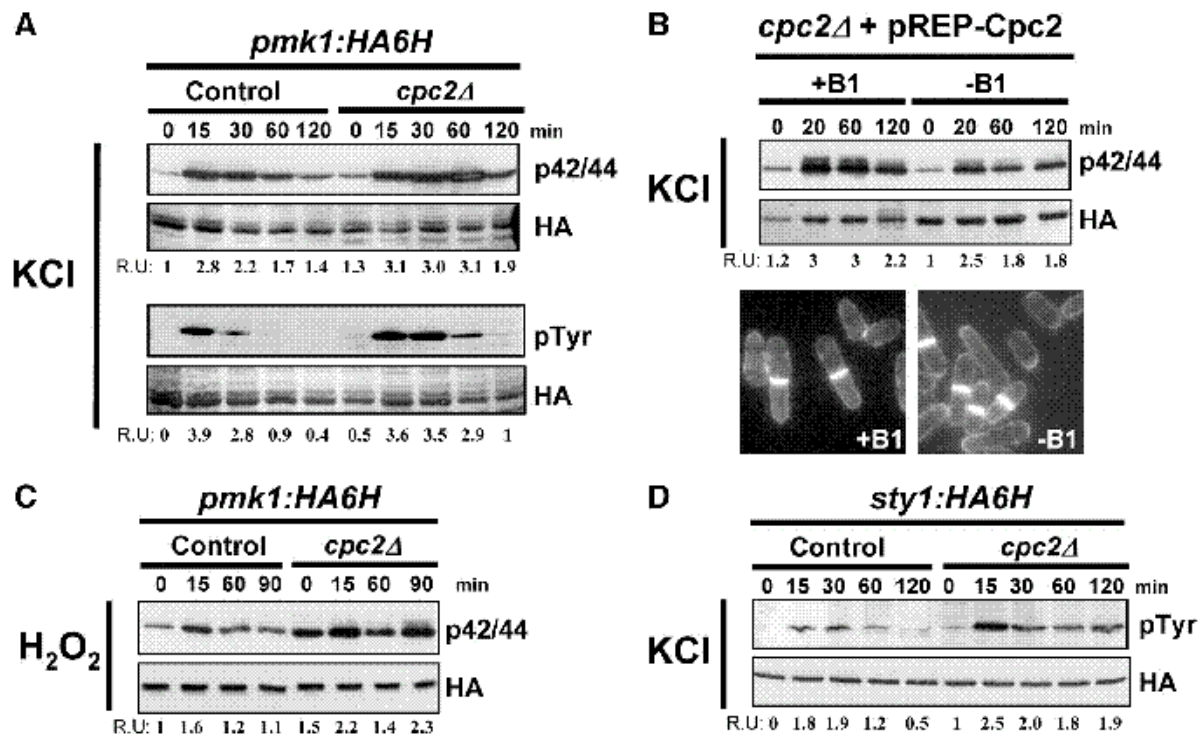


Figure 3. Cpc2 negatively regulates phosphorylation of Pmk1 and Sty1 MAPKs in growing and stressed cells. (A) Top, Strains M1200 (*pmk1 HA6H*, control), and AN100 (*pmk1 HA6H, cpc2Δ*), were grown in YES medium to mid log phase and treated with 0.6 M KCl. At timed intervals Pmk1 HA6H was purified by affinity chromatography, and the activated and total Pmk1 was detected by immunoblotting with anti phospho p42/44 or anti HA antibodies, respectively. Bottom, in the same experiment, Pmk1 phosphorylation was detected by immunoblotting with anti phosphotyrosine antibody. (B) Strain AN100 (*pmk1 HA6H, cpc2Δ*) transformed with pREP *cpc2+* plasmid was grown for 18 h in the presence (+B1) or absence (-B1) of thiamine and treated with 0.6 M KCl. At different times, Pmk1 HA6H was purified and the activated, and total Pmk1 was detected as described in A. Cell morphology was analyzed by fluorescence microscopy. (C) Strains M1200 (*pmk1 HA6H*, control) and AN100 (*pmk1 HA6H, cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log phase, treated with 1 mM H₂O₂, and the activated and total Pmk1 was detected as described in A. (D) Strains JM1521 (*sty1 HA6H*, control) and AN200 (*sty1 HA6H, cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log phase and treated with 0.6 M KCl. At timed intervals, Sty1 HA6H was purified by affinity chromatography and the activated and total Sty1 was detected by immunoblotting with anti phosphotyrosine antibody or anti HA antibodies, respectively.

threonine phosphatase Ptc1 (Madrid *et al.*, 2007). Ptc3, another serine/threonine phosphatase, has been also involved in this control (Takada *et al.*, 2007), whereas Pmp1, a dual-specificity phosphatase, seems involved in Pmk1 inactivation only in growing cells and during cell separation (Madrid *et al.*, 2007). The results obtained so far strongly suggested that the observed increase in both the basal and the osmotic-induced phosphorylation of Pmk1 and Sty1 in *cpc2Δ* cells might be due to a deficit in the synthesis of any of the above-mentioned phosphatases. To test this interpretation, we undertook two experimental approaches on the bases of earlier findings. We showed previously that osmotic-induced Pmk1 activation/deactivation in a strain expressing a hyperactive version of Wis1 MAPKK (*wis1DD*), which prompts the constitutive activation of Sty1 (Shiozaki *et al.*, 1998), is lower than in control cells due to increased synthesis of Pyp1, Pyp2, and Ptc1 (Madrid *et al.*, 2007). Therefore, if somehow Cpc2 would positively regulate the levels of these phosphatases, then deletion of the *cpc2+* gene in a *wis1DD* background should rescue the defective Pmk1 activation observed in stressed cultures of the single *wis1DD* mutant. Results shown in Figure 4A indicate this first prediction is correct, because Pmk1 activation by salt stress is much higher in *cpc2Δ wis1DD* cells than in *wis1DD* cells, although not as much as in *cpc2Δ atf1Δ* cells. Second, we analyzed Pyp1-13myc, Pyp2-13myc, Ptc1-13myc, Ptc3-13myc, and Pmp1-GFP protein levels in exponentially growing con-

control and *cpc2Δ* cultures and after being subjected to a hyperosmotic stress. As shown in Figure 4B, Pyp1 protein levels during growth were lower in the *cpc2Δ* mutant than in the control strain, whereas Pyp2, Pmp1, Ptc1, and Ptc3 levels were unaffected by the absence of Cpc2. However, upon osmotic stress, both Pyp1 and Pyp2, but not Pmp1, Ptc1, or Ptc3, were down-regulated in *cpc2Δ* mutant compared with control cells (Figure 4B). Moreover, the positive role of Cpc2 in modulating Pyp2 protein levels was also proved in *S. pombe* cells subjected to other stresses like oxidative treatment with hydrogen peroxide or heat shock (Figure 4C). Importantly, Pmk1 basal phosphorylation in *pyp1Δ cpc2Δ* cells was very similar to that of the single *pyp1Δ* mutant, but higher than in *cpc2Δ* cells (Figure 4D). As a whole, these results strongly suggest that in fission yeast Cpc2 acts as a positive regulator of Pyp1 and Pyp2 protein levels. In this scenario, the hyperactivation of Pmk1 and Sty1 observed in growing *cpc2Δ* cells is a consequence of the defect in the protein levels of Pyp1, whereas defective Pyp1 and Pyp2 levels account for the slow MAPK deactivation observed under stress.

Atf1 Level Is Positively Regulated by Cpc2

In fission yeast the stress-induced expression of *pyp1+* and *pyp2+* genes is regulated by Sty1 through Atf1 forming a negative-feedback loop (Degols *et al.*, 1996; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Hence, we considered

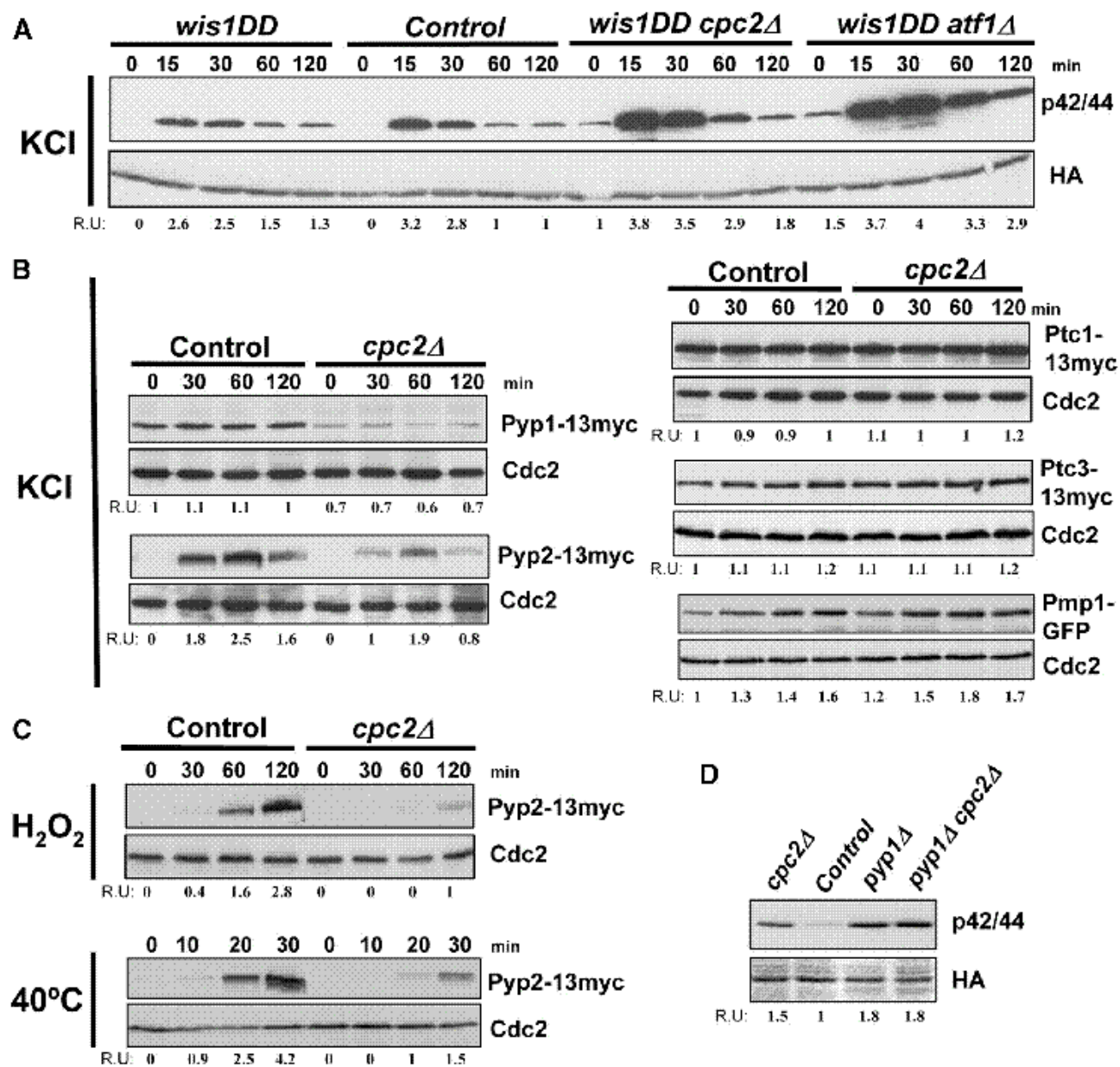


Figure 4. *Cpc2* acts as a positive regulator of *Pyp1* and *Pyp2* tyrosine phosphatases protein levels. (A) Deletion of the *cpc2⁺* gene in a *wis1DD* background rescues the defective *Pmk1* activation in single *wis1DD* mutant. Strains MI200 (*pmk1 HA6H*, control), MI709 (*pmk1 HA6H, wis1DD*), AN600 (*pmk1 HA6H, wis1DD cpc2Δ*), and MI713 (*pmk1 HA6H, wis1DD atf1Δ*) were grown in YES medium to mid log phase and treated with 0.6 M KCl. At the times indicated, aliquots were harvested and *Pmk1 HA6H* was purified by affinity chromatography. Activated *Pmk1* was detected by immunoblotting with anti phospho p42/44 and total *Pmk1* with anti HA antibodies. (B) Protein levels of different MAPK phosphatases. The strains MI701 (*pyp1 13myc*, control) and AN700 (*pyp1 13myc, cpc2Δ*), MI702 (*pyp2 13myc*, control) and AN400 (*pyp2 13myc, cpc2Δ*), MI703 (*ptc1 13myc*, control) and AN500 (*ptc1 13myc, cpc2Δ*), AN030 (*ptc3 13myc*, control), and AN031 (*ptc3 13myc, cpc2Δ*), MI305 (*pmp1 GFP*, control) and AN020 (*pmp1 GFP, cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log phase and treated with 0.6 M KCl. Total extracts were obtained from aliquots harvested at the times indicated, and fusions to 13 myc and GFP were detected by immunoblotting with either anti c myc or anti GFP antibodies, respectively, whereas anti Cdc2 antibody was used for loading control. (C) Defective synthesis of *Pyp2* in *cpc2Δ* cells subjected to other stresses. Strains MI702 (*pyp2 13myc*, control) and AN400 (*pyp2 13myc, cpc2Δ*) were grown as described above and treated with 1 mM H₂O₂ (top) or incubated at 40°C (bottom). Aliquots were harvested at the times indicated and *Pyp2 13myc* was detected by immunoblotting with anti c myc antibody. Anti Cdc2 antibody was used for loading control. (D) The basal *Pmk1* phosphorylation in *pyp1Δ cpc2Δ* cells is similar to that of the single *pyp1Δ* mutant. Strains MI200 (*pmk1 HA6H*, control), AN100 (*pmk1 HA6H, cpc2Δ*), MI213 (*pmk1 HA6H, pyp1Δ*), and AN032 (*pmk1 HA6H, pyp1Δ cpc2Δ*) were grown as indicated previously and *Pmk1 HA6H* was purified by affinity chromatography under native conditions. Activated and total *Pmk1* was detected by immunoblotting with anti phospho p42/44 or anti HA antibodies, respectively.

the possibility that the decreased *Pyp1* and *Pyp2* synthesis in stressed-*cpc2Δ* cells might result from a defect in the synthesis of *Atf1* itself. In this context, we determined *Atf1* protein

levels in control and *cpc2Δ* cells expressing a genomic copy of the *atf1⁺* gene tagged with two copies of the HA epitope and six histidine residues, and after being subjected to a

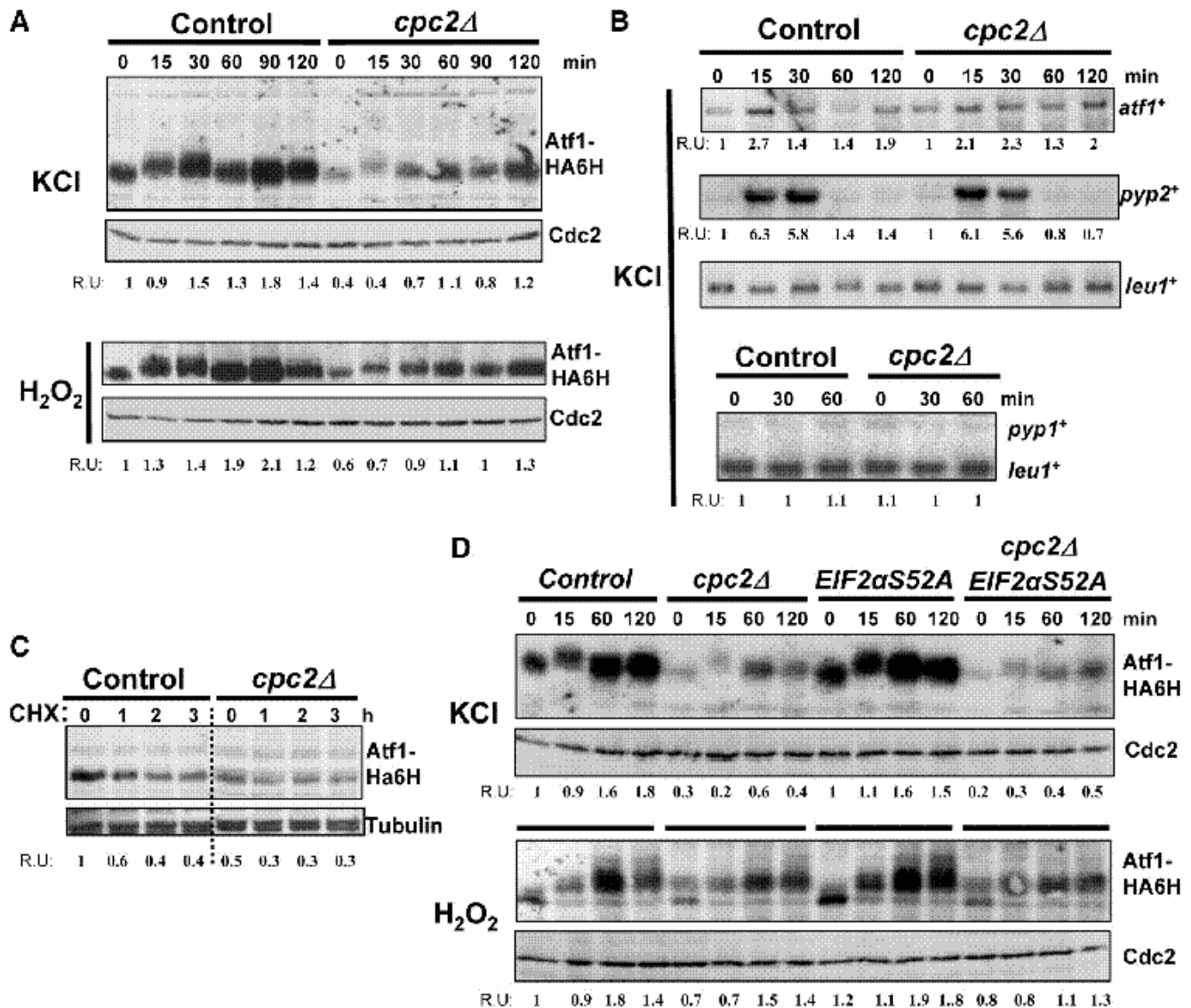


Figure 5. The protein level of Atf1 is positively regulated by Cpc2. (A) Strains JM1821 (*atf1 HA6H*, control) and AN300 (*atf1 HA6H, cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log phase and treated with either 0.6 M KCl (top) or 1 mM H₂O₂ (bottom). Aliquots were harvested at different times, and Atf1 was purified from cell extracts by affinity chromatography, and detected by immunoblotting with anti HA antibody. Anti Cdc2 antibody was used for loading control. (B) Strains JM1821 and AN300 were grown at 28°C in YES medium to mid exponential phase and treated with 0.6 M KCl for the times indicated. Total RNA was extracted, denatured, transferred to nylon membranes, and hybridized with ³²P labeled probes for *atf1*⁺, *pyp2*⁺, *pyp1*⁺, and *leu1*⁺ (loading control). (C) These same strains were grown in YES medium (OD₆₀₀ = 0.5) and treated with 100 μg/ml cycloheximide for the times indicated. Purified Atf1 was detected by immunoblotting with anti HA antibody, whereas anti α tubulin antibody was used as loading control. (D) EIF2α is not involved in the control of Atf1 translation by Cpc2. Strains JM1821 (*atf1 HA6H*, control), AN300 (*atf1 HA6H, cpc2Δ*), AN040 (*atf1 HA6H, EIF2α S52A*), and AN041 (*atf1 HA6H, EIF2α S52A cpc2Δ*) were grown in YES medium and treated with either 0.6 M KCl (top) or 1 mM H₂O₂ (bottom). Atf1 from each sample was purified by affinity chromatography and detected by immunoblotting with anti HA antibody. Anti Cdc2 antibody was used for loading control.

saline stress with KCl. As shown in Figure 5A (top), *cpc2Δ* deletion prompted a clear decrease in Atf1 levels as compared with control cells in both growing and osmostressed cells. This defect was also evident in cultures under oxidative stress with hydrogen peroxide (Figure 5A, bottom). In contrast, because Atf1 positively regulates its own expression at a transcriptional level (Wilkinson *et al.*, 1996), the defective Atf1 levels observed in *cpc2Δ* cells might result from a deficit in the expression of *atf1*⁺ mRNA. To further investigate this approach we estimated *atf1*⁺ mRNA levels in control versus *cpc2Δ* cells under saline stress. As Figure 5B shows, *atf1*⁺ mRNA levels were unaffected by the absence

of Cpc2 in both cases. Remarkably, although Atf1 levels are lower in *cpc2Δ* cells, the salt induced expression of both *pyp2*⁺ and *pyp1*⁺ mRNAs was similar to control cells (Figure 5B).

The decreased Atf1 protein levels in *cpc2Δ* cells might result from a decreased stability. To address this point we determined the half-life of Atf1 in control versus *cpc2Δ* mutant strains growing in rich medium after the addition of cycloheximide, which blocks translation. As shown in Figure 5C, the half-life of Atf1 was very similar in control and *cpc2Δ* cells (~2 h). These results indicate that Cpc2 likely exerts a positive regulation on Atf1, Pyp1, and Pyp2 expres-

sion at a translational level by inducing the translation of their correspondent mRNAs.

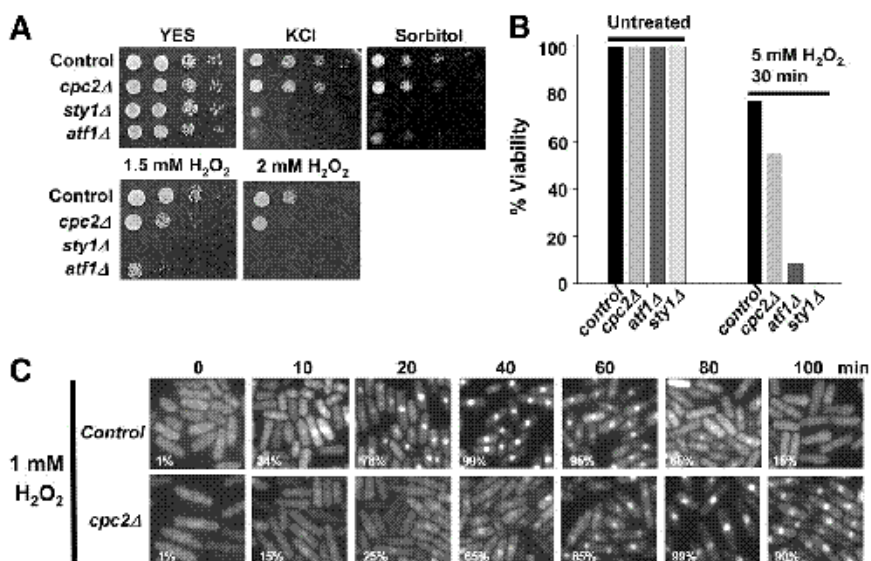
In fission yeast, phosphorylation of the initiation factor EIF2- α at Ser-52 (Ser-51 in other eukaryotic cells) is critical for the inhibition of general protein synthesis by down-regulating the initiation of translation in response to multiple stresses (Zhan et al., 2002). To investigate a possible cross-talk between Cpc2 and EIF2- α phosphorylation for the control of Atf1 translation under stress conditions, we disrupted the *cpc2+* gene in a strain bearing a nonphosphorylatable alanine instead of Ser-52 in EIF2- α (EIF2- α S52A; Tvegård et al., 2007). As can be seen in Figure 5D, the absence of phosphorylation at Ser52 in EIF2- α did not noticeably affect Atf1 translation in response to either osmotic or oxidative stress, which remained similar to that of control cells. Moreover, both the basal and stress-induced synthesis of Atf1 was similarly compromised in *cpc2* Δ and *cpc2* Δ EIF2- α S52A cells (Figure 5D). Therefore, these data support a role for Cpc2 as positive regulator of Atf1 translation which is independent on EIF2- α function.

Cellular Response against Hydrogen Peroxide Stress Is Partially Compromised in *cpc2* Δ Cells

S. pombe strains lacking Sty1 or Atf1 are strongly sensitive to various stresses (Millar et al., 1995; Shiozaki and Russell, 1995; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson et al., 1996). We examined the growth of control, *sty1* Δ , *atf1* Δ , and *cpc2* Δ strains on solid media supplemented with either KCl (saline osmotic stress), sorbitol (nonsaline osmotic stress), or hydrogen peroxide (oxidative stress), to ascertain whether defective synthesis of Atf1 in *cpc2* Δ mutant affected cell survival under stress. Contrary to *sty1* Δ or *atf1* Δ mutants, *cpc2* Δ cells did not show enhanced growth inhibition by KCl or sorbitol, although a mild growth defect was observed in the presence of 1, 5, 2 mM hydrogen peroxide that was less severe than in *atf1* Δ cells (Figure 6A). A similar result was observed when liquid cultures treated with 5 mM hydrogen peroxide were used (Figure 6B).

Transcription factor Pap1 is required for cell survival of fission yeast under oxidative stress (Vivancos et al., 2006),

and its activity is regulated at the level of cellular localization. In growing cells Pap1 resides mainly in the cytoplasm but, in response to hydrogen peroxide, undergoes a reversible oxidation of critical cysteine residues and accumulates into the nucleus to favor the increased transcription of essential genes for defense against oxidative stress (Vivancos et al., 2006). Under moderate to high concentrations of hydrogen peroxide (naturally occurring, for example, in response to glucose arrest) nuclear accumulation of Pap1 is delayed until the expression of Atf1-dependent genes promotes its conversion to the active oxidized conformation that translocates into the nucleus and enhances Pap1-dependent gene expression (Madrid et al., 2004; Vivancos et al., 2006). Consequently, we analyzed the cellular location of Pap1 in strains EHH14 (control) and AN050 (*cpc2* Δ) after being treated with 1 mM hydrogen peroxide. These strains express a genomic copy of an N-terminal GFP-tagged version of Pap1 under the control of a mid-strength thiamine repressible promoter (Vivancos et al., 2004). As described previously (Vivancos et al., 2004), nuclear accumulation of activated Pap1 was maximal after 40–50 min of treatment and slowly decreased thereafter (Figure 6C). However, *cpc2+* disruption provoked a clear delay in nuclear translocation of Pap1 (~30 min as average of three independent experiments; Figure 6C), and the same effect was also observed when using higher doses of the oxidant (5 mM; Figure 6D). This defect was not due to a difference in protein expression, because Pap1 levels were similar in control and in *cpc2* Δ cells. Moreover, the kinetics of Pap1 nuclear accumulation was identical in both types of cells after treatment with pro-oxidant DEM, which induces a nonreversible Pap1 structural modification unrelated to that induced by hydrogen peroxide (Castillo et al., 2002; Figure 6D). Hence, the timing for nuclear accumulation of Pap1 results specifically delayed in *cpc2* Δ cells by oxidative stress with hydrogen peroxide. To further investigate this effect, we analyzed by Northern blot experiments the comparative expression of several genes which are induced in a Sty1-Atf1 and/or Pap1-dependent manner in response to hydrogen peroxide in control and in *cpc2* Δ cells. As shown in Figure 7, the



percentage of cells with nuclear accumulation of GFP Pap1 was determined by fluorescence microscopy. Results shown correspond to one representative experiment.

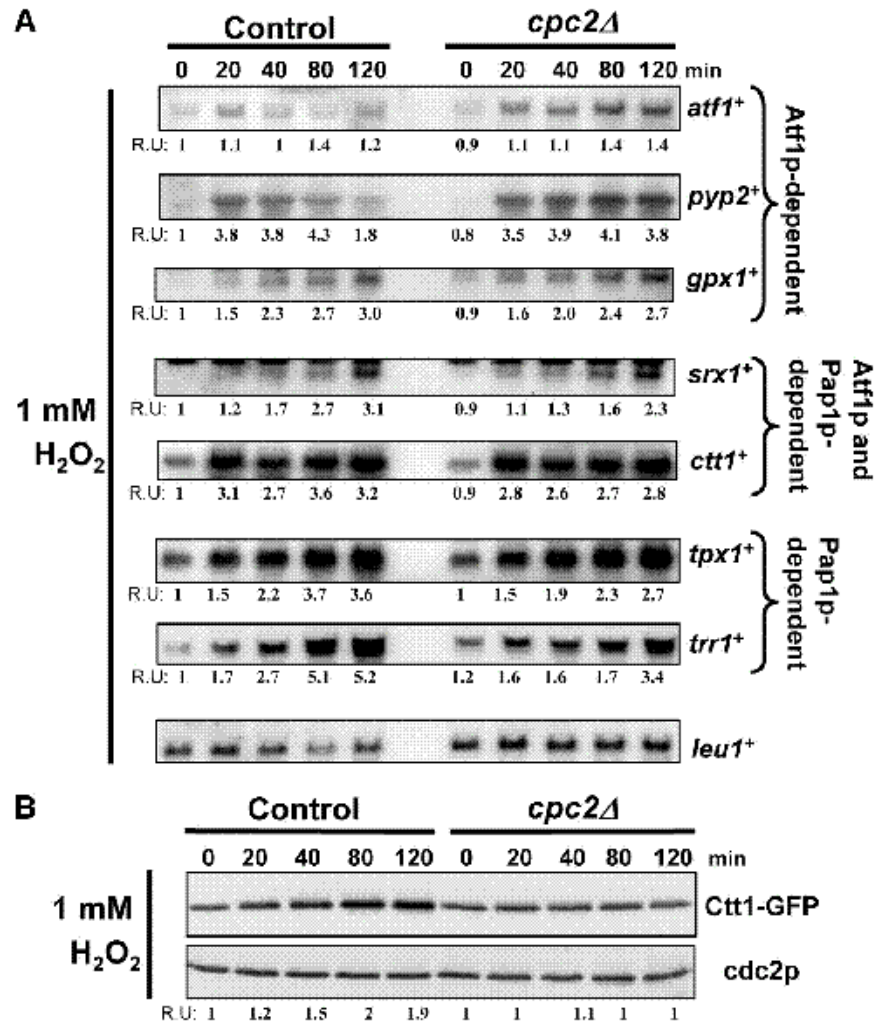


Figure 7. Cpc2 modulates *S. pombe* response to oxidative stress at both transcriptional and translational levels. (A) Induced expression of Pap1 dependent genes in response to hydrogen peroxide is delayed in *cpc2Δ* cells. Strains MI200 (control) and AN100 (*cpc2Δ*) were grown in YES medium to early log phase and treated with 1 mM H₂O₂ for the times indicated. Total RNA was extracted from each sample and 20 μg resolved in 1.5% agarose formaldehyde gels. The denatured RNAs were transferred to nylon membranes and hybridized with ³²P labeled probes for *atf1*⁺, *pyp2*⁺, *gpx1*⁺, *srx1*⁺, *ctt1*⁺, *tpx1*⁺, *trr1*⁺, and *leu1*⁺ (loading control). (B) Increased synthesis of cytoplasmic catalase in response to hydrogen peroxide is blocked in *cpc2Δ* cells. Strains AN060 (control; *ctt1* GFP) and AN061 (*cpc2Δ*, *ctt1* GFP) were grown in YES medium and treated with 1 mM H₂O₂ for the times indicated. Total extracts were obtained and Ctt1 GFP fusion was detected by immunoblotting with anti GFP antibodies. Anti Cdc2 antibody was used for loading control.

transcriptional induction of Atf1-dependent genes like *atf1*⁺ itself, *pyp2*⁺, or *gpx1*⁺ (encoding H₂O₂ scavenger glutathione peroxidase; Yamada *et al.*, 1999) was not significantly affected by *cpc2*⁺ deletion in exponentially growing cultures treated with 1 mM hydrogen peroxide, indicating that the moderate levels of Atf1 present in *cpc2Δ* cells support a correct transcriptional response. Under such conditions, a very slight decrease was observed in *cpc2Δ* cells compared with control cells in the transcriptional activation of genes like *srx1*⁺ (sulfiredoxin; Quinn *et al.*, 2002) and *ctt1*⁺ (cytoplasmic catalase; Degols and Russell, 1997), whose expression is dependent on the activity of both Atf1 and Pap1 transcription factors (Quinn *et al.*, 2002) (Figure 7A). In contrast, the induction kinetics of Pap1-dependent genes, like *tpx1*⁺ (encoding thioredoxin peroxidase, Vivanco *et al.*, 2006) and, most notably *trr1*⁺ (thioredoxin reductase; Benko *et al.*, 1998), was significantly retarded in a *cpc2Δ* background (Figure 7A), which is congruent with the delay in nuclear translocation of Pap1 (Figure 6C). However, such delay in H₂O₂-treated *cpc2Δ* cells remained unexplained on the bases of a transcriptional defect in the induced expression of Atf1-dependent genes. Thus, we analyzed the cellular levels of cytoplasmic catalase (Ctt1), which is involved in the detoxifying activity against oxidative stress in eukaryotic cells, in control and *cpc2Δ* cultures treated with 1 mM H₂O₂. As shown in Figure 7B, the increased Ctt1 synthesis observed in H₂O₂-treated control cells was absent in the *cpc2Δ*

mutant, indicating a role for Cpc2 in the modulation of the intracellular level of cytoplasmic catalase under these conditions. These results suggest that Cpc2 is important in *S. pombe* to positively regulate the cellular defense against high doses of hydrogen peroxide at a translational level by favoring the synthesis of enzymes such as Ctt1, whose detoxifying activity is essential to allow Pap1-dependent gene expression.

Localization of Cpc2 at the Ribosome Is Essential to Regulate Pyp1, Pyp2, and Atf1 Protein Levels

A work by Coyle *et al.* (2009) has recently demonstrated that two evolutionary conserved charged amino acids on one side of the β-propeller structure of Asc1, the *S. cerevisiae* RACK1 orthologue, Arg38 and Lys40 (Arg36 and Lys38 in fission yeast), are responsible for RACK1 association with the 40S subunit of the ribosome in vivo. To analyze the biological significance of the ribosome localization of Cpc2 in fission yeast we constructed strains expressing either wild type or R36D K38E variant of Cpc2 fused to the green fluorescent protein at its C terminus, in a *cpc2Δ* background (see Materials and Methods). As shown in Figure 8A, both Cpc2-GFP and Cpc2(DE)-GFP fusions localized at the cell cytoplasm, similarly to a genomic Cpc2-GFP version expressed from its natural locus, and were expressed at nearly the same level (Figure 8B). However, the cytoplasmic distri-

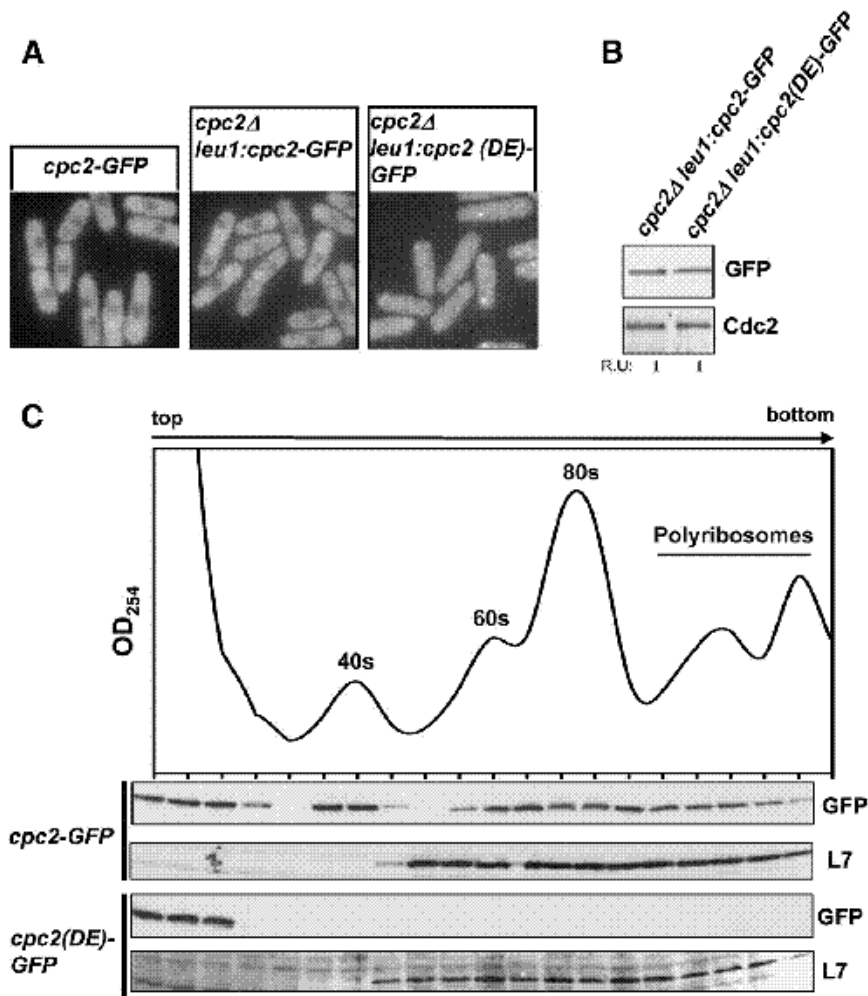


Figure 8. Construction of a *S. pombe* strain expressing a Cpc2 version unable to bind the ribosome in vivo. (A) Subcellular localization of Cpc2 variants. Mid log phase cells of strains AN070 (*cpc2 GFP*, control), AN071 (*leu1:cpc2 GFP*, *cpc2Δ*), and AN072 (*leu1:cpc2(DE) GFP*, *cpc2Δ*) growing in YES medium were visualized by fluorescence microscopy. (B) The Cpc2 GFP and Cpc2(DE) GFP fusions are expressed at a similar level. GFP fusions were detected in total cell extracts from strains AN071 (*leu1:cpc2 GFP*, *cpc2Δ*) and AN072 (*leu1:cpc2(DE) GFP*, *cpc2Δ*) by immunoblotting with anti GFP antibodies. Anti Cdc2 antibody was used for loading control. (C) Polysome Western blot analysis for in vivo ribosome binding. Strains AN071 and AN072 were grown in YES medium to early log phase, treated with cycloheximide, and the whole cell extracts processed for polysome analysis by velocity sedimentation on a 7–47% (wt/vol) sucrose gradient. After fractionation, the absorbance profile for each fraction was measured at 254 nm. A typical result is shown, with fractions corresponding to soluble (top), 40S, 60S, 80S, and polyribosomes. Aliquots from each fraction were resolved by SDS PAGE and the elution profile for Cpc2 GFP or Cpc2 (DE) GFP was determined by Western blot analysis with anti GFP antibody. Anti L7 antibody was used as an internal ribosomal control.

bution of Cpc2(DE)-GFP was more diffuse, and some punctate spots were visible throughout the cells (Figure 8A). Regardless, analysis of the distribution of both Cpc2-GFP and Cpc2(DE)-GFP by sucrose gradient fractionation of polyribosomes isolated from growing cells indicated that, contrary to wild-type cells, R36D K38E mutation in Cpc2 disrupted almost completely its ability to associate with ribosomes in vivo, with >95% of free, unbound protein (Figure 8C). Importantly, an increase in basal Pmk1 phosphorylation was evident in *cpc2Δ* cells expressing Cpc2(DE)-GFP compared with those expressing Cpc2-GFP (Figure 9A). These results suggest that Cpc2 localization at the ribosome is critical to negative regulate of Pmk1 activity in growing cells. Indeed, similar to *cpc2Δ* cells, a strain expressing Cpc2(DE)-GFP fusion was defective in Pmk1 deactivation under stress (Figure 9A), due to a decrease in the protein levels of both Pyp1 and Pyp2 tyrosine phosphatases (Figure 9B). Atf1 protein levels in both growing cells and in cultures subjected to either osmotic saline or oxidative stresses were also down-regulated in the Cpc2(DE) mutant (Figure 9C). As a whole, these results confirm that in fission yeast ribosome binding of Cpc2 is essential to positively regulate the translation efficiency of Pyp1, Pyp2, and Atf1. Finally, we also noticed that *cpc2Δ* cells expressing wild-type Cpc2-GFP, but not Cpc2(DE)-GFP, recovered their normal cell size at division (Figure 9D), indicating that Cpc2 binding to the ribosome is important to control the G2/M transition of the cell cycle in fission yeast.

DISCUSSION

In eukaryotic cells, RACK1 is a scaffold protein involved in a myriad of signal transduction pathways. However, the role of the fission yeast orthologue Cpc2 as a modulator of the signal transduction machinery had not been investigated in detail earlier. Similar to RACK1, Cpc2 was reported to interact in vivo with the PKC orthologue Pck2 (Won *et al.*, 2001). Also, others and ourselves showed that Pck2 is a member of the Pmk1 cell integrity MAPK pathway in fission yeast (Ma *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2008), suggesting that Cpc2 might be an integral part of this MAPK cascade. However, several lines of evidence obtained in this work indicate that, contrary to our initial prediction, Cpc2 is not a member of the Pmk1 signaling pathway. First, the cell separation and cell wall integrity defects described previously as associated to deletion of members of the cell integrity MAPK module (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997) are exacerbated in a *cpc2Δ* background. Second, the fact that cell size at division is higher in both *cpc2Δ pck2Δ* and *cpc2Δ pmk1Δ* double mutants than in *pck2Δ* or *pmk1Δ* single mutants supports that the role of Cpc2 in the control of G2/M transition in the fission yeast is independent on Pmk1 activity. Third, and most important, whereas RACK1 functions in mammalian cells as an adaptor for MAPK JNK phosphorylation at Ser129 by PKC, which is required for JNK activation in response to several agents (López-Bergami *et al.*, 2005), in *cpc2Δ* cells of fission yeast both the basal and the stress

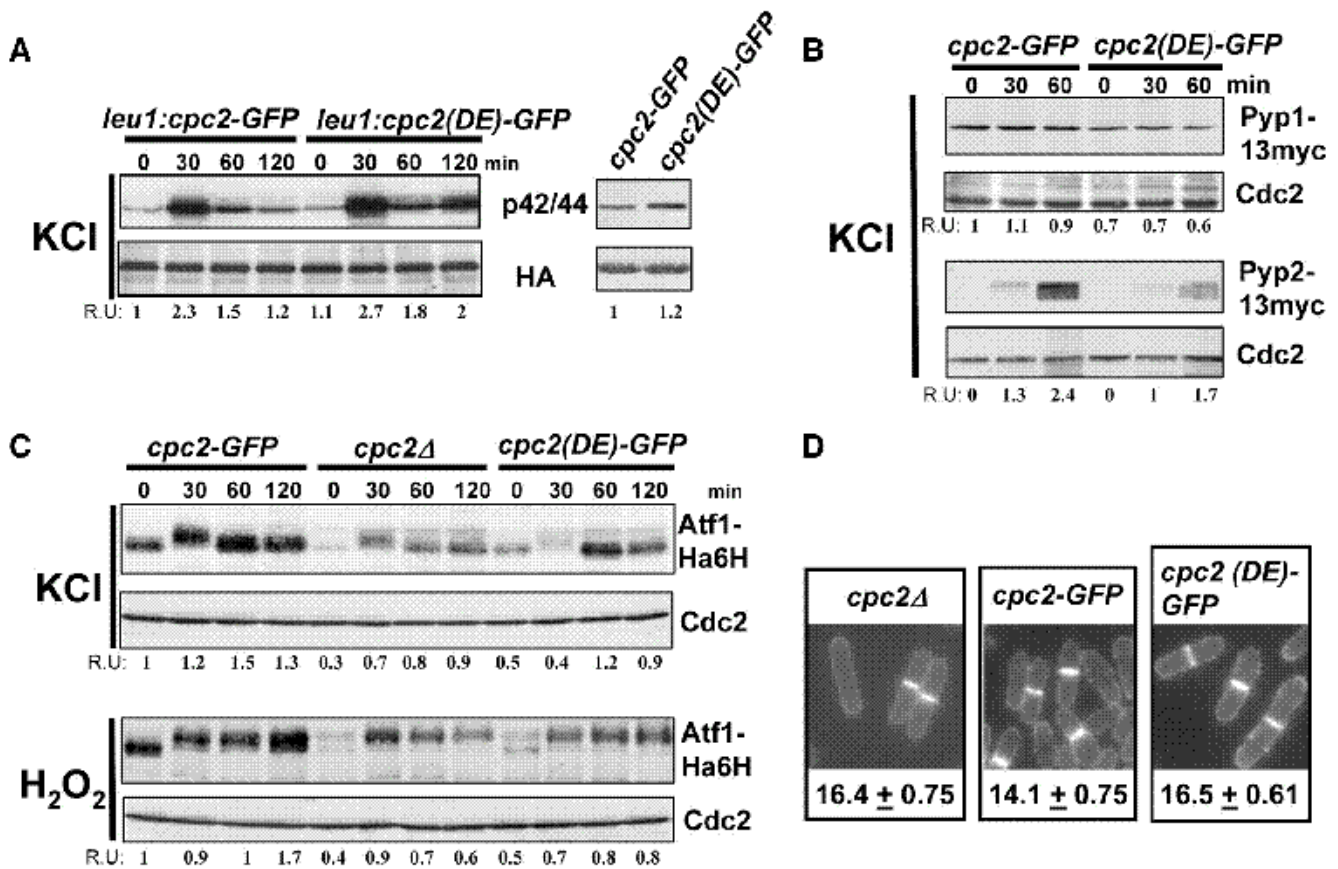


Figure 9. Ribosome binding of Cpc2 is essential to positively regulate the translation efficiency of Pyp1, Pyp2, and Atf1 in fission yeast. (A) Increased Pmk1 phosphorylation in cells expressing a Cpc2(DE) version. Strains AN071 (*pmk1 HA6H leu1:cpc2 GFP, cpc2Δ*) and AN072 (*pmk1 HA6H leu1:cpc2(DE) GFP, cpc2Δ*) were grown to mid log phase in YES medium and treated with 0.6 M KCl for the indicated times. Pmk1 HA6H was purified by affinity chromatography under native conditions and the activated and total Pmk1 detected by immunoblotting with anti phospho p42/44 or anti HA antibodies, respectively. (B) Decreased Pyp1 and Pyp2 protein levels in the Cpc2(DE) mutant. Strains AN091 (*leu1:cpc2 GFP cpc2Δ pyp1 13myc*) and AN092 (*leu1:cpc2(DE) GFP cpc2Δ pyp1 13myc*) (upper panel), or AN102 (*leu1:cpc2 GFP cpc2Δ pyp2 13myc*) and AN103 (*leu1:cpc2(DE) GFP cpc2Δ pyp2 13myc*) (lower panel) were grown in YES medium to mid log phase and treated with 0.6 M KCl. Aliquots were harvested at the times indicated and total extracts obtained. Pyp1 13myc or Pyp2 13myc fusions were detected by immunoblotting with anti c myc antibody. Anti Cdc2 antibody was used for loading control. (C) Decreased Atf1 protein levels in the Cpc2(DE) mutant. Strains AN081 (*atf1 HA6H leu1:cpc2 GFP cpc2Δ*) and AN082 (*atf1 HA6H leu1:cpc2(DE) GFP cpc2Δ*) were grown as above and treated with either 0.6 M KCl (top) or 1 mM H₂O₂ (bottom). Atf1 was purified by affinity chromatography from cell extracts of aliquots harvested at different time and detected by immunoblotting with anti HA antibody. Anti Cdc2 antibody was used for loading control. (D) *cpc2Δ* cells expressing the Cpc2(DE) version do not recover normal cell size at division. Cell morphology and size in strains AN100 (*cpc2Δ*), AN071 (*leu1:cpc2 GFP, cpc2Δ*), and AN072 (*leu1:cpc2(DE) GFP, cpc2Δ*) growing in EMM2 medium and stained with calcofluor white are shown.

induced activation of MAPK Sty1 and MAPK Pmk1 are increased. Furthermore, in striking contrast with the mammalian model, *cpc2⁺* deletion triggers Pmk1 basal activity even in a *pck2Δ* background, suggesting that Cpc2 negatively regulates MAPK activity in fission yeast by a mechanism distinct from a role as Pck2 adaptor.

Which is the mechanism used by Cpc2 to regulate MAPK activity and to modulate cellular response against stress? In both human, budding and fission yeast cells RACK1/Asc1/Cpc2 associates with the 40S ribosomal subunit (Shor and McLeod, 2003; Baum *et al.*, 2004; Coyle *et al.*, 2009). Also, the study by Shor and McLeod (2003) demonstrated that the loss of *cpc2⁺* in *S. pombe* elicits a decreased steady state level of various proteins, some of which (like ribosomal protein L25) are probably regulated at the level of translation. The results presented in our work strongly support the interpretation that Cpc2 modulates the translation of a specific subset of mRNAs (Shor and McLeod, 2003). Probably, Cpc2 exerts its function as a positive translational regulator of mRNAs encoding Pyp1 and Pyp2 tyrosine phosphatases, which de-

activate both Sty1 and Pmk1 (Madrid *et al.*, 2007). Consistent with this hypothesis, Pyp1 and Pyp2 protein levels diminished in *cpc2Δ* cells growing exponentially or subjected to different stresses, although the expression of the corresponding mRNAs was not significantly affected by *cpc2⁺* deletion. Importantly, this translational control was specific for *pyp1⁺* and *pyp2⁺* mRNAs, because the protein levels of other phosphatases known to be involved in Sty1 and/or Pmk1 deactivation, such as Pmp1, Ptc1, or Ptc3, remained unchanged in the absence of Cpc2.

Alternatively, Cpc2 also regulates positively the translation of mRNA encoding the transcription factor Atf1. Atf1 is phosphorylated and stabilized by Sty1 MAPK to play a critical role in the response of *S. pombe* against a variety of stress conditions (Chen *et al.*, 2003). Our results support, however, that the low levels of Atf1 protein observed in *cpc2Δ* cells do not compromise its function as a transcriptional activator in response to stress, because the induced expression of Atf1-dependent genes (including *pyp1⁺* and *pyp2⁺*) in response to osmotic or oxidative stress was not

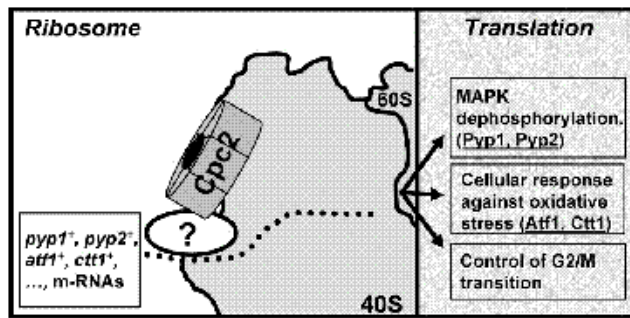


Figure 10. Proposed functional role for RACK orthologue Cpc2 in fission yeast. The Cpc2 protein regulates important biological processes at the ribosome level by favoring the translation of genes whose products may inactivate MAPK cascades (Pyp1 and Pyp2 MAPK phosphatases), enhance cellular defense against oxidative stress (transcription factor Atf1, cytoplasmic catalase Ctt1), and control G2/M transition of the cell cycle. The question mark highlights that the additional role of one or several proteins is not discarded.

significantly affected by *cpc2*⁺ deletion. These data agree with previous work showing that there is still a robust transcriptional activation of Atf1-dependent genes in response to stress in a mutant strain expressing low levels of an unstable version of the transcription factor devoid of Sty1-phosphorylation sites (Lawrence *et al.*, 2007). In this context, we have found that although the transcriptional induction of Atf1-dependent genes in *cpc2Δ* cells is not affected, Cpc2 regulates the cellular defense against hydrogen peroxide at a translational level by favoring the synthesis of detoxifying enzymes such as cytoplasmic catalase Ctt1. Probably, the synthesis of other detoxifying proteins may be also compromised in *cpc2Δ* cells.

The recent demonstration of the existence of conserved charged amino acids that are responsible for the *in vivo* Asc1/RACK1 association with the ribosome (Coyle *et al.*, 2009) allowed our demonstration that the function of Cpc2 as a modulator of both the MAPK activity and the cellular response against oxidative stress relies on its ability for binding to the 40S subunit of the *S. pombe* ribosome. In addition, the putative role of Cpc2 in regulating the G2/M transition of the cell cycle seems to depend also on its function as a ribosomal protein. These results raise several important questions. One refers to the mechanism whereby Cpc2 regulates the recruitment and translation of specific mRNAs. Considering that Cpc2 lacks evident RNA binding motifs and taking into account the versatility of RACK1 as a platform to bind different proteins, it seems likely that one or several Cpc2 binding partners might be involved in the recruitment of specific mRNAs to the ribosome, as depicted in Figure 10. In *S. cerevisiae*, it has been described that Scp160, an mRNA binding protein orthologue to vertebrate vigilin, associates with ribosomes in an Asc1/RACK1-dependent manner, thus supporting that the Scp160-Asc1 complex mediates the translation activity of ribosomes programmed with specific mRNAs (Baum *et al.*, 2004). The Scp160 orthologue in fission yeast is Vg1, a putative mRNA binding protein with 12 KH domains. However, Vg1-null cells do not display any of the phenotypes associated to Cpc2 deletion, such as increased cell length at G2/M transition or Pmk1 hyperactivation (unpublished data). Hence, it seems plausible that other unknown RNA binding protein(s) might be involved in this process. Another candidate to perform such role is RNA binding protein Msa2/Nrd1, which interacts *in vivo* with Cpc2 and whose deletion causes

initiation of sexual development without nutrient starvation (Tsukahara *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2004). Also, Msa2/Nrd1 binds and stabilizes Cdc4 mRNA, encoding myosin II light chain, and Nrd1 phosphorylation by Pmk1 negatively regulates its binding activity to Cdc4 mRNA (Sato *et al.*, 2009). However, the opposite roles described for Cpc2 and Msa2/Nrd1 in sexual differentiation (Jeong *et al.*, 2004), together with the absence in Msa2-null cells of the main phenotypes associated to Cpc2 deletion, makes unlikely that this RNA-binding protein will be the Cpc2 binding partner involved in mRNA recruitment to the ribosome. A similar conclusion can be drawn in the case of Rnc1, another RNA-binding protein which is phosphorylated by Pmk1 and binds and stabilizes Pmp1 dual-specificity MAPK phosphatase involved in Pmk1 dephosphorylation (Sugiura *et al.*, 2003). Our results clearly show that Pmk1-Rnc1 control of Pmp1 is independent on Cpc2, because the protein levels of Pmp1 remained unchanged in the absence of Cpc2. Regardless, the identification of the complete subset of mRNAs whose translation is positively regulated by Cpc2 (besides those described here), may deserve follow-up investigation. Our results provide for the first time strong evidence that a RACK1-type protein functions from the ribosome to control the magnitude of the activation of MAPK cascades, the cellular defense against oxidative stress, and the progression of the cell cycle, by regulating positively the translation of specific genes whose products are involved in key biological processes. On the basis of these data, we anticipate that some of the previously described biological functions of RACK1 in mammalian cells might be linked to its function as a putative translational regulator.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Pérez (Consejo Superior de Investigaciones Científicas/University of Salamanca, Spain) for helpful discussions and comments on the manuscript; E. Boye (Institute for Cancer Research, Norway), T. Kato (ERATO, Japan), J. B. Millar (University of Warwick, United Kingdom), P. Pérez, M. A. Rodríguez-Gabriel (Universidad Autónoma, Madrid, Spain), and T. Toda (London Research Institute, United Kingdom) for kind supply of yeast strains; and F. Garro for technical assistance. Thanks to Javier Campoy (University of Murcia) for help and advice with polysome fractionation. A. N. is a predoctoral fellow from Fundación Séneca (Región de Murcia), Spain. A. F. is a postdoctoral fellow from the University of Murcia. This work was supported by grants BFU2008-01653 from Ministerio de Ciencia e Innovación and 08725/PI/08 from Fundación Séneca (Región de Murcia), Spain.

REFERENCES

- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., Mcleod, M., and Warbrick, E. (1993). Experiments with Fission Yeast. A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A. Jrd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943–951.
- Barba, C., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Canto, M., and Camasdo, J. (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell. Signal.* 20, 748–757.
- Baum, S., Bittins, M., Frey, S., and Seedorf, M. (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem. J.* 380, 823–830.
- Benko, Z., Sipiczki, M., and Carr, A. M. (1998). Cloning of *caf1*⁺, *caf2*⁺ and *caf4*⁺ from *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in multidrug resistance, UV and pH sensitivity. *Mol. Gen. Genet.* 260, 434–443.
- Castillo, E. A., Ayté, J., Chiva, C., Moldón, A., Carrascal, M., Abián, J., Jones, N., and Hidalgo, E. (2002). Diethylmaleate activates the transcription factor Papi1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol. Microbiol.* 45, 243–254.
- Chaudhuri, I., Soding, J., and Lupas, A. N. (2008). Evolution of the beta-propeller fold. *Proteins* 71, 795–803.

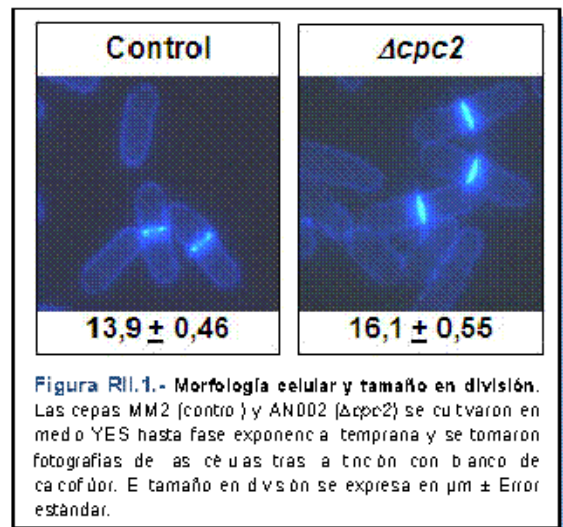
- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bähler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* 14, 214–229.
- Coyle, S. M., Gilbert, W. V., and Doudna, J. A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1626–1634.
- Degols, C., Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2870–2877.
- Degols, C., and Russell, P. (1997). Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3356–3363.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351–7367.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372.
- Jeong, H. T., Oowatari, Y., Abe, M., Tanaka, K., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (2004). Interaction between a negative regulator (Maa2/Nrd1) and a positive regulator (Cpc2) of sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1621–1626.
- Lawrence, C. L., Maeka, H., Worthington, J. L., Reiter, W., Wilkinson, C. R., and Jones, N. (2007). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *J. Biol. Chem.* 282, 5160–5170.
- Loewith, R., Hubberstey, A., and Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the mkl1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 113, 153–160.
- López-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L. H., and Ronai, Z. (2005). RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C. *Mol. Cell.* 19, 309–320.
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y., and Sugiyama, R. (2006). Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 17, 3028–3037.
- Madrid, M., Núñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2007). Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1 by protein phosphatases. *Mol. Biol. Cell* 18, 4405–4419.
- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., Gacto, M., and Cansado, J. (2004). A cooperative role for Atf1 and Pcp1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 279, 41594–41602.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M., and Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 281, 2033–2043.
- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, C. B., Houslay, M. D., and Yarwood, S. J. (2002). The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 62, 1261–1273.
- McLeod, M., Shor, B., Caporaso, A., Wang, W., Chen, H., and Hu, L. (2000). Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase to regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4016–4027.
- Millar, J. B., Buck, V., and Wilkinson, M. G. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* 9, 2117–2130.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 283, New York: Academic Press, 506–520.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep.* 5, 1137–1141.
- Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., and Toone, W. M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* 13, 805–816.
- Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagiwara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H., and Sugiyama, R. (2009). Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 20, 2473–2485.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C. M., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 957–962.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378, 739–743.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* 10, 2276–2288.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1997). Stress-activated protein kinase pathway in cell cycle control of fission yeast. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 283, New York: Academic Press, 506–520.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., and Russell, P. (1998). Heat Stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 9, 1339–1349.
- Shor, B., and McLeod, M. (2003). Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 278, 49119–49128.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Near, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 24, 181–185.
- Soto, T., Beltrán, F. F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J. B. A., Vicente-Soler, J., Cansado, J., and Gacto, M. (2002). Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* 269, 1–10.
- Sugiyama, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., and Kuno, T. (1998). pmpl⁺, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.* 17, 140–148.
- Sugiyama, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S. O., and Kuno, T. (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* 424, 961–966.
- Takada, H., et al. (2007). Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 18, 4794–4802.
- Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiyama, R., and Kuno, T. (1996). The fission yeast pmk1⁺ gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6752–6764.
- Tsukahara, K., Yamamoto, H., and Okayama, H. (1998). An RNA binding protein negatively controlling differentiation in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4488–4498.
- Tvegård, T., Soltani, H., Skjelberg, H. C., Krohn, M., Nilssen, E. A., Kearsey, S. E., Crallert, B., and Boye, E. (2007). A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes Dev.* 15, 649–664.
- Vivanco, A. P., Castillo, E. A., Jones, N., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2004). Activation of the redox sensor Pcp1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol. Microbiol.* 52, 1427–1435.
- Vivanco, A. P., Jara, M., Zuñiga, A., Sansó, M., and Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Mol. Genet. Genomics* 276, 495–502.
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., and Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* 10, 2289–2301.
- Won, M., Park, S. K., Hoo, K. L., Jang, Y. J., Chung, K. S., Kim, D. U., Kim, H. B., and Yoo, H. S. (2001). Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homologue, is involved in actin cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 10–15.
- Yamada, K., Nakagawa, C. W., and Mutoh, N. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant. *Yeast* 15, 1125–1132.
- Yoshida, T., Toda, T., and Yanagida, M. (1994). A calcineurin-like gene ppb1⁺ in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J. Cell Sci.* 107, 1725–1735.
- Zaitsevskaya-Carter, T., and Cooper, J. A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J.* 16, 1318–1331.
- Zhan, K., Vattem, K. M., Bauer, B. N., Dever, T. E., Chen, J. J., and Wek, R. C. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7134–7146.

Capítulo II:

Cpc2 regula la transición G₂/M del ciclo celular

1.-Cpc2 COMO REGULADOR DEL CICLO CELULAR

Las células de *Schizosaccharomyces pombe* carentes de *cpc2*⁺ presentan un claro incremento del tamaño en división (McLeod *et al.*, 2000; Figura RII.1), lo que sugiere la existencia de un retraso en la transición G₂/M del ciclo celular. Sin embargo, el ortólogo de Cpc2 en células humanas, RACK1, regula la transición G₁/S modulando la actividad de la quinasa Src. Así, la sobre-expresión de RACK1 induce un bloqueo en la fase G₀/G₁ por inhibición de Src (Chang *et al.*, 1998; Mamidipudi *et al.*, 2004), mientras que una reducción en la expresión de RACK1 acelera la transición hacia la fase S (Mamidipudi *et al.*, 2004; ver Introducción). Dado el diferente papel que parece realizar RACK1/Cpc2 en la progresión del ciclo celular según el modelo estudiado, decidimos profundizar en el estudio de Cpc2 como un regulador del ciclo celular en *S. pombe*.

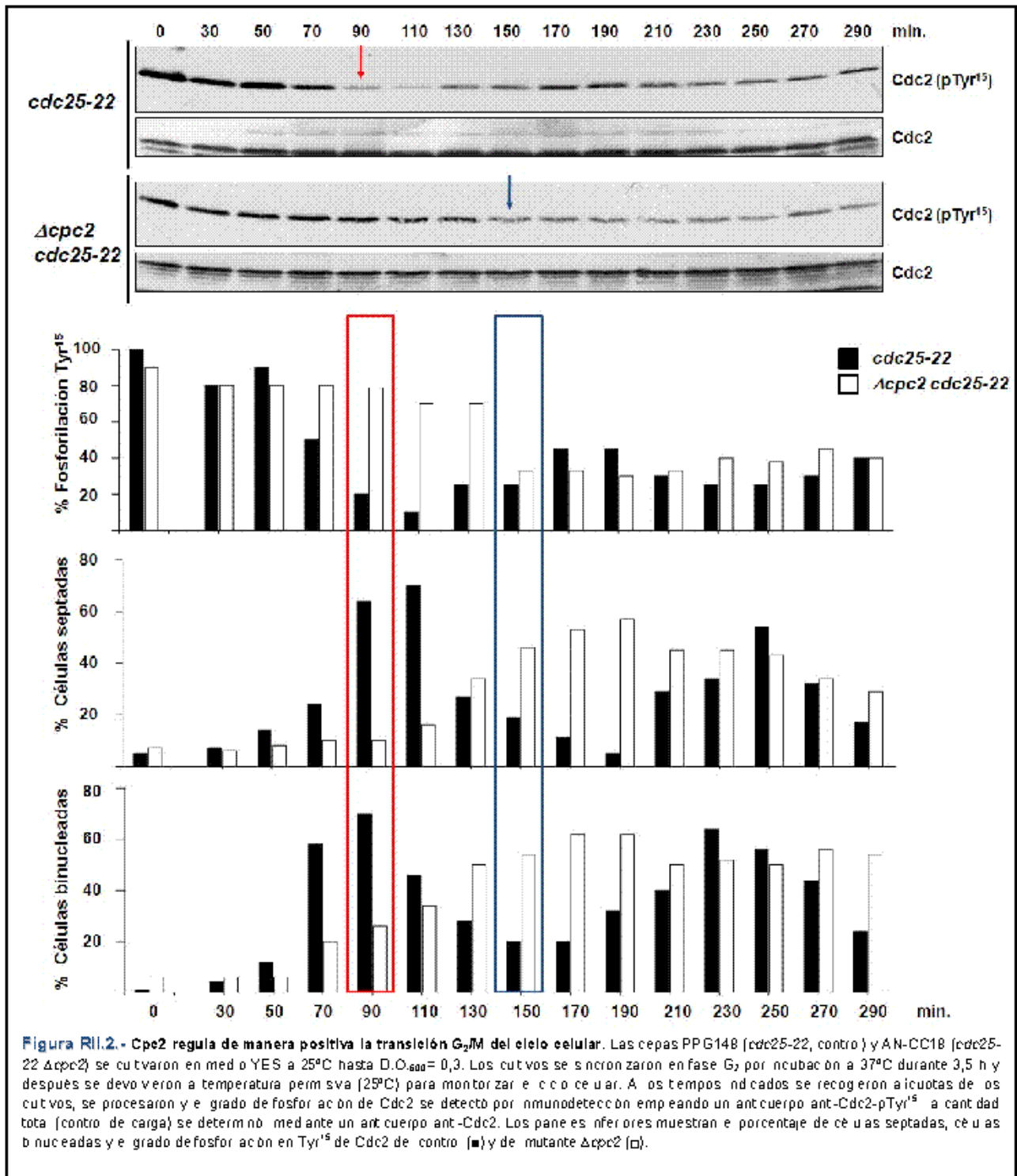


1.1.- Cpc2 regula de manera positiva la transición G₂/M del ciclo celular

El primer paso para abordar este estudio fue analizar el papel de Cpc2 durante la progresión del ciclo mitótico. En las células eucariotas, la quinasa Cdc2/Cdk1 es la principal responsable de la transición G₂/M del ciclo celular (ver Introducción). Su actividad se encuentra regulada fundamentalmente por la fosforilación del residuo de tirosina-15 (Tyr¹⁵), que mantiene a la quinasa en estado inactivo durante la fase G₂ (Russell y Nurse, 1987; Gould y Nurse, 1989; Lundgren *et al.*, 1991), y que es desfosforilada al entrar en mitosis por acción de la fosfatasa Cdc25 (Russell y Nurse, 1986; Millar *et al.*, 1991). Por tanto, decidimos examinar los niveles de fosforilación en Tyr¹⁵ de Cdc2 a lo largo del ciclo celular en presencia y ausencia de Cpc2.

Con este objetivo, empleamos las cepas control PPG148 (*cdc25-22*) y mutante AN-CC18 (Δ*cpc2 cdc25-22*), que expresan un alelo termosensible de la fosfatasa Cdc25 (*cdc25-22*), lo que permite sincronizar los cultivos en fase G₂ tras bloquear el ciclo incubando a las células a temperatura restrictiva (37°C) durante 3,5 horas. Después de transferir los cultivos a una temperatura permisiva (25°C) monitorizamos la progresión del ciclo celular en ambas cepas. Se tomaron alícuotas de los cultivos a distintos tiempos y se realizaron preparaciones para determinar la fase del ciclo en la que se encontraban mediante microscopía de

fluorescencia (tinción con blanco de calcoflúor y DAPI; ver Materiales y Métodos). Al mismo tiempo, recogimos muestras para analizar la fosforilación en Tyr¹⁵ de Cdc2 mediante experimentos tipo *Western*. Como muestra la Figura RII.2, en las células carentes de *cpc2*⁺ la desfosforilación máxima de Cdc2 se observó alrededor del minuto 150 post-bloqueo, lo que supone un claro retraso comparado con la progresión mitótica de la cepa control (desfosforilación máxima entre 90-110 minutos).



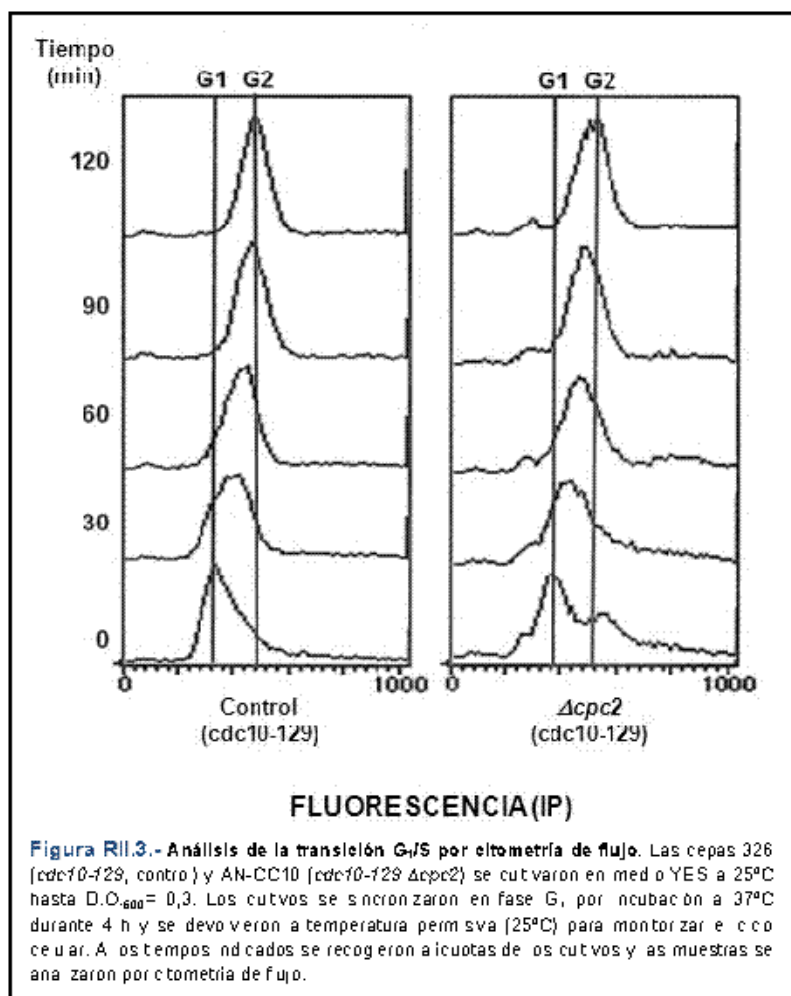
Además, el porcentaje máximo de células septadas y binucleadas también aparece retrasado en el mutante $\Delta cpc2 cdc25-22$ en relación a la cepa control (Figura RII.2). En conjunto, estos resultados demuestran que las células $\Delta cpc2$ presentan un defecto en la transición G_2/M del ciclo celular.

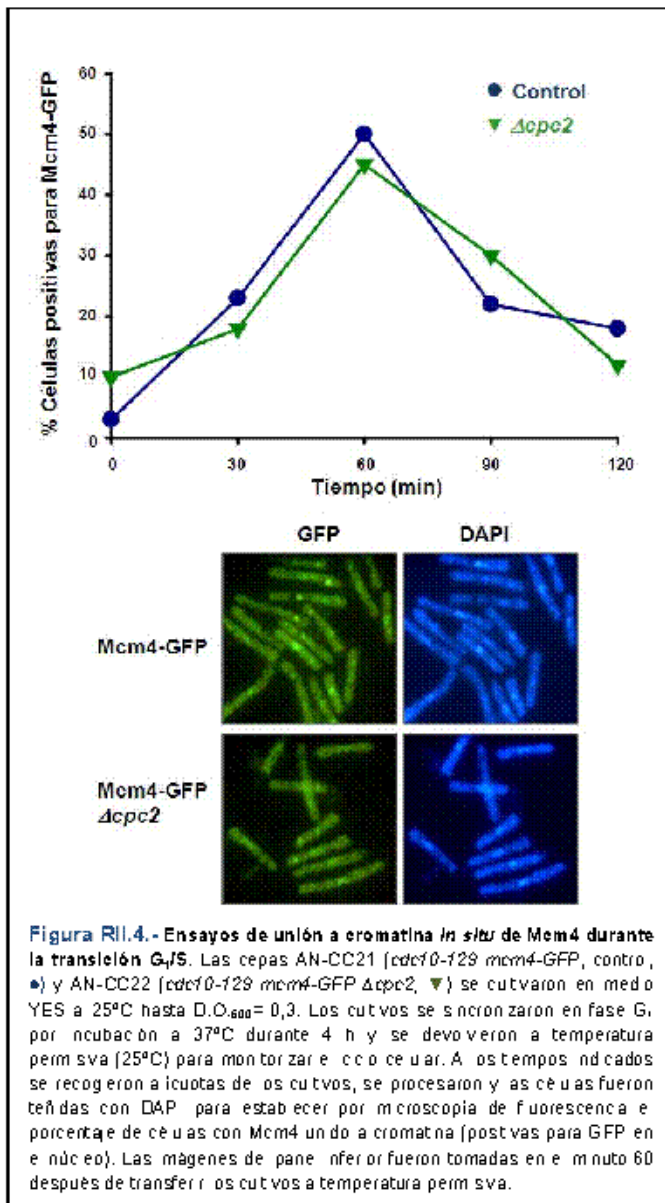
1.2.- Cpc2 no regula la transición G_1/S del ciclo celular en *S. pombe*

Como se mencionó anteriormente, en células humanas RACK1 promueve la transición G_1/S a través de Src (Chang *et al.*, 1998; Mamidipudi *et al.*, 2004; ver Introducción). Aunque los resultados anteriores definían a Cpc2 como un regulador de la fase G_2/M , quisimos también analizar su posible implicación durante la transición G_1/S de ciclo celular.

Para ello diseñamos una serie de experimentos con estirpes que expresan un alelo termosensible de Cdc10 (*cdc10-129*), un factor de transcripción necesario para la inducción de genes implicados en la progresión durante la fase S del ciclo celular (Nurse *et al.*, 1976; Lowndes *et al.*, 1992). Las cepas 326 (*cdc10-129*, control) y AN-CC10 (*cdc10-129 Δcpc2*) se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial temprana y se sincronizaron en fase G_1 incubando los cultivos a temperatura restrictiva (37°C) durante 4 horas. Tras este tiempo, los cultivos se transfirieron de nuevo a

temperatura permisiva (25°C). El análisis por citometría de flujo de las muestras tomadas a distintos intervalos de tiempo reveló que la cinética en el incremento del contenido de ADN de 1C a 2C durante la transición G_1/S fue similar en ambas estirpes (Figura RII.3), lo que sugería que, en principio, Cpc2 no participaría en la regulación de esta fase del ciclo celular.

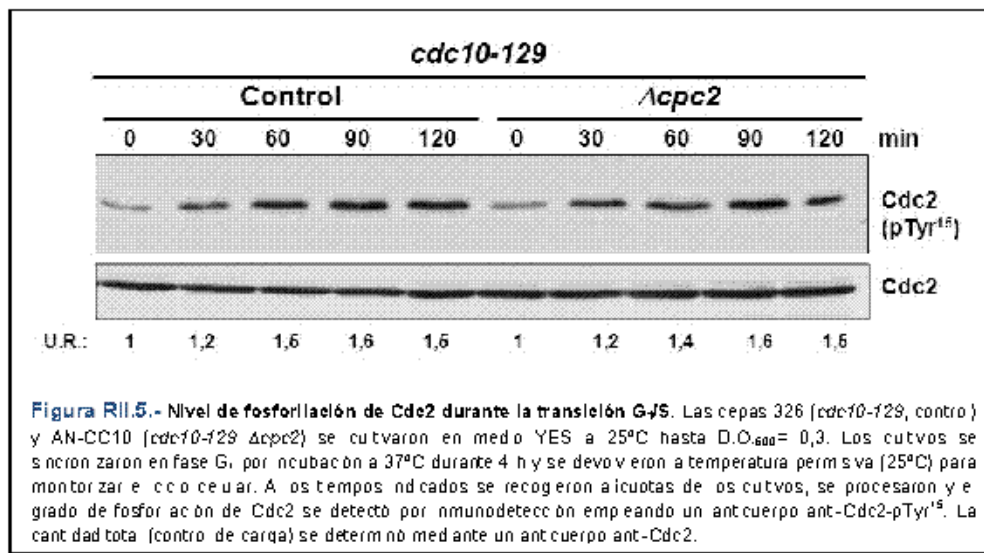




microscopía de fluorescencia de la unión de Mcm4 del complejo de pre-replicación durante la progresión hacia la fase S. Como muestra la Figura RII.4, la presencia de Mcm4-GFP en el núcleo (unión estable a la cromatina) fue máxima a los 60 minutos tanto en células de la cepa control como en el mutante $\Delta cpc2$, y disminuyó a partir de ese momento según la cinética previamente descrita (Kearsey *et al.*, 2000).

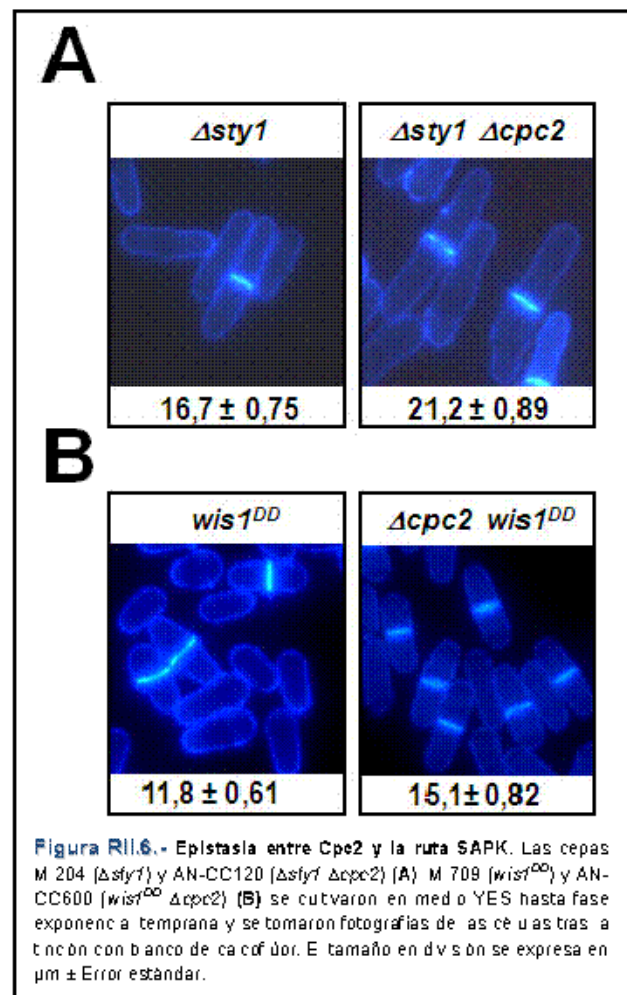
A continuación determinamos el grado de fosforilación en Tyr¹⁵ de Cdc2 durante la transición G₁/S. Como puede observarse en la Figura RII.5, tanto las células control como el mutante $\Delta cpc2$ mostraron un incremento similar en el nivel de fosforilación de Cdc2 durante el progreso de la fase S, y de manera análoga a lo descrito en trabajos anteriores (Kovelman y Russell, 1996). En conjunto, nuestros resultados confirman que Cpc2 no participa en la regulación de la transición G₁/S del ciclo celular en *S. pombe*.

Para confirmar este resultado realizamos dos experimentos distintos. En primer lugar estudiamos la cinética de unión a la cromatina durante esta fase del ciclo celular de Mcm4, un factor que forma parte del complejo de pre-replicación (*pre-RC*) implicado en la duplicación del ADN durante la fase S temprana (Coxon *et al.*, 1992). Trabajos anteriores habían demostrado que en *S. pombe* la unión de Mcm4 a la cromatina durante la anafase B es muy estable, siendo desplazado del núcleo conforme avanza la replicación del ADN durante la fase S (Kearsey *et al.*, 2000). Por todo ello constituye una herramienta muy útil para investigar la cinética de la transición G₁/S en diferentes condiciones. Los cultivos de las cepas AN-CC21 (*cdc10-129 mcm4-GFP*, control) y AN-CC22 (*cdc10-129 mcm4-GFP Δcpc2*) se sincronizaron en fase G₁, y, una vez transferidos a temperatura permisiva, realizamos un seguimiento mediante



2.- Cpc2 Y LA RUTA SAPK NO INTERACCIONAN DURANTE LA REGULACIÓN DE LA MITOSIS

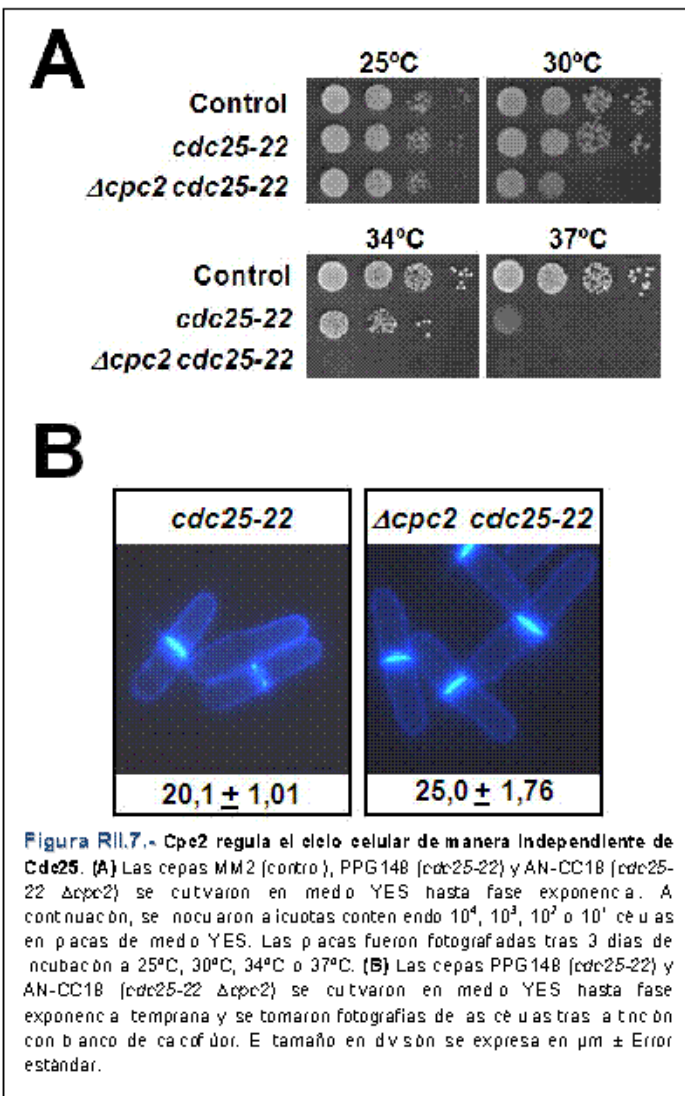
Los resultados descritos en el Capítulo I de esta Memoria demostraron que Cpc2 regula negativamente el grado de activación de las rutas de MAP quinasas de integridad celular y de respuesta a estrés. En *S. pombe*, la ruta SAPK y su efector la MAP quinasa Sty1 participan en la regulación de la entrada en mitosis, de modo que los mutantes carentes de *sty1*⁺ presentan un mayor tamaño en división que el control (Shiozaki y Russell, 1995). La regulación de Sty1 sobre la progresión mitótica tiene lugar al menos a dos niveles: i) mediante la fosforilación de la Polo quinasa Plo1 en el residuo Ser⁴⁰², y promoviendo su movilización al corpúsculo polar del huso mitótico ("Spindle Pole Body", SPB) donde modula la actividad de Cdc2 a través de Cdc25 y Wee1 (Petersen y Hagan, 2005); y ii) uniéndose y fosforilando a Srk1, una proteína de la familia de las MAPKAP quinasas de tipo 2 que controla la entrada en



mitosis fosforilando e inhibiendo a la fosfatasa Cdc25 (López-Avilés *et al.*, 2005). Así, las células $\Delta sty1$ muestran un tamaño mayor en división como resultado de un retraso en la transición G_2/M (Figura RII.6A). Por el contrario, las células de los mutantes que expresan una versión activa constitutivamente de la MAPKK Wis1 ($wis1^{DD}$) entran en mitosis prematuramente y se dividen a un tamaño celular menor debido a la hiperactivación de Sty1 (Shiozaki *et al.*, 1998) (Figura RII.6B).

Sin embargo, y como muestra en la Figura RII.6, la delección de $cpc2^+$ produjo un incremento adicional en el tamaño en división de los mutantes $\Delta sty1$ o $wis1^{DD}$, lo que sugiere que el control de Cpc2 sobre la progresión G_2/M del ciclo celular es independiente de la función de la ruta SAPK durante la mitosis.

3- INTERACCIÓN ENTRE Cpc2 Y LOS REGULADORES DE Cdc2 DURANTE LA PROGRESIÓN G_2/M



En vista de los resultados anteriores decidimos centrar nuestra atención sobre los elementos que modulan de forma directa la actividad de Cdc2 durante la progresión mitótica. Como ya se ha comentado, el grado de fosforilación de Cdc2 en Tyr¹⁵ es regulado de una manera antagónica por la fosfatasa Cdc25 y la quinasa Wee1 (ver Introducción), por lo que nuestro siguiente paso consistió en explorar la posible relación funcional entre Cpc2 y ambas proteínas.

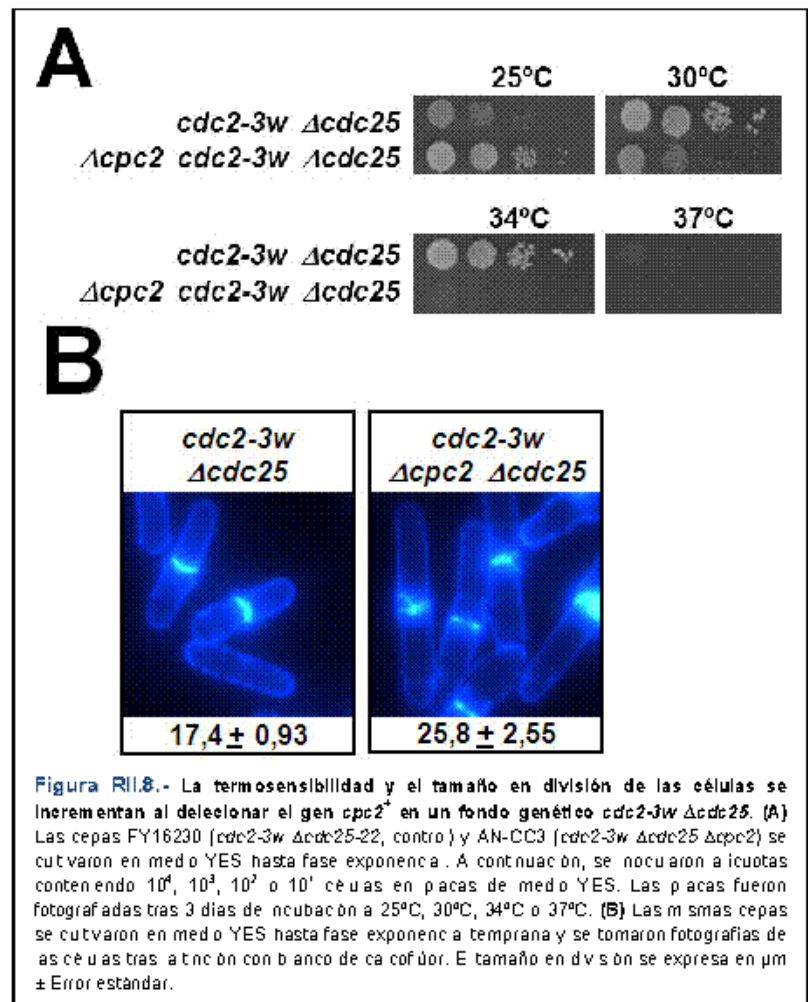
3.1.- Cpc2 regula el ciclo celular independientemente de la fosfatasa Cdc25

El análisis comparativo del crecimiento a distintas temperaturas de

cepas portadoras del alelo termosensible *cdc25-22* reveló que la delección adicional del gen *cpc2*⁺ incrementaba de manera significativa tanto la termosensibilidad (Figura RII.7A) como el tamaño celular en división (Figura RII.7B), lo que sugería que Cdc25 no es diana de Cpc2 durante la regulación de la transición G₂/M.

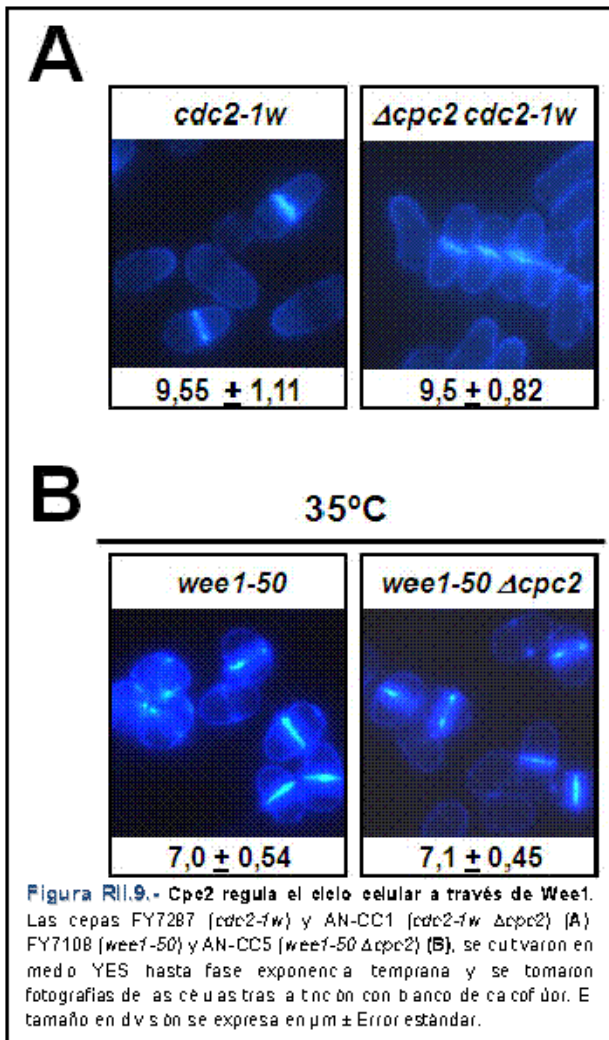
Esta sospecha fue confirmada cuando empleamos un fondo genético *cdc2-3w Δcdc25*, en el que la mutación *cdc2-3w* en Cdc2 convierte a las células de *S. pombe* en insensibles a la ausencia de Cdc25 (Fantès, 1981). Como puede apreciarse en la Figura RII.8, las células del mutante *cdc2-3w Δcdc25 Δcpc2* incrementaron su sensibilidad a

la temperatura (panel A) y el tamaño en división (panel B) en comparación con la cepa control *cdc2-3w Δcdc25*. Estos datos indican que Cpc2 no regula la actividad de Cdc2 por medio de Cdc25.



3.2.- Cpc2 regula la entrada en mitosis por medio de la quinasa inhibidora del ciclo celular Wee1

A continuación centramos nuestra atención sobre la quinasa Wee1, que es el principal regulador negativo de la actividad de Cdc2. Para analizar la posible epistasia de Cpc2 con este elemento procedimos de manera análoga al caso anterior, estudiando el tamaño en división de en distintos fondos genéticos defectivos en la actividad de Wee1.



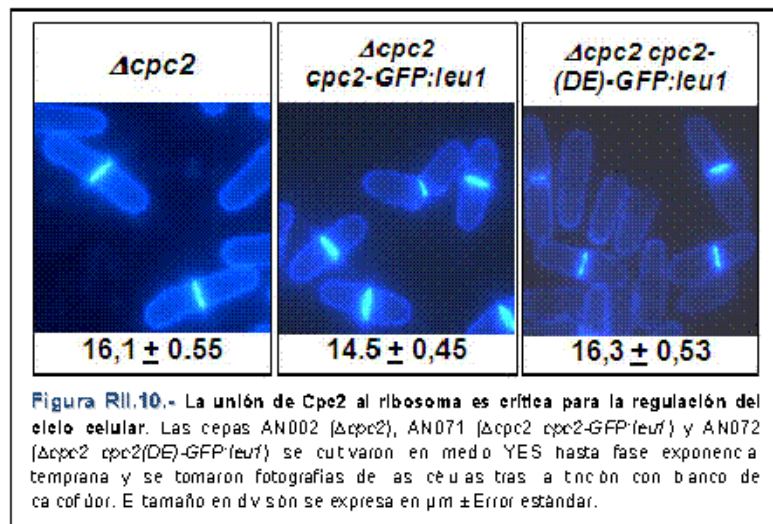
Como se observa en la Figura RII.9A, las células del mutante *cdc2-1w Δcpc2* no mostraron un incremento significativo en el tamaño en división al comparadas con las del mutante sencillo *cdc2-1w*, que posee una versión de *cdc2* insensible a la acción inhibitoria de Wee1 y que, por tanto, muestra un fenotipo *wee* (Nurse y Thuriaux, 1980). Confirmando estos datos, el tamaño en división de la cepa FY7108, que expresa una mutación termosensible de *wee1* (*wee1-50*; Nurse, 1975), tampoco se vio afectado significativamente por la delección simultánea de *cpc2*⁺ (cepa AN-CC5; Figura RII.9B). Por tanto, nuestros resultados sugieren que Cpc2 regula la progresión del ciclo celular por medio de Wee1.

4.- Cpc2 REGULA DESDE EL RIBOSOMA LA PROGRESION DEL CICLO CELULAR A NIVEL TRADUCCIONAL

Cpc2 es una proteína ribosomal que en *S. pombe* regula positivamente la traducción de ARN mensajeros específicos (Shor *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en el Capítulo I han demostrado que algunos de estos mensajeros codifican proteínas implicadas en la regulación de la actividad de las MAP quinasas o en la defensa celular frente al estrés oxidativo, y que la presencia de Cpc2 en el ribosoma es esencial para llevar a cabo esta regulación.

Por ello decidimos estudiar el efecto de la versión mutante de Cpc2 incapaz de asociarse con el ribosoma Cpc2(DE) sobre el ciclo celular. En la Figura RII.10 se observa cómo, de forma similar al mutante carente de *cpc2*⁺, las células que expresan la versión mutante Cpc2(DE)-GFP entran en división a un tamaño mayor que en el control (Cpc2-GFP), lo

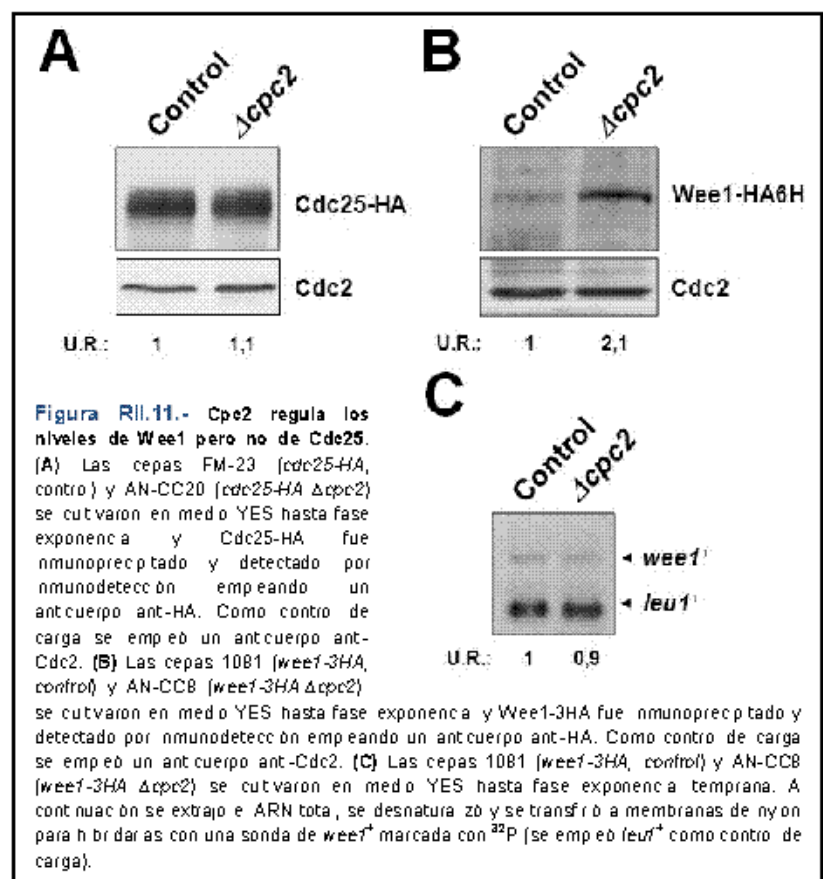
que sugiere que la unión *in vivo* de Cpc2 al ribosoma es crítica para un control adecuado del tamaño celular durante la transición G₂/M.



4.1.- Cpc2 regula negativamente los niveles de Wee1

Puesto que la regulación del tamaño en división por Cpc2 requiere su unión al ribosoma, nos planteamos la posibilidad de que Cpc2 regulase la progresión del ciclo celular modulando la traducción de Wee1. Dado que Wee1 inhibe el avance del ciclo celular de forma dosis-dependiente (Nurse y Thuriaux, 1980), los resultados obtenidos podrían explicarse si los niveles de Wee1 se vieran incrementados en ausencia de *cpc2*⁺.

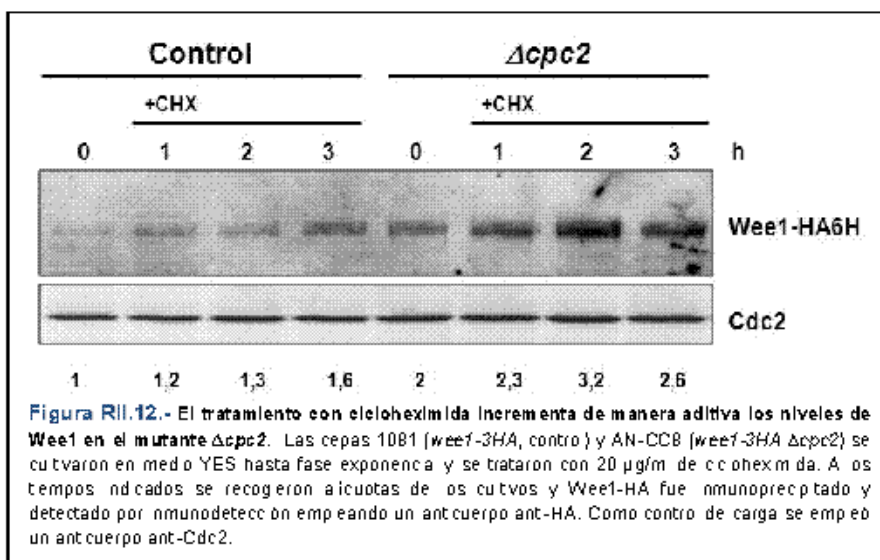
Para responder a esta cuestión realizamos un análisis comparativo de los niveles de proteína de Wee1 y Cdc25 (expresados como versiones genómicas fusionadas a epitopos de HA y HA6H, respectivamente), en cultivos



de la cepa control y el mutante $\Delta cpc2$. Los niveles de Cdc25 no se vieron afectados de manera significativa en ausencia de $cpc2^+$ (Figura RII.11A). Sin embargo, y confirmando nuestra hipótesis, sí observamos un incremento evidente en los niveles de Wee1 en el mutante $\Delta cpc2$ comparado con el control (Figura RII.11B). Además, dicho incremento no fue consecuencia de un aumento en la expresión del ARN mensajero de $wee1^+$ (Figura RII.11C), lo que sugiere que Cpc2 regula negativamente la expresión de Wee1 a nivel traduccional.

Un trabajo previo había demostrado que Wee1 es esencial para el bloqueo del ciclo celular en G₂ que experimenta *S. pombe* en respuesta a la inhibición parcial de la síntesis proteica en presencia de cicloheximida (CHX), ya que en estas condiciones se produce un

incremento significativo en los niveles de Wee1 (Suda *et al.*, 2000). Curiosamente, el pre-tratamiento de cultivos del mutante $\Delta cpc2$ con cicloheximida incrementó de manera aditiva el contenido en Wee1 (Figura RII.12). Ello sugiere que la regulación de Cpc2 sobre Wee1 es



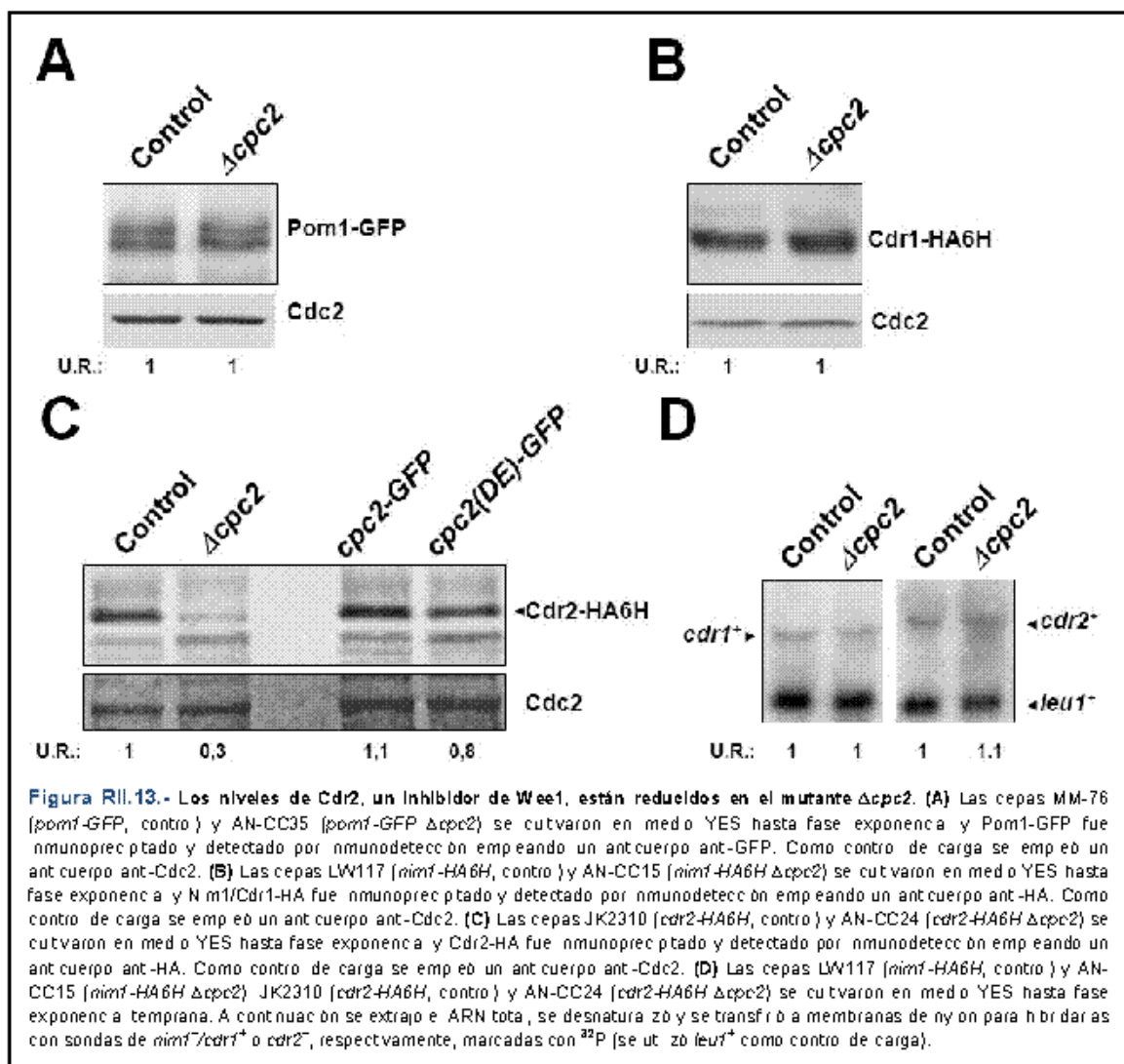
independiente del mecanismo de inhibición de la síntesis proteica provocado por dicho antibiótico.

4.2.- Los niveles de Cdr2, un inhibidor de Wee1, están reducidos en el mutante nulo $\Delta cpc2$

En *S. pombe*, la actividad de Wee1 es regulada negativamente por dos proteínas quinasas: Cdr2 y Cdr1/Nim1 (Coleman *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1993; Wu y Russell, 1993; Kanoh y Russell, 1998; Breeding *et al.*, 1998) (ver Introducción). Recientemente se ha descrito que Pom1, una quinasa perteneciente a la familia DYR ("Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation Regulated Kinase"), fosforila e inhibe a Cdr2 de manera dosis-dependiente para coordinar el momento de la entrada en mitosis a un tamaño celular adecuado (Moseley *et al.*, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009). Puesto que los niveles de Wee1 se encuentran

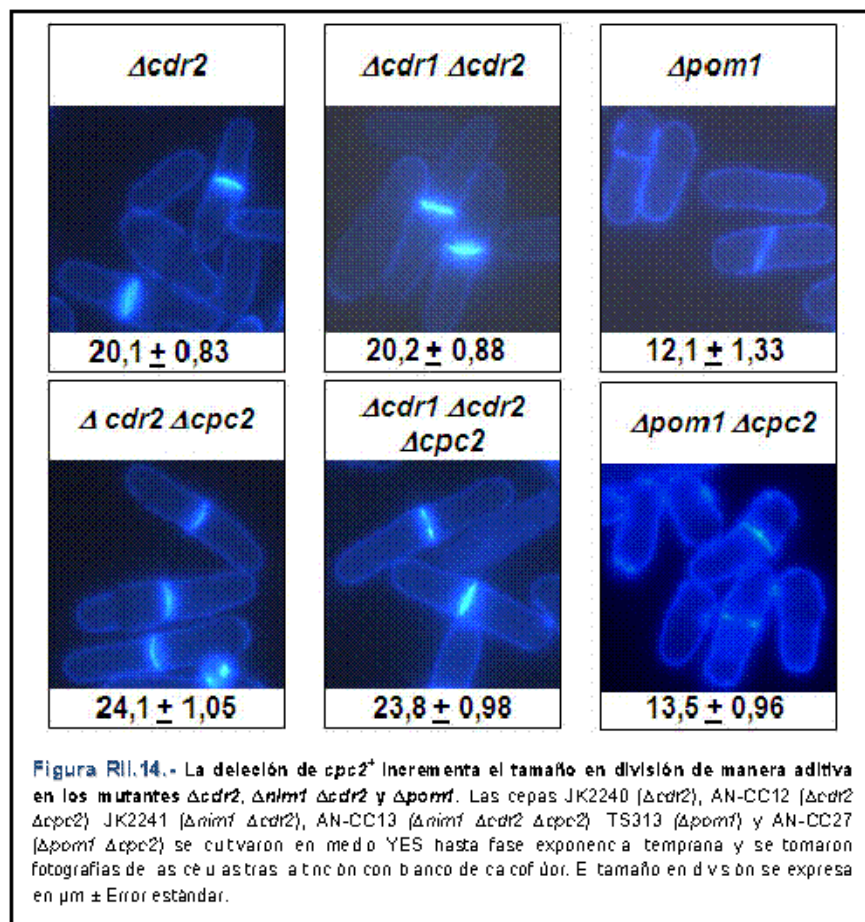
elevados en las células $\Delta cpc2$ nos planteamos la posibilidad de que los niveles de proteína de Pom1, Cdr1 o Cdr2 pudieran también estar alterados en este mutante.

Como puede observarse en la Figura RII.13, la delección de $cpc2^+$ no alteró de manera significativa los niveles proteicos de Pom1 (panel A) ni de Cdr1 (panel B), expresados como versiones genómicas fusionadas a los epítotos GFP o HA6H, respectivamente. Sin embargo, el mutante $\Delta cpc2$ mostró una reducción clara en los niveles de la quinasa Cdr2 (expresada como una versión genómica fusionada al epítoto HA6H), en comparación con la cepa control (Figura RII.13C). Este descenso también es apreciable en las células que expresan la versión no-ribosomal de Cpc2 (Cpc2-(DE)-GFP) (Figura RII.13C). De nuevo, el análisis de los niveles de ARN mensajero no reveló cambios significativos de expresión entre el mutante $\Delta cpc2$ y la cepa control (Figura RII.13D).



Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que la disminución en los niveles de Cdr2 en el mutante $\Delta cpc2$ podía ser la causa del incremento en el contenido de Wee1 y el consiguiente retraso en la transición G₂/M. Si esta hipótesis era correcta, la delección conjunta de $cpc2^+$ y $cdr2^+$ no debería provocar un incremento en el tamaño en división de los mutantes sencillos. Contrariamente a lo esperado, el estudio del tamaño en división reveló que las células de los mutantes $\Delta cdr2 \Delta cpc2$ y $\Delta cdr1 \Delta cdr2 \Delta cpc2$ presentaron un mayor tamaño en división que los mutantes $\Delta cdr2$ o $\Delta cdr1 \Delta cdr2$ (Figura RII.14). Asimismo, las células del mutante $\Delta pom1$, que se dividen con un tamaño reducido debido a la ausencia de regulación negativa sobre Cdr2 (Moseley *et al.*, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009), incrementaron su tamaño en división en ausencia de $cpc2^+$ (Figura RII.14).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el defecto en la transición G₂/M del mutante $\Delta cpc2$ es consecuencia, por una parte, del incremento en los niveles intracelulares de Wee1 y, por otra, del descenso en la cantidad de Cdr2.



Manuscript Title: The fission yeast receptor of activated C kinase (RACK1) ortholog Cpc2 regulates mitotic commitment through Wee1 kinase

Manuscript No: JBC/2010/173815

Manuscript Type: Regular Paper

Date Submitted by the Author: 10 Aug 2010

Complete List of Authors: Andres Nunez, Alejandro Franco, Teresa Soto, Jero Vicente, Mariano Gacto, and Jose Gansado

Keywords: CDK (cyclin dependent kinase); Cell cycle; Mitosis; Ribosomes; Yeast genetics

THE FISSION YEAST RECEPTOR OF ACTIVATED C KINASE (RACK1) ORTHOLOG
Cpc2 REGULATES MITOTIC COMMITMENT THROUGH Wee1 KINASE

Andrés Núñez, Alejandro Franco, Teresa Soto, Jero Vicente, Mariano Gacto, and José Cansado^{*}.

Yeast Physiology Group, Department of Genetics and Microbiology, Facultad de Biología,
Universidad de Murcia, 30071 Murcia, Spain.

^{*} Correspondence to: jcansado@um.es

Running title: Cpc2 control of cell cycle progression

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Wee1 dependent inhibitory phosphorylation of the highly conserved Cdc2/Cdk1 kinase determines the mitotic onset when cells have reached a defined size. The Receptor of Activated C Kinase (RACK1) is a scaffolding protein strongly conserved among eukaryotes which binds to other proteins to regulate multiple processes in mammalian cells, including the modulation of cell cycle progression during G1/S transition. We have recently described that Cpc2, the fission yeast ortholog to RACK1, controls from the ribosome the activation of MAPK cascades and the cellular defense against oxidative stress by positively regulating the translation of specific genes whose products participate in the above processes. Intriguingly, mutants lacking Cpc2 display an increased cell size at division, suggesting the existence of a specific cell cycle defect at the G2/M transition. In this work we show that protein levels of Wee1 mitotic inhibitor are increased in cells devoid of Cpc2, whereas the levels of Cdr2, a Wee1 inhibitor, are downregulated in the above mutant. On the contrary, the kinetics of G1/S transition was virtually identical both in control and Cpc2-less strains. Thus, our results suggest that in fission yeast Cpc2/RACK1 positively regulates from the ribosome the mitotic onset by modulating both the protein levels and the activity of Wee1. This novel mechanism of translational control of cell cycle progression might be conserved in higher eukaryotes.

Cell reproduction involves the passing through a series of events collectively known as the cell cycle, which consists of alternative stages involving DNA replication (S phase), chromosome segregation and nuclear division (mitosis), as well as cell division (cytokinesis). Entry into mitosis is induced by the activation

of a cyclin B-bound Cdc2/Cdk1 kinase, which is highly conserved among eukaryotic cells (1). In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the inhibitory phosphorylation at a conserved tyrosine 15 (Y15) in Cdc2 regulates its kinase activity that determines the mitotic onset and the start of division when the cells have reached a defined size (2). The kinase Wee1 downregulates Cdc2 by inhibitory Y15 phosphorylation, which is reversed by Cdc25 phosphatase, leading to Cdc2 activation and triggering of mitotic entry (3-6). Consequently, fission yeast cells lacking Wee1 activity enter mitosis before reaching a critical size to produce two small daughter cells (7). On the contrary, mutants in Cdc25 enter mitosis at an increased cell size, indicating that the activities/levels of both Cdc25 and Wee1 must be tightly regulated to provide an accurate control of the mitotic onset. In fission yeast, Wee1 is in turn phosphorylated and its activity negatively regulated by two SAD family kinases, Nim1 (also known as Cdr1; 8-12) and Cdr2 (13,14). Recently, it has been described that gradients from the cell ends involving the DYRK-family kinase Pom1 play a key role in the control of the progression of the cell cycle by coupling cell length to G2/M transition through phosphorylation and negative control of Cdr2 activity (15,16).

RACK1 (Receptor of Activated protein C Kinase), a member of the large family of proteins with WD repeats, is a 36 kDa protein homologous to the β -subunit of heterotrimeric G-proteins and highly conserved in eukaryotic organisms (17). RACK1 was initially described by its ability to interact with distinct protein kinase C isoforms. Further studies have shown its role as a scaffold which mediates cross-talk between various signaling pathways by binding *in vivo* to other proteins and regulating multiple biological processes like MAPK activation, angiogenesis, tumor growth, neuronal response, apoptosis, chromatin remodeling, and proper

function of the circadian clock (17-20). Cpc2, the fission yeast RACK1 ortholog, was identified through its action on protein kinase Ran1/Pat1, which controls the transition from mitosis to meiosis (21). Mutants lacking Cpc2 show several characteristic phenotypes like defective sexual differentiation under nitrogen deprivation and sensitivity to different stresses (21,22). Interestingly, RACK1/Cpc2 proteins are structural components of the 40S ribosomal subunit (23-27), located in the proximity of the mRNA exit channel and in close contact with the binding surface of the eIF3 complex (27). In this context, we have recently described that in fission yeast Cpc2 functions from the ribosome by positively regulating the translation of specific mRNAs, like those encoding Pyp1 and Pyp2 tyrosine phosphatases, which control the magnitude of the activation of Pmk1 and Sty1 MAPKs, and the function of transcription factor Atf1, which regulates the global transcriptional response against stress (22). These results support that RACK1/Cpc2 may provide a platform for the translation of specific subsets of mRNAs involved in key cellular processes (22,25).

Another relevant biological function of RACK1/Cpc2 is related to cell cycle control. For example, in the parasite *Trypanosoma brucei*, TRACK (RACK1 ortholog) participates in the control of the final stages of mitosis and cytokinesis (28). Also, genetic and biochemical approaches have shown that RACK1 negatively regulates cell cycle progression at the G1/S transition in mammalian cells by suppressing the activity of Src, a non-receptor protein tyrosine kinase that plays a multitude of roles in cell signalling, and Src-mediated cell cycle regulators in G1, thereby promoting a delay of entry into S phase (29,30). However, fission yeast mutants lacking Cpc2 display an increased cell size at division, suggesting the existence of a specific cell cycle defect at the G2/M transition (21). In this work we have taken advantage of *S. pombe* as a suitable model to identify molecular mechanisms related to cell cycle and we show that Cpc2 is a key element involved in the regulation of the mitotic onset in this organism.

Experimental procedures

Strains and growth conditions- The *S. pombe* strains (see Table 1) were grown with shaking at 28°C in either YES or EMM2 medium (34) with

2% of glucose, and supplemented with adenine, leucine, histidine or uracil (100 mg/liter, Sigma Chemical) depending on their particular requirements. In experiments performed with *cdc25-22* or *cdc10-129* thermosensitive mutant strains, the cells were grown in YES medium to an A_{600} of 0.2 at 25°C (permissive temperature), shifted to 37°C for 3.5 h, and released from the growth arrest by transfer back to 25°C.

Flow cytometry- Cells (10^7) were recovered by centrifugation at 2000 $\times g$ for 5 min and fixed with 1ml of 70% cold ethanol. Cells were rehydrated in 50 mM sodium citrate, 0.1mg/ml RNaseA, incubated at 37°C for 2 h, and stained with 4 $\mu g/ml$ propidium iodide. Cells were analysed using a Becton Dickinson FACSort cytometer equipped with CellQuest software.

In situ chromatin binding assay for Mcm4- This assay was performed following the protocol described by Kearsley *et al.* (35), with slight modifications. Briefly, the cells were recovered by centrifugation (3000 $\times g$ for 1 min) and resuspended in ZM buffer (50 mM sodium citrate pH 5.6, 1.2 M sorbitol, 0.5 mM magnesium acetate and 10 mM DTT) plus 2mg/ml of zymolase 50T (Seikagaku Corporation), and permeabilized by incubation at 32 °C for 10 min. The cells were then washed twice in Stop buffer (0.1 M MES pH 6.6, 1.2 M sorbitol, 1 mM EDTA and 0.5 mM magnesium acetate) and resuspended in EB buffer (20 mM PIPES pH 6.8, 0.4 M sorbitol, 2 mM magnesium acetate, and 150 mM potassium acetate plus specific protease inhibitor cocktail obtained from Sigma). The cell suspensions were divided into two aliquots, one remained unchanged and the other was treated with 0.02 volumes of Triton X-100 for 5 min at room temperature. Afterwards the cells were recovered by centrifugation, resuspended first in methanol, then in acetone, and finally observed by fluorescence microscopy (see below).

Gene disruption and epitope tagging- The *cpc2*⁺ null mutants were obtained by entire deletion of the corresponding coding sequence and its replacement with the KanR cassette by PCR-mediated strategy using plasmid pFA6a-KanR as template (36). Mutant strains were obtained either by transformation (lithium acetate method; 34), or by mating and diploid selection in EMM2 medium without supplements. Spores were purified by glusulase treatment (37) and allowed to germinate in EMM2 plus the appropriate requirements. Correct construction

of strains was verified by PCR and Western blot analyses (see below).

Assays of cell sensitivity for growth at different temperatures- In plate assays, wild type and mutant strains of *S. pombe* were grown in YES liquid medium to an A_{600} of 0.6. Appropriate dilutions were spotted per duplicate on YES solid plates containing 2% (w/v) bacto-agar (Difco) and incubated at either 25, 30, 32, 34, or 37 °C for 3 days and then photographed.

Detection of Wee1, Cdc25, Pom1, Cdr1 and Cdr2 tagged fusions- In all cases 30-40 ml of culture were harvested by centrifugation at 4°C, the cells washed with cold PBS buffer, and the yeast pellets immediately frozen in liquid nitrogen. Total cell homogenates were prepared under native conditions as described (38), employing chilled acid-washed glass beads and lysis buffer (10% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet NP-40, plus specific protease and phosphatase inhibitor cocktails for fungal and yeast extracts, obtained from Sigma). The lysates were cleared by centrifugation at 20000 $\times g$ for 30 min and resolved in 6 to 12% SDS-PAGE gels, depending on the relative size of the fusion protein, and transferred to filters. The following antibodies were employed in Western blot experiments: mouse monoclonal anti-HA antibody (Roche Molecular Biochemicals, clone 12CA5); rabbit polyclonal anti-Cdc2 pY15 antibody (Chemicon International); mouse monoclonal anti-GFP antibody (Roche). A rabbit polyclonal anti-Cdk1/Cdc2 (PSTAIR) antibody (Upstate Biotechnology) was used as loading control. Immunoreactive bands were detected employing anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma Chemical) and either the ECL (Amersham Biosciences) or Supersignal (Pierce) systems.

Northern blot analysis- Yeast cells were grown in YES medium to an A_{600} of 0.8 and volumes of 50 ml of the cultures were recovered. Total RNA preparations were obtained as previously described and resolved through 1.5% agarose-formaldehyde gels. Northern (RNA)-hybridization analyses were performed as reported earlier (22). The probes employed were amplified by PCR and included: a 0.8 Kbp fragment of the *wee1*⁺ gene that was amplified with the 5' oligonucleotide TCTCTCCAT TTGCATCGGGC and the 3' oligonucleotide AGGAGGAGGATCGAACCTCA; a 1.5 Kbp fragment of the *nim1*⁺ gene amplified with the 5' oligonucleotide

GGGACGTCTATTTTGATTGCC and the 3' oligonucleotide

ATGGTGAAGCGACACAAAAT; a 1.2 Kbp fragment of the *cdr2*⁺ gene amplified with the 5' oligonucleotide

GGACGGATTGTCGTTGACGA and the 3' oligonucleotide

AGCAGCATCCAACGGGC; and a 1 Kbp fragment of the *leu1*⁺ gene amplified with the 5' oligonucleotide

TCGTGCTCTTACCAGGAG and the 3' oligonucleotide

CAACAGCCTTAGTAATAT. For DNA labeling Ready-To-Go DNA labelling beads (GE Healthcare) was used. To establish

quantitative conclusions, the level of mRNAs was determined in a Phosphorimager (Molecular Dynamics) and compared with the internal control (*leu1*⁺ mRNA).

Fluorescence microscopy- To determine cell size at division the yeast strains were grown in either EMM2 or YES medium to an A_{600} of 0.5 and treated with Calcofluor white, which specifically stains cell wall and septum (39). A minimum of 200 septated cells were scored for each mutant. Bi-nucleated cells were estimated after DAPI staining of nuclei as described previously (39). In the Mcm4-GFP chromatin binding assay, the Triton-extracted and non-extracted cells were recovered in acetone, resuspended in TBS buffer with 2 mM CaCl₂ and stained with DAPI. The percentage of cells with nuclear Mcm4-GFP in extracted versus non-extracted cells was estimated. A Leica DM 4000B fluorescence microscope equipped with a 100x objective was employed, the images were captured with a cooled Leica DC 300F camera and IM50 software, and then imported into Adobe PhotoShop CS3 (Adobe Systems).

Reproducibility of results- All experiments were repeated at least three times with similar results. Representative results are shown.

RESULTS

Cpc2 positively regulates G2/M transition during the cell cycle. *S. pombe* mutants lacking Cpc2 increased cell size at division (Fig. 1A; 21,22). In eukaryotic cells, Cdk1/Cdc2 kinase activity is downregulated during G2 phase of the cell cycle by phosphorylation at Y15 (2). We thus examined the levels of Cdc2 phosphorylation at Y15 during the cell cycle in synchronized cultures of strains PPG148 (*cdc25-22*) and AN-CC18 (*cdc25-22 cpc2Δ*) after growth at 25°C to log-phase, a shift to 37°C for 3.5 h to arrest cells in

G2, and then incubation back to 25°C. As indicated in Fig. 1B, the lowest level of Cdc2-Y15 phosphorylation in *cdc25-22 cpc2Δ* cells showed a delayed kinetics in comparison to control cells (~150 min in *cdc25-22 cpc2Δ* cells versus ~90 minutes in control cells). The maximum percentage of bi-nucleated (entering mitosis) and septated cells was also retarded in the *cdc25-22 cpc2Δ* mutant, confirming a cell cycle defect at G2. Interestingly, both the thermosensitive phenotype and the increased cell size at division were enhanced in the *cdc25-22* mutant by simultaneous deletion of *cpc2*⁺ (Figs. 1C and 1D). Taken together, these results suggest that in fission yeast Cpc2 positively regulates G2/M transition during the cell cycle by affecting the phosphorylation status of Cdc2 kinase.

Cpc2 does not regulate G1/S transition in fission yeast. RACK1, the Cpc2 ortholog in higher eukaryotic cells, regulates cell growth by suppressing the activity of Src kinase in G1, therefore delaying entry into S phase (29,30). Conversely, downregulation of RACK1 activates Src-mediated signaling and accelerates G1/S progression (29). While the results shown above suggest that Cpc2 regulates the length of the G2 phase during the cell cycle in fission yeast, it might be also true to play a role during G1/S transition. To test this possibility, we performed a set of experiments with control and *cpc2Δ* cells harboring a thermosensitive allele of Cdc10 (*cdc10-129*), which induces the transcription of several genes required for progression through G1 into S phase (40). Strains 326 (*cdc10-129*) and AN-CC10 (*cdc10-129 cpc2Δ*) were synchronized at early G1 by incubation at 37°C for 4h, and then cultured again to 25°C. Flow cytometry analysis of samples taken at subsequent times revealed that the rate of increase in DNA content from 1C to 2C during G1/S transition was similar in both strains (Fig. 2A), supporting that Cpc2 does not participate in the regulation of this phase of the cell cycle. We further analyzed G1/S transition by employing both control and *cpc2Δ cdc10*^{ts} cells expressing a C-terminal GFP tagged version of Mcm4, a DNA replication factor which forms part of the pre-replicative complex (pre-RC) during early S-phase (35). Mcm4 is an ideal tool to investigate the kinetics of G1/S transition under different situations because this factor binds stably to chromatin during

anaphase B and is displaced as replication proceeds during S phase (35,41). As shown in Fig. 2B (upper and lower panels), the presence of chromatin-bound Mcm4-GFP was maximal 60 minutes after releasing the cells from the restrictive temperature in *cdc10*^{ts} control (41) and *cdc10*^{ts} *cpc2Δ* cultures, decreasing thereafter. Moreover, the increase in Cdc2-Y15 phosphorylation during G1/S transition in *cdc10*^{ts} cells was not affected by the absence of Cpc2 (Fig. 2C). As a whole, these results confirm that Cpc2 does not regulate G1/S transition during the fission yeast cell cycle.

Cpc2 regulation of G2/M transition requires Wee1. Until now we have demonstrated that *cpc2Δ* mutant cells undergo a specific cell cycle delay at G2/M transition. The MAPK Sty1, which is main effector of the SAPK pathway, controls in the fission yeast the mitotic onset in at least two distinct levels: (i) by phosphorylating Plo1 (Polo kinase) at S402 and promoting its recruitment in the spindle pole bodies to modulate Cdc25/Wee1 control of Cdc2 activity (42); and (ii) by binding and phosphorylating the MAPKAP kinase-2 related protein Srk1, which controls mitotic entry through direct phosphorylation and inhibition of Cdc25 phosphatase (43). While *sty1Δ* cells display division at increased size as a result of a G2/M delay, mutant cells expressing a constitutively activated version of MAPK kinase Wis1 (*wis1DD*), which directly activates Sty1, advance mitotic commitment and divide at reduced cell size (Fig. 3A) (42,44). However, in both *sty1Δ* and *wis1DD* cells we observed that deletion of *cpc2*⁺ promoted a clear increase in cell size at division (Fig. 3A), suggesting that the control by Cpc2 of the cell cycle at G2/M is independent on Sty1 function during mitosis.

In fission yeast, the activity of Cdc2 kinase is negatively regulated by phosphorylation at Y15 through the antagonistic action of tyrosine phosphatase Cdc25 and Wee1 tyrosine kinase (6). To check whether Cpc2 signalling to Cdc2 is mediated by Cdc25 we used the *cdc2-3w cdc25Δ* background, in which the *cdc2-3w* mutation renders *S. pombe* cells insensitive to the lack of Cdc25 phosphatase (3). As shown in Fig. 3B, cell size at division (upper panel) and the thermosensitive phenotype (lower panel) in *cdc2-3w cdc25Δ cpc2Δ* cells clearly increased as compared to *cdc2-3w cdc25Δ* cells. We thus turned our attention to

Wee1 kinase, which maintains Cdc2 in an inactive state (6). Notably, no increase in cell size at division was observed in *cdc2-1w cpc2Δ* cells as compared to the *cdc2-1w* mutant (Fig. 3C), which displays a *wee1* phenotype and is refractile to Wee1 activity (3). Congruent with this observation, cells size at division in a strain expressing a temperature-sensitive mutation in Wee1 (*wee1-50*) was not affected by simultaneous deletion of *cpc2*⁺ (Fig. 3C). These findings support that Wee1 is required for Cpc2-mediated cell cycle control during mitotic commitment.

Previous work performed by others and ourselves have demonstrated that in fission yeast Cpc2 is a ribosomal bound protein which regulates the translation of specific m-RNAs whose products are involved in various responses, including modulation of MAPK activity and cellular defense against oxidative stress (22,23). Importantly, by using a strain expressing a mutant version of Cpc2 (R36D K38E) with reduced ability to associate with ribosomes *in vivo* (22), we also showed that ribosome binding of Cpc2 is critical for proper control of cell size at the G2/M boundary (Fig. 4A). The above results, together with the fact that Wee1 is known to inhibit mitotic cycle progression in a dose dependent fashion (3) raised the possibility that the absence of Cpc2 might increase Wee1 protein levels and/or activity. Indeed, while Cdc25 protein levels were not noticeably affected in the presence or absence of Cpc2 (Fig. 4B), growing cultures of *cpc2Δ* cells showed increased protein levels of Wee1 as compared to control cells (expressed as a chromosomally tagged protein fused to the HA6H epitope) (see 0 time, Fig. 4C). Moreover, the increase in Wee1 protein levels observed in *cpc2Δ* cells did not result from enhanced expression of *wee1*⁺ mRNA (Fig. 4D), suggesting that Cpc2 negatively regulates Wee1 expression by repressing the translation of the corresponding mRNA.

Convincing evidence has shown that Wee1 is essential for the G2 delay underwent by fission yeast upon partial inhibition of protein synthesis in the presence of cycloheximide and that, under these conditions, Wee1 protein levels are upregulated (45). Interestingly, cycloheximide-treated *cpc2Δ* cells further increased Wee1 levels as compared to control cells, supporting that Cpc2-mediated regulation of Wee1 operates at a different level (Fig. 4C).

Protein levels of Cdr2, a Wee1 inhibitor, are downregulated in cpc2Δ cells. Wee1 is negatively regulated in fission yeast by two closely related protein kinases, Nim1/Cdr1 and Cdr2 (12,14). Recently, it has been reported that the DYRK family protein kinase Pom1 phosphorylates and inhibits Cdr2 in a dose-dependent manner to coordinate the time for mitotic entry at the appropriate cell size (15,16).

Our observation that Wee1 is upregulated in *cpc2Δ* cells led us to explore the possibility that protein levels of Pom1, Cdr1, or Cdr2 might be altered in this mutant. As shown in Figs. 5A and 5B, neither Pom1 nor Cdr1 levels (expressed as genomic versions fused to GFP and HA6H epitopes, respectively) were significantly affected by *cpc2*⁺ deletion. However, as compared to control cells, *cpc2Δ* cells presented a clear reduction in the protein levels of Cdr2 kinase, expressed as a genomic version fused to a HA6H epitope (Fig. 5C). This decreased amount of Cdr2 was also evident in cells expressing a mutant Cpc2 (DE) protein which does not bind to the ribosome (Fig. 5C). Again, the lower Cdr2 protein levels did not result from a decreased expression of *cdr2*⁺ mRNA (Fig. 5D). Surprisingly, cell size at division in cells from the *cdr2Δ cpc2Δ* mutant was still higher than in *cdr2Δ* cells (Fig. 5E). Moreover, *cpc2*⁺ deletion also increased cell size at division in *pom1Δ* cells (Fig. 5F), which divide at a short size due to lack of Cdr2 inhibition (15,16). As a whole, these results suggest that the G2/M defect in *cpc2Δ* cells is mainly due both to increased levels of Wee1 and a decreased amount of Cdr2 protein.

DISCUSSION

The results of our work provide strong biochemical and genetic evidence to indicate that Cpc2, the RACK1 ortholog in fission yeast, positively regulates from the ribosome the cell cycle progression at G2/M transition by modulating the protein levels of Wee1 kinase. This kinase, in turn, directly phosphorylates and inhibits the activity of Cdc2, which is the master regulator of mitosis onset in eukaryotic organisms. The activities of Wee1 kinases are well-known as dose-dependent inhibitors of mitotic commitment in eukaryotes (3) and thus their cellular levels and functions must be tightly regulated during cell cycle progression. Indeed, Wee1 has been shown to be destabilized during G2 and M phases of cell cycle in diverse

organisms ranging from yeast to humans (46). In fission yeast, whereas *wee1*⁺ mRNA remains constant during the cell cycle, Wee1 protein levels oscillate throughout the cell cycle, decreasing during M and G1 phases (47). In this work we have shown that *S. pombe* mutants devoid of Cpc2 undergo a G2/M delay that is dependent on Wee1, since the increased cell size at division in Cpc2 mutants suppressed in the absence of Wee1 function. Contrariwise, either abrogation of Cdc25 activity or downregulation of the Sty1 MAPK pathway, which modulates Cdc25 activity via Srk1 MAPKAPK (43), aggravates the cell cycle defect in the absence of Cpc2. Importantly, Wee1 protein levels, but not those of Cdc25, are upregulated in Cpc2 null mutants, suggesting that they are responsible, at least in part, for the defect in cell cycle progression in these cells as discussed below.

It has been reported that cycloheximide-mediated partial inhibition of protein synthesis increases in *S. pombe* the levels of Wee1 protein and promotes cell cycle arrest at G2 (45). We have confirmed this result and furthermore found that Cpc2 deletion provokes an additive increase of Wee1 levels in cycloheximide-treated cells. This result makes sense when considering that, whereas Cpc2 associates with the 40S ribosomal subunit, cycloheximide specifically binds the 60S ribosomal subunit to block the translocation step in elongation during protein synthesis (48). Considering the versatility of Cpc2/RACK1 as a platform to bind different proteins, it appears likely that one or several Cpc2-binding partners might be involved in this process. Recently it has been described that Cpc2 associates with Moc2/Ded1, an essential RNA helicase involved in sexual differentiation which acts as a general translational regulator, and also with Moc1/Sds23, an inducer of sexual development which participates in stress resistance (49). The Cpc2-Moc-mediated complex appears to act as a translational regulator involved in controlling sexual differentiation in fission yeast through Ste11 transcription factor (49). Since both Moc2/Ded1 and Moc1/Sds23 are also known to play important roles in the regulation of the mitotic cell cycle (50,51), they might be considered strong candidates to form part of the Cpc2-dependent translational mechanism controlling Wee1.

Kinase dependent hyperphosphorylation is a well conserved mechanism for Wee1

inactivation during M phase (46). In fission yeast this task is performed at least by two SAD kinases, Nim1/Cdr1 and Cdr2, which phosphorylate and inactivate Wee1 (8-14). As a result, deletion of either *nim1*⁺/*cdr1*⁺ or *cdr2*⁺ causes a G2/M delay due to lack of Wee1 downregulation (8-14). Importantly, we have found that protein levels of Cdr2 are downregulated in the absence of Cpc2, supporting that Cpc2 exerts its function as a positive translational regulator of the mRNA encoding Cdr2. Moreover, this translational control is specific for *cdr2*⁺, since the protein levels of Cdr1 remained unchanged in the absence of Cpc2. As a whole, our findings strongly suggest that in fission yeast Cpc2 targets Wee1 by at least two different mechanisms: downregulation of the Wee1 protein levels, and positive regulation of the translation of Wee1 inhibitor Cdr2. The increased cell cycle defect in *cdr2Δ cpc2Δ* cells as compared to *cdr2Δ* or *cpc2Δ* single mutants, and the partial suppression of short size in *pom1Δ* cells (lacking Cdr2 inhibition) by simultaneous deletion of *cpc2*⁺, favor the existence of these two alternative regulatory mechanisms.

In mouse NIH3T3 cells RACK1 binds and suppresses the activity of Src1 at G1, delaying entry of cells into S phase (29). Disruption of the RACK1-Src complex results in increased activities of cyclin-dependent kinases (CDKs) CDK2 and CDK4, the induction of cyclins A, E and D1, inhibited expression of CDK inhibitors p16, p15 and p27, and an increased phosphorylation of pRB (retinoblastoma protein), all of which are key modulators of G1/S transition (30). On the contrary, our results suggest that in fission yeast Cpc2 does not perform a similar role, since the kinetics of G1/S transition estimated by flow cytometry analysis, pre-replication complex formation, and Cdc2 phosphorylation at Y15, was virtually identical both in control and *cpc2Δ* cells. Thus, it appears likely that the function of RACK1 proteins as modulators of cell cycle progression has somehow diverged through evolution. In this context, it has been shown that expression of rat RACK1 in fission yeast can structurally and functionally complement *cpc2Δ* cells, including the cell cycle defect at G2/M (21). Since RACK1 also resides on the 40S ribosomal subunit, it seems reasonable that in higher eukaryotes RACK1 may also control from the ribosome the G2/M

transition of the cell cycle in a Wee1-dependent manner, similarly to Cpc2. *S. pombe* cells spend most of their time (about three-quarters of the cycle) in G2, whereas G1 is typically the longest phase of the cell cycle in mammalian cells (6). This situation might somehow hide the existence of the different subtle control by

RACK1 and Cpc2. In any case, the results presented here reveal a pivotal role for Cpc2 at the G2/M transition in fission yeast, and define the existence of a novel control at the translational level during the mitotic onset in this model organism.

REFERENCES

1. Nurse, P. (1990) *Nature* **244**, 503-508
2. Rupes, I. (2002) *Trends Genet.* **18**, 479-485
3. Russell, P., and Nurse, P. (1987a) *Cell* **49**, 559-567
4. Gould, K. L., and Nurse, P. (1989) *Nature* **342**, 39-45
5. Featherstone, C., and Russell, P. (1991) *Nature* **249**, 808-811
6. MacNeil, S. A., and Nurse, P. (1997) *Cell cycle control in fission yeast. In: Yeast III.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, 697-763
7. Nurse, P. (1975) *Nature* **256**, 547-551
8. Russell, P., and Nurse, P. (1987b) *Cell* **49**, 569-576
9. Feilotter, H., Nurse, P., and Young, P. (1991) *Genetics* **127**, 309-318
10. Coleman, T. R., Tang, Z., and Dunphy, W. G. (1993) *Cell* **72**, 919-929
11. Parker, L. L., Walter, S. A., Young, P. G., and Piwnicka-Worms, H. (1993) *Nature* **363**, 736-738
12. Wu, L., and Russell, P. (1993) *Nature* **363**, 738-741
13. Breeding, C. S., Hudson, J., Balasubramanian, M. K., Hemmingsen, S. M., Young, P. G., and Gould, K. L. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 3399-3415
14. Kanoh, J., and Russell, P. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 3321-3334
15. Martin, S. G., and Berthelot-Grosjean, M. (2009) *Nature* **459**, 852-856
16. Moseley, J. B., Mayeux, A., Paoletti, A., and Nurse, P. (2009) *Nature* **459**, 857-860
17. McCahill, A., Warwick, J., Bolger, G. B., Houslay, M. D., and Yarwood, S. J. (2002) *Mol. Pharmacol.* **62**, 1261-1273
18. López-Bergami, P., Habelhah, H., Bhournik, A., Zhang, W., Wang, L. H., and Ronai, Z. (2005) *Mol. Cell* **19**, 309-320
19. He, D. Y., Neasta, J., and Ron, D. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 19043-19050
20. Robles, M. S., Boyault, C., Knutti, D., Padmanabhan, K., and Weitz, C. J. (2010) *Science* **327**, 463-466
21. McLeod, M., Shor, B., Caporaso, A., Wang, W., Chen, H., and Hu, L. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4016-4027
22. Núñez, A., Franco, A., Madrid, M., Soto, T., Vicente, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2009) *Mol. Biol. Cell* **20**, 3996-4009
23. Shor, B., and McLeod, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49119-49128
24. Baum, S., Bittins, M., Frey, S., and Seedorf, M. (2004) *Biochem. J.* **380**, 823-830
25. Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 1137-1141
26. Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C. M., Nissen, P., and Frank, J. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 957-962
27. Coyle, S. M., Gilbert, W. V., and Doudna, J. A. (2009) *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1626-1634
28. Rothberg, K. G., Burdette, D. L., Pfannstiel, J., Jetton, N., Singh, R., and Ruben, L. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 9781-9790
29. Marnidipudi, V., Zhang, J., Lee, K. C., and Cartwright, C. A. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6788-6798
30. Marnidipudi, V., Miller, L. D., Mochly-Rosen, D., and Cartwright, C. A. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 423-430
31. O'Connell, M. J., Raleigh, J. M., Verkade, H. M., and Nurse, P. (1997) *EMBO J.* **16**, 545-554
32. Soto, T., Villar-Tajadura, M. A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P., and Cansado,

- J. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 11516-11525
33. Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., Gacto, M., and Cansado, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 41594-41602
 34. Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991) *Methods Enzymol.* **283**, 506-520
 35. Kearsley, S. E., Montgomery, S., Labib, K., and Lindner, K. (2000) *EMBO J.* **19**, 1681-1690
 36. Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A. 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) *Yeast* **14**, 943-951
 37. Soto, T., Beltrán, F. F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J. B. A., Vicente-Soler, J., Cansado, J., and Gacto, M. (2002) *FEBS J.* **269**, 1-10
 38. Madrid, M., Núñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2007) *Mol. Biol. Cell.* **18**, 4405-4419
 39. Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., Mcleod, M., and Warbrick, E. (1993) *Experiments with Fission Yeast*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
 40. McInerney, C. J., Kersley, P. J., Creanor, J., and Fantes, P. A. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 4761-4768
 41. Tvegård, T., Soltani, H., Skjølberg, H. C., Krohn, M., Nilssen, E. A., Kearsley, S. E., Grallert, B., and Boye, E. (2007) *Genes Dev.* **15**, 649-654
 42. Petersen, J. (2009). *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 273-277
 43. López-Avilés, S., Grande, M., González, M., Helgesen, A. L., Alemany, V., Sánchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J. B., and Aligue, R. (2005) *Mol. Cell* **17**, 49-59
 44. Shiozaki, K., and Russell, P. (1995) *Nature* **378**, 739-743
 45. Suda, M., Yamada, S., Toda, T., Miyakawa, T., and Hirata, D. (2000) *FEBS Lett.* **486**, 305-309
 46. Kellogg, D. R. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 4883-4890
 47. Aligue, R., Wu, L., and Russell, P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13320-13325
 48. Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., and Liu, J. O. (2010) *Nat. Chem. Biol.* **6**, 209-217
 49. Paul, S. K., Oowatari, Y., and Kawamukai, M. (2009) *FEBS J.* **276**, 5076-5093
 50. Ishii, K., Kumada, K., Toda, T., and Yanagida, M. (1996) *EMBO J.* **15**, 6629-6640
 51. Grallert, B., Kearsley, S. E., Lenhard, M., Carlson, C. R., Nurse, P., Boye, E., and Labib, K. (2000) *J. Cell. Sci.* **113**, 1447-1458

FOOTNOTES

We thank to R.R. Daga (University Pablo de Olavide, Spain), for critical reading of the manuscript. Thanks to T. Kato (ERATO, Japan), S.E. Kearsley (University of Oxford, United Kingdom), P. Nurse (Rockefeller University, USA), J.B. Millar (University of Warwick, United Kingdom), P. Pérez (CSIC/University of Salamanca, Spain), P. Russell (The Scripps Research Institute, USA), and the Yeast Genetic Resource Center (YGRC, Japan) for kind supply of yeast strains; and to P. Pérez for help with flow cytometry analysis. A.N. is a predoctoral fellow from Fundación Séneca (Región de Murcia), Spain. A.F. is a postdoctoral fellow from the University of Murcia, Spain. This work was supported by grants BFU2008-01653 from MICINN, and 08725/PI/08 from Fundación Séneca (Región de Murcia), Spain, to J.C.

The abbreviations used are: EMM2, Edinburgh minimal medium; GFP, green fluorescent protein; HA6H, epitope comprising hemagglutinin antigen plus six histidine residues; HA, hemagglutinin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OD₆₀₀, optical density at 600 nm; SAPK, stress-activated protein kinase; YES, yeast extract plus supplements.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Cpc2 is a positive regulator of G2/M transition during the cell cycle. *A.* Cell morphology and size at division ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) in strains MM2 (control) and AN002 (*cpc2Δ*), growing in YES medium and stained with Calcofluor white. *B.* Cells from strains PPG148 (*cdc25-22*) and AN-CC18 (*cdc25-22 cpc2Δ*) were grown to an A_{600} of 0.3 at 25°C, shifted to 37°C for 3.5 h, and then released from the growth arrest by transfer back to 25°C. Aliquots were taken at different time intervals and Cdc2 phosphorylation at Y15 or total Cdc2 were detected by immunoblotting with anti-Cdc2 pY15 and anti-Cdk1/Cdc2 (PSTAIR) antibodies, respectively. Lower panels show the corresponding percentages of septated cells, binucleated cells, and Y15-phosphorylation for *cdc25-22* (black bars) and *cdc25-22 cpc2Δ* (white bars) cells. *C.* Samples containing 10^4 , 10^3 , 10^2 or 10^1 cells of strains MM2 (control), PPG148 (*cdc25-22*) and AN-CC18 (*cdc25-22 cpc2Δ*) grown in YES medium were spotted onto bacto-agar supplemented YES plates and incubated for 3 days at either 25°C, 28°C, 34°C and 37°C before being photographed. *D.* Cell morphology and size at division in strains PPG148 (*cdc25-22*) and AN-CC18 (*cdc25-22 cpc2Δ*) prepared as described above.

Fig. 2. Cpc2 does not regulate G1/S progression during the cell cycle. *A.* Flow cytometry histograms of cells from strains 326 (*cdc10-129*) and AN-CC10 (*cdc10-129 cpc2Δ*) that were synchronized by incubation in YES medium at 37°C for 3.5 h, transferred back to 25°C, and incubated for the times indicated. *B. Upper panel.* Cells from strains AN-CC21 (*cdc10-129 mcm4::GFP*) and AN-CC22 (*cdc10-129 mcm4::GFP cpc2Δ*) were synchronized at G1 by incubation in YES medium at 37°C for 3.5 h, and transfer back to 25°C. Samples were taken at different times and the percentage of cells with stable chromatin-bound Mcm4 (GFP-positive cells) was estimated by fluorescence microscopy. Strain AN-CC21, filled circles; strain AN-CC22, open triangles. *Lower panel.* Micrographs of cells from the above strains expressing Mcm4-GFP were taken 60 min after release and stained with DAPI. *C.* Synchronized cells from strains 326 (*cdc10-129*) and AN-CC10 (*cdc10-129 cpc2Δ*) were released at 25°C, aliquots taken at different time intervals, and Cdc2 phosphorylation at Y15 or total Cdc2 detected by immunoblotting with anti-Cdc2 pY15 or anti-Cdk1/Cdc2 (PSTAIR) antibodies, respectively.

Fig. 3. Wee1 is a target for Cpc2 during the regulation of G2/M transition. *A.* Cell morphology and size at division ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) in strains MI709 (*Wis1DD*) and AN600 (*Wis1DD cpc2Δ*) (*upper panel*), MI204 (*sty1Δ*) and AN-120 (*sty1Δ cpc2Δ*) (*lower panel*), growing in YES medium after staining with Calcofluor white. *B. Upper panel.* Cell morphology and size at division in strains FY16230 (*cdc2-3w cdc25Δ*) and AN-CC3 (*cdc2-3w cdc25Δ cpc2Δ*) prepared as described above. *Lower panel.* Samples containing 10^4 , 10^3 , 10^2 or 10^1 cells of strains FY16230 (*cdc2-3w cdc25Δ*) and AN-CC3 (*cdc2-3w cdc25Δ cpc2Δ*) grown in YES medium were spotted onto bacto-agar supplemented YES plates and incubated for 3 days at either 25°C, 28°C, 34°C and 37°C before being photographed. *C.* Cell morphology and size at division in strains FY7287 (*cdc2-1w*) and AN-CC1 (*cdc2-1w cpc2Δ*) (*upper panel*), FY7108 (*wee1-50*) and AN-CC5 (*wee1-50 cpc2Δ*) (*lower panel*) prepared as described above.

Fig. 4. Cpc2 negatively regulates Wee1 protein levels. *A.* Ribosome binding of Cpc2 is critical for proper regulation of G2/M transition. Cell morphology and size at division ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) in strains AN071 (*cpc2Δ cpc2-GFP*) and AN072 (*cpc2Δ cpc2 (DE)-GFP*) growing in YES medium and stained with Calcofluor white. *B.* Strains FM-23 (*cdc25-HA*, control) and AN-CC20 (*cdc25-HA cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log-phase. Cdc25 was detected in cell extracts by immunoblotting with anti-HA antibody. Anti-Cdc2 antibody was used for loading control. *C. Left panel.* Strains 1081 (*wee1-3HA*, control) and AN-CC8 (*wee1-3HA cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log-phase. Total extracts were obtained and Wee1 was detected by immunoblotting with anti-HA antibody. Anti-Cdc2 antibody was used for loading control. *Right panel.* Strains 1081 and AN-CC8 grown in YES medium were treated with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide and aliquots taken at

the times indicated. Detection of Wee1 and Cdc2 was performed as described above. *D.* Strains 1081 (control) and AN-CC8 (*cpc2Δ*) were grown in YES medium to early log phase. Total RNA was extracted from each sample and 20 μg resolved in 1.5% agarose formaldehyde gels. The denatured RNAs were transferred to nylon membranes and hybridized with ³²P-labeled probes for *wee1*⁺ and *leu1*⁺ (loading control).

Fig. 5. Protein level of the Wee1 inhibitor Cdr2 is positively regulated by Cpc2. (A). Strains MM-76 (*pom1-GFP*, control) and AN-CC35 (*pom1-GFP cpc2Δ*) were grown in YES medium to mid log-phase, total cell extracts obtained and Pom1 was detected by immunoblotting with anti-GFP antibody. Anti-Cdc2 antibody was used for loading control. (B). Strains LW117 (*nim1-HA6H*, control) and AN-CC15 (*nim1-HA6H cpc2Δ*) were grown as above described, and Nim1 was detected by immunoblotting with anti-HA antibody. (C) Strains JK2310 (*cdr2-HA6H*, control), AN-CC14 (*cdr2-HA6H cpc2Δ*), AN-CC23 (*cdr2-HA6H cpc2-GFP*) and AN-CC24 (*cdr2-HA6H cpc2(DE)-GFP*) were grown in YES medium as above, and Cdr2 was detected by immunoblotting with anti-HA antibody. (D). Strains LW117 (control), AN-CC15 (*cpc2Δ*), JK2310 (control), and AN-CC14 (*cpc2Δ*) were grown in YES medium to early log phase. Total RNA was extracted from each sample and 20 μg resolved in 1.5% agarose formaldehyde gels. The denatured RNAs were transferred to nylon membranes and hybridized with ³²P-labeled probes for *nim1*⁺ (strains LW117 and AN-CC15), *cdr2*⁺ (strains JK2310 and AN-CC14), and *leu1*⁺ (loading control). (E) and (F). Cell morphology and size at division (μm±SD) in strains JK2240 (*cdr2Δ*), AN-CC12 (*cdr2Δ cpc2Δ*), TS313 (*pom1Δ*), and AN-CC27 (*pom1Δ cpc2Δ*) growing in YES medium and stained with Calcofluor white.

Table 1. *S. pombe* strains used in this study

Strain	Genotype	Source/Reference
MM1	h ⁺ <i>ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> , 2004
MM2	h ⁻ <i>ade6-M216 leu1-32 ura4D-18</i>	Madrid <i>et al.</i> , 2004
AN001	h ⁺ <i>ade6-M216 cpc2::KanR leu1-32 ura4D-18</i>	Núñez <i>et al.</i> , 2009
AN002	h ⁻ <i>ade6-M216 cpc2::KanR leu1-32 ura4D-18</i>	Núñez <i>et al.</i> , 2009
PPG148	h ⁻ <i>cdc25-22 ura4D18</i>	P. Pérez lab
AN-CC18	h ⁻ <i>cdc25-22 cpc2::KanR ura4-D18</i>	This work
326	h ⁻ <i>cdc10-129</i>	Lab Stock
AN-CC10	h ⁻ <i>cdc10-129 cpc2::KanR</i>	This work
560	h ⁻ <i>mcm4-GFP::ura4⁺ leu1-32 ura4⁻</i>	Kearsey <i>et al.</i> , 2000
AN-CC16	h ⁻ <i>mcm4-GFP::ura4⁺ cpc2::KanR leu1-32 ura4⁻</i>	This work
AN-CC21	h ⁺ <i>cdc10-129 mcm4-GFP::ura4⁺ leu1-32 ura4⁻</i>	This work
AN-CC22	h ⁺ <i>cdc10-129 mcm4-GFP::ura4⁺ cpc2::KanR leu1-32 ura4⁻</i>	This work
MI709	h ⁻ <i>wis1DD-12myc::ura4⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Madrid <i>et al.</i> , 2007
AN600	h ⁻ <i>wis1DD-12myc::ura4⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
MI204	h ⁺ <i>ade⁻ styl::ura4⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Madrid <i>et al.</i> , 2007
AN-120	h ⁺ <i>ade⁻ styl::ura4⁺ cpc2::KanR pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	This work
FY16230	h ⁻ <i>cdc2-3w cdc25::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	YGRC
AN-CC3	h ⁻ <i>cdc2-3w cdc25::ura4⁺ cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
FY7108	h ⁻ <i>ade6-M216 wee1-50</i>	YGRC
AN-CC5	h ⁻ <i>ade6-M216 wee1-50 cpc2::KanR</i>	This work
FY7287	h ⁻ <i>cdc2-1w leu1-32</i>	YGRC
AN-CC1	h ⁻ <i>cdc2-1w cpc2::KanR leu1-32</i>	This work
AN071	h ⁺ <i>ade6-M216 cpc2::KanR cpc2-GFP::leu1⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	This work
AN072	h ⁺ <i>ade6-M216 cpc2::KanR cpc2(R36D K38E)-GFP::leu1⁺ pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	This work
FM-23	h ⁻ <i>ade6-M216 cdc25-HA::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	Lab Stock
AN-CC20	h ⁻ <i>ade6-M216 cdc25-HA::KanR cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
1081	h ⁻ <i>wee1-3HA6H ura4-D18 leu1-32</i>	O'Connell <i>et al.</i> , 1997
AN-CC8	h ⁻ <i>wee1-3HA6H cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
MM-76	h ⁺ <i>pom1-GFP::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	Lab Stock
AN-CC35	h ⁺ <i>pom1-GFP::KanR cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
LW117	h ⁻ <i>rim1-2HA6his::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	P. Russell lab
AN-CC15	h ⁻ <i>rim1-2HA6his::ura4⁺ cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
JK2310	h ⁻ <i>cdr2-2HA6his::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	P. Russell lab
AN-CC14	h ⁻ <i>cdr2-2HA6his::ura4⁺ cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
AN-CC23	h ⁻ <i>cdr2-2HA6his::ura4⁺ cpc2::KanR cpc2-GFP::leu1⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	This work
AN-CC24	h ⁻ <i>cdr2-2HA6his::ura4⁺ cpc2::KanR cpc2(R36D K38E)-GFP::leu1⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	This work
JK2240	h ⁻ <i>cdr2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	P. Russell lab
AN-CC12	h ⁻ <i>cdr2::ura4⁺ cpc2::KanR leu1-32 ura4-D18</i>	This work
TS313	h ⁻ <i>ade6-M216 pom1::KanR pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	Soto <i>et al.</i> , 2010
AN-CC27	h ⁻ <i>ade6-M216 pom1::KanR cpc2::KanR pmk1-HA6H::ura4⁺ leu1-32 ura4D-18</i>	This work

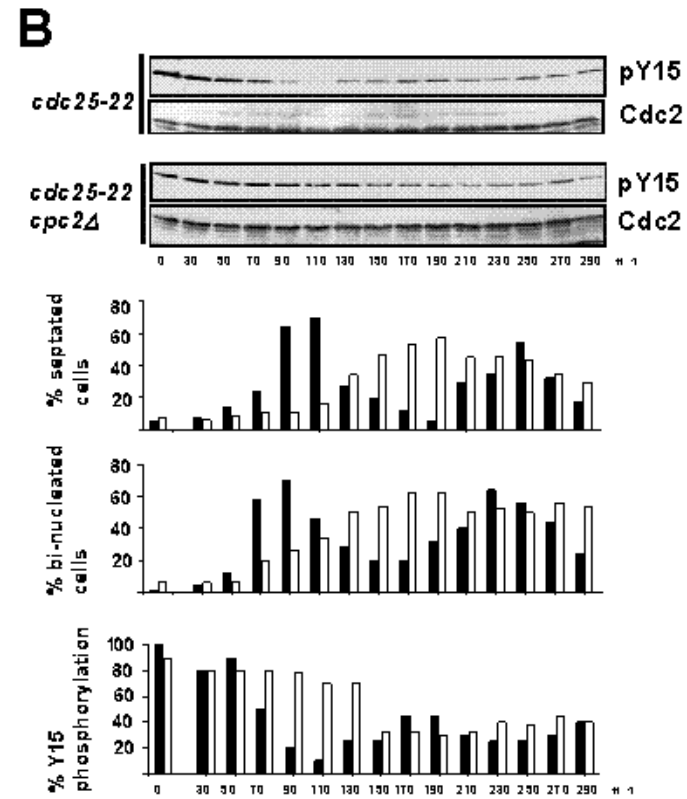
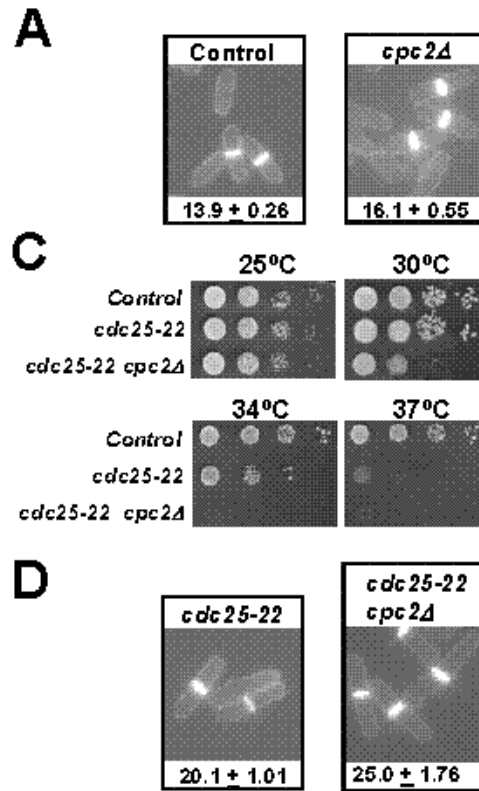


Figure 1

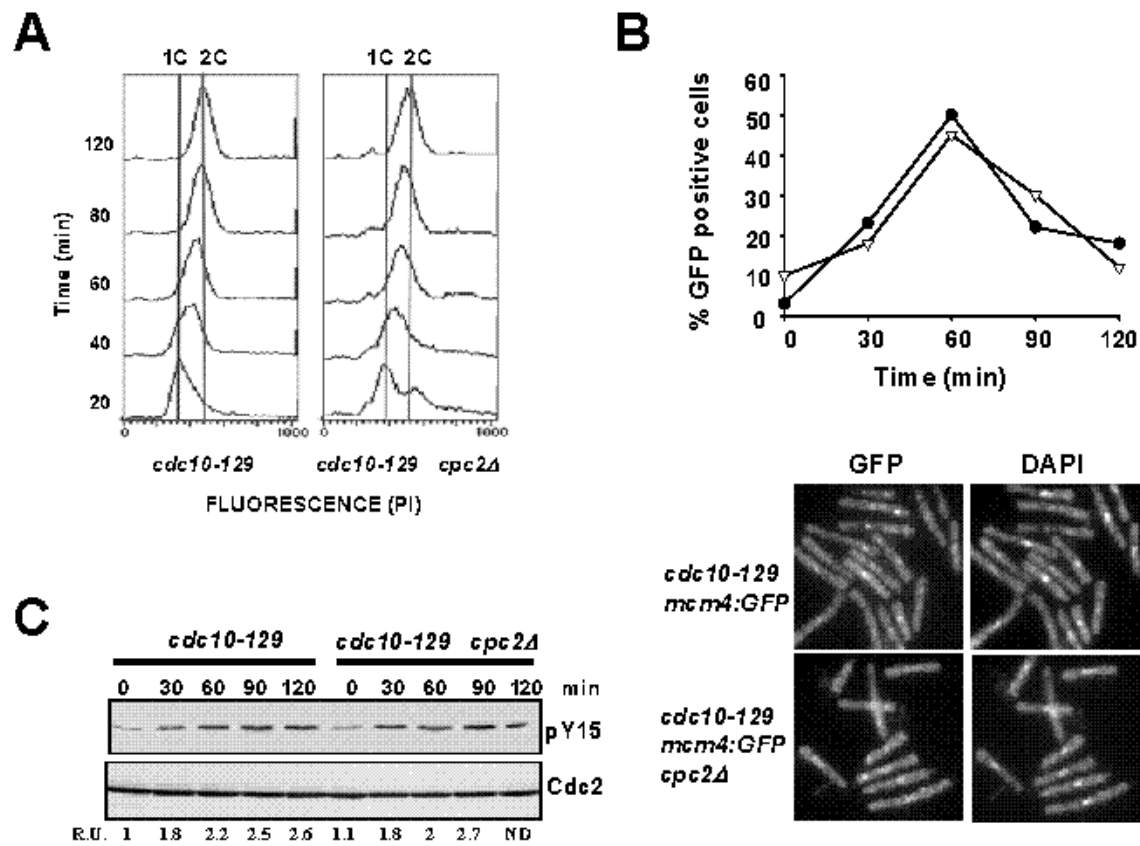


Figure 2

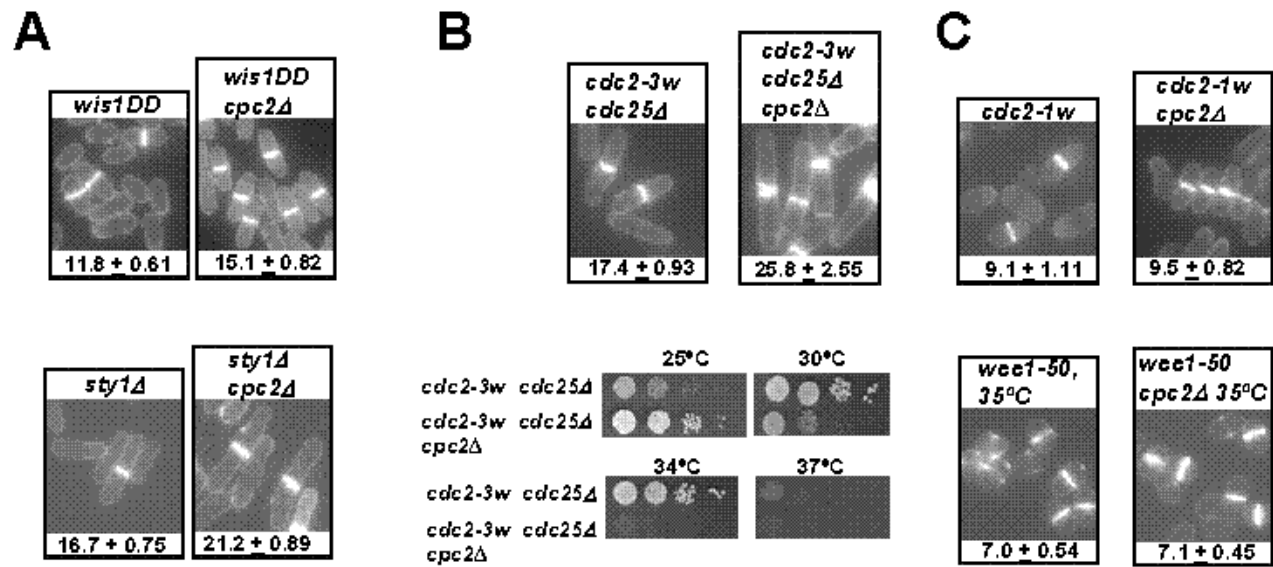


Figure 3

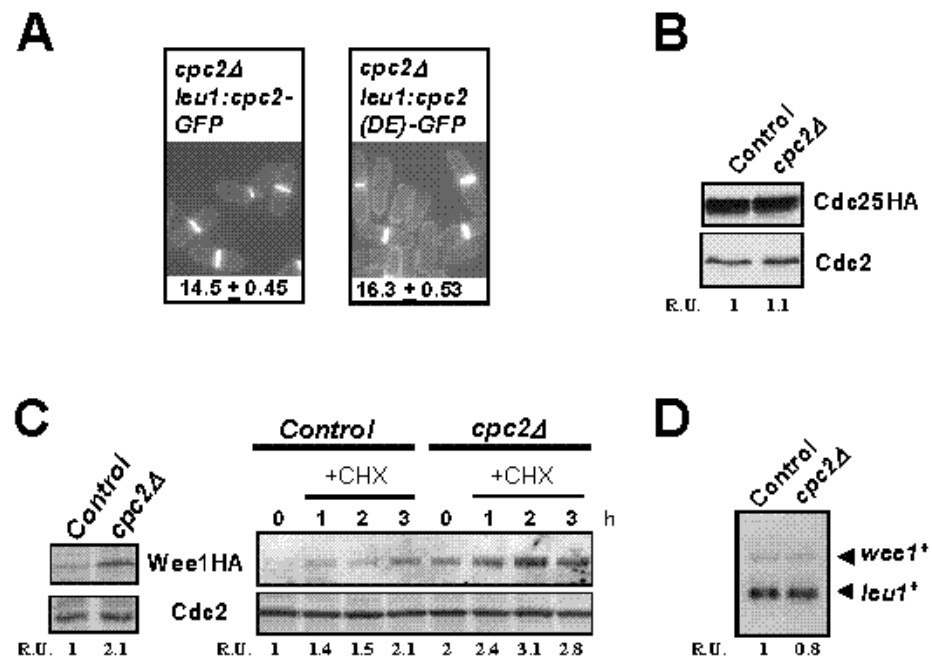


Figure 4

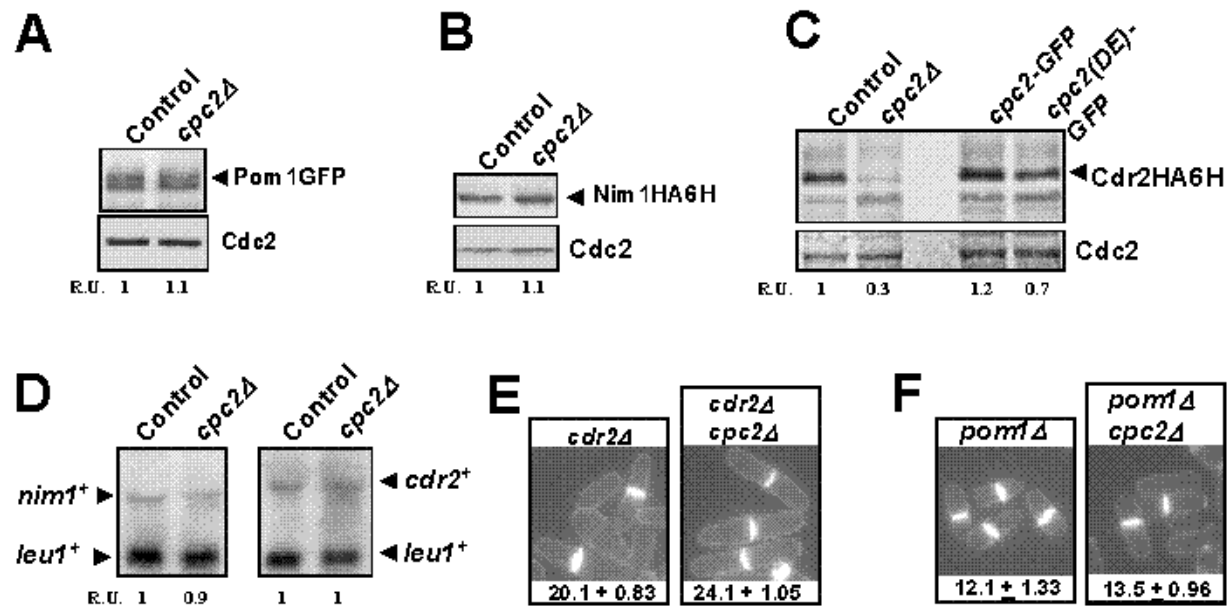


Figure 5

DISCUSIÓN

1.- Cpc2 REGULA LA ACTIVIDAD DE LA RUTA DE MAPK DE INTEGRIDAD CELULAR, AUNQUE NO ES UN COMPONENTE DE DICHA RUTA

RACK1 ha sido descrita como una proteína de andamiaje que en organismos superiores participa en multitud de procesos y rutas de transducción de señales, alguno de los cuales es dependiente de PKC (Schechtman y Mochly-Rosen, 2001). Sin embargo, el papel de Cpc2 (ortólogo a RACK1) en *S. pombe* como modulador de mecanismos de señalización no había sido estudiado con anterioridad. De manera análoga a RACK1, Cpc2 interacciona *in vivo* con Pck2, uno de los dos ortólogos de PKC en esta levadura (Won *et al.*, 2001). Pck2 es un componente de la ruta de MAPK de integridad celular en *S. pombe* (Ma *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2008), lo que sugería que Cpc2 podía ser también un miembro integral de dicha ruta. A favor de esta hipótesis se encontraba el hecho de que recientemente se ha descrito que en *S. cerevisiae* la falta de *ASC1* (homólogo a Cpc2) incrementa notablemente la sensibilidad celular frente a compuestos que dañan la pared celular, como el blanco de calcoflúor o la zimoliasa, (Valerius *et al.*, 2007).

Sin embargo, distintas evidencias obtenidas en este trabajo indican que, aunque Cpc2 modula la función de la ruta de integridad celular, no forma parte integral de dicha cascada de señalización. En primer lugar, los fenotipos asociados a la delección de los componentes del módulo de MAPK de la ruta de integridad, como la sensibilidad frente a caspofungina o la multiseptación (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997), se agravan en un fondo genético $\Delta cpc2$ (Figuras RI.3-5). En segundo lugar, Cpc2 regula la homeostasis de cloruro de manera independiente a la ruta de integridad celular, favoreciendo la tolerancia celular frente a la presencia de este anión en el medio de cultivo (Figura RI.7). En tercer lugar, en mamíferos se ha demostrado que RACK1 actúa como adaptador entre la MAP quinasa JNK y PKC para permitir la fosforilación de JNK en Ser¹²⁹, y que dicha fosforilación es necesaria para la posterior activación de la MAPK en respuesta a distintos estímulos (López-Bergami *et al.*, 2005; ver Introducción). Sin embargo, las células de *S. pombe* carentes de *cpc2*⁺ manifiestan una respuesta contraria, incrementando el estado de fosforilación de las MAP quinasa Pmk1 y Sty1 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés (Figuras RI.6, 10, 12 y 13). Si a esta evidencia sumamos el hecho de que la falta de Cpc2 aumenta la actividad basal de Pmk1 en un fondo genético $\Delta pck2$ ⁺, los datos obtenidos en la presente Memoria sugieren que en *S. pombe* Cpc2 regula la actividad de las rutas de MAPK de forma negativa mediante un mecanismo independiente de su papel como adaptador de Pck2.

2.- Cpc2 MODULA NEGATIVAMENTE EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE Sty1 Y Pmk1 POR MEDIO DE LAS FOSFATASAS DE TIROSINA Pyp1 Y Pyp2

Distintos estudios han demostrado que RACK1 y sus ortólogos en distintos organismos, entre los que se incluye *S. pombe*, forman parte integral de la subunidad 40S del ribosoma eucariótico (Shor *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2004; Coyle *et al.*, 2009). En este contexto, diversos trabajos han descrito que la tasa de traducción se ve alterada en ausencia de RACK1. Así, Shor *et al.* (2003) y Gerbasi *et al.* (2004) demostraron que la falta de *ASC1* (*S. cerevisiae*) o *cpc2⁺* (*S. pombe*) produce un descenso significativo en la síntesis de determinadas proteínas. Sin embargo, la expresión de la mayoría de ellas, como en el caso de la proteína ribosomal Rpl25 de *S. pombe*, estaría regulada a nivel traduccional, al no verse modificados los niveles del ARN mensajero correspondiente en ausencia de Cpc2 (Shor *et al.*, 2003).

Con estos antecedentes, el incremento observado en el grado de fosforilación en tirosina de las MAP quinasas Pmk1 y Sty1 en ausencia de Cpc2 podría explicarse si existiera un déficit en los niveles de alguna de las fosfatasas de tirosina que desfosforilan a ambas MAP quinasas. Los resultados obtenidos en esta Memoria han demostrado que esta predicción es correcta. Cpc2 regula positivamente la traducción de los ARN mensajeros de las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2 tanto en células en crecimiento como en situaciones de estrés, y esto ocurre sin afectar a la expresión de los correspondientes ARNm (Figuras RI.15 y 19). Además, esta regulación es específica de los ARNm de *pyp1⁺* y *pyp2⁺*, puesto que los niveles de otras fosfatasas que desfosforilan a Sty1 y Pmk1, como la fosfatasa de especificidad dual Pmp1, o las fosfatasas de treonina Ptc1 y Ptc3, no variaron en ausencia de *cpc2⁺* (Figuras RI.16). Por tanto, Cpc2 actúa como regulador negativo de la actividad de Sty1 y Pmk1 a nivel traduccional por medio de Pyp1 y Pyp2, y dicha función es fundamental para un correcto funcionamiento de las rutas SAPK y de integridad celular. Chasse *et al.* (2006) y Zeller *et al.* (2007) han descrito que en *S. cerevisiae* las MAP quinasas KSS1 y SLT2 muestran un incremento en su estado basal de fosforilación en ausencia de ASC1. Estos resultados sugieren que podría existir un mecanismo conservado similar al descrito en este trabajo, por el cual las proteínas RACK1/Cpc2/ASC1 regulan a nivel traduccional el grado de activación de las MAP quinasas. Sin embargo, actualmente no existen datos que corroboren esta hipótesis.

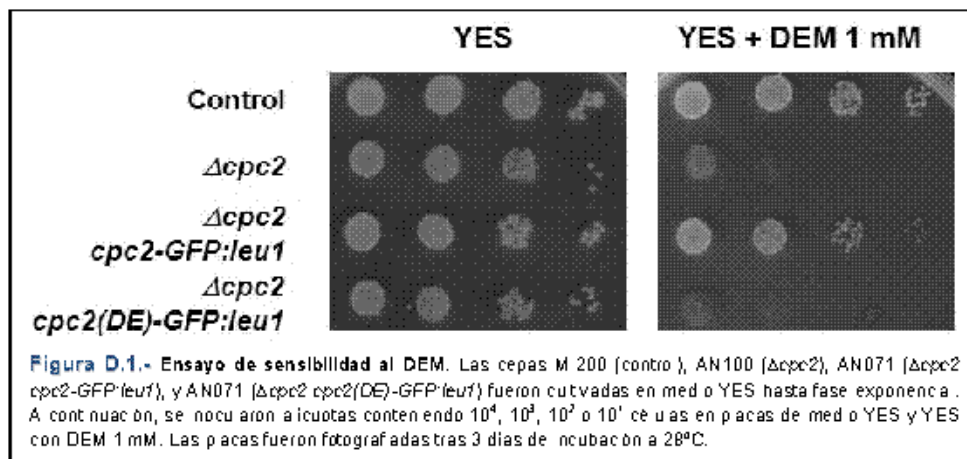
Cpc2 regula positivamente la traducción del ARN mensajero de *atf1⁺*, de modo que en su ausencia los niveles de este factor de transcripción también se encuentran reducidos (Figura RI.18). Atf1 es fosforilado y estabilizado *in vivo* por la MAP quinasa Sty1, y desempeña un

papel crucial en la respuesta de *S. pombe* frente a gran variedad de estreses (Shiozaki y Russell, 1996, Wilkinson *et al.*, 1996; Paredes *et al.*, 2003, 2004). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que los menores niveles de Atf1 presentes en el mutante $\Delta cpc2$ no condicionan su función biológica, ya que la expresión de los genes dependientes de dicho factor en respuesta a estrés oxidativo u osmótico (incluidos *pyp1⁺* y *pyp2⁺*) no se vio afectada de manera significativa (Figura R1.19). Estos datos estarían de acuerdo con los publicados recientemente por el grupo de Nic Jones (Lawrence *et al.*, 2007), y que han descrito que la expresión génica dependiente de Atf1 en un mutante que expresa niveles bajos de dicho factor de transcripcional (una versión inestable no fosforilable por Sty1), no se encuentra afectada significativamente.

3.- Cpc2 ES IMPORTANTE DURANTE LA RESPUESTA CELULAR FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL DESARROLLO SEXUAL EN *S. pombe*

En ausencia de Cpc2 la inducción de los genes dependientes de Atf1 en respuesta al tratamiento con peróxido de hidrógeno no se encuentra afectada de manera significativa. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el mutante $\Delta cpc2$ presenta una capacidad defensiva limitada en estas condiciones, evidenciada por el retraso en la cinética de acumulación nuclear y de expresión génica mediada por Pap1, un factor transcripcional fundamental en la respuesta de *S. pombe* frente a este tipo de estrés (Figura R1.23). De manera análoga a lo descrito para las fosfatasas Pyp1 y Pyp2, Cpc2 actúa como regulador positivo de la catalasa citoplasmática Ctt1, una de las principales proteínas detoxificantes del peróxido intracelular en eucariotas. Aunque no se ha analizado en este trabajo, es muy probable que la falta de Cpc2 comprometa la traducción de otras enzimas implicadas en la atenuación de los ROS intracelulares.

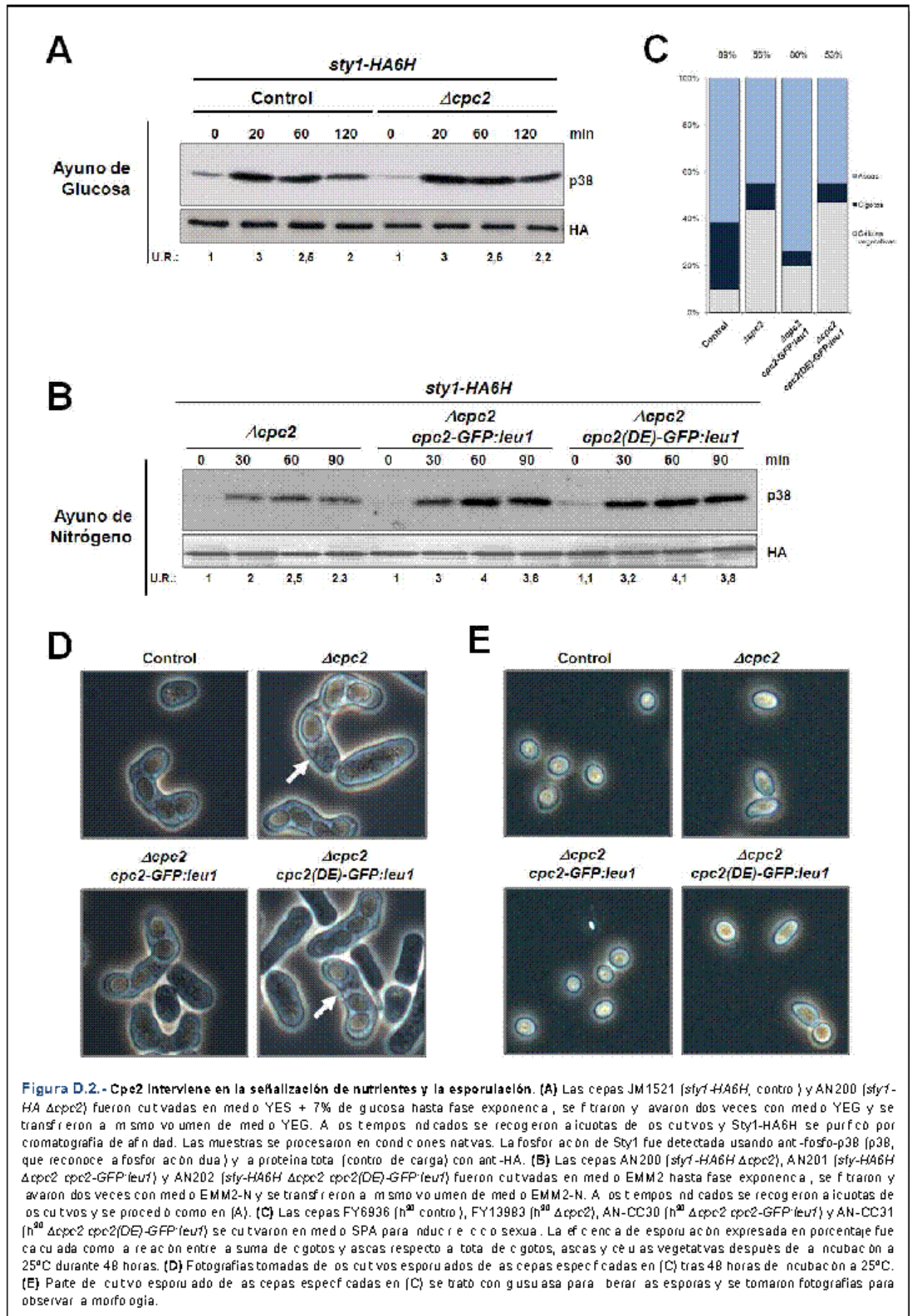
En este contexto, recientemente hemos confirmado que el mutante $\Delta cpc2$ muestra una fuerte sensibilidad al crecimiento en presencia del pro-oxidante di-etil-maleato (DEM; Figura D.1). Aunque el mecanismo de acción concreto de este compuesto no se conoce con precisión, se ha descrito que el tratamiento con DEM reduce drásticamente los niveles intracelulares de glutatión reducido (Wanke *et al.*, 1999; Faraonio *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010). Los ensayos realizados en nuestro laboratorio indicaron que tanto los niveles de glutatión total o reducido, como la actividad glutatión-reductasa celular, no variaron en ausencia de *cpc2⁺* (datos no mostrados). Sin embargo, la correcta localización subcelular de Cpc2 es crucial para una



respuesta adecuada a este compuesto, ya que el mutante que expresa la versión no-ribosomal de Cpc2 mostró el mismo grado de sensibilidad que

el mutante nulo (Figura D.1). Es posible que, al igual que ocurre en presencia de H_2O_2 , Cpc2 regule los niveles de una o varias proteínas implicadas en la detoxificación del DEM. En todo caso, es necesario realizar un estudio más detallado para identificar la causa de este fenotipo.

Distintos estudios han demostrado que los niveles de expresión de ASC1 en *S. cerevisiae* varían según la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Hoffmann *et al.*, 1999; Kleinschmidt *et al.*, 2006; Valerius *et al.*, 2007; Zeller *et al.*, 2007). Sin embargo, a diferencia de este modelo, los resultados de nuestro estudio con *S. pombe* han confirmado que ni los niveles intracelulares de Cpc2 ni su localización subcelular, sufrieron cambios significativos en función de la fuente de carbono o de nitrógeno presente en el medio de cultivo, ni tampoco en respuesta a distintos tipos de estrés (Figura R1.1). Por otra parte, debido a su homología con las subunidades G_β de las proteínas G heterotriméricas, se ha descrito que ASC1 puede sustituir a esta subunidad en la transmisión de la señal de glucosa en la levadura gemante, regulando negativamente la señalización mediada por este azúcar (Zeller *et al.*, 2007). En *S. pombe*, al igual que en *S. cerevisiae*, la señalización por glucosa implica la participación de un receptor transmembranal acoplado a una proteína G heterotrimérica que en ausencia de glucosa activa a la adenilato ciclasa, con el consiguiente incremento en los niveles intracelulares de AMPc y la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Hoffman, 2005). En *S. pombe* el cambio de fuente de carbono de glucosa a glicerol provoca la activación de la ruta SAPK (Stettler *et al.*, 1996; Madrid *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros ensayos muestran que la activación de Sty1 durante el ayuno de glucosa no presenta diferencias significativas entre las células control y el mutante $\Delta cpc2$ (Figura D.2A). Teniendo en cuenta que McLeod *et al.* (2000) no encontraron relación funcional entre Cpc2 y la actividad de PKA, en conjunto nuestros resultados sugieren que en *S. pombe* Cpc2 no ejerce un papel relevante la señalización intracelular por esta fuente de carbono.



Por el contrario, en *S. pombe* Cpc2 parece jugar un papel importante en la señalización del ayuno de nitrógeno. Este estímulo induce la activación de la MAP quinasa Sty1, cuya activación es fundamental para el inicio del programa de desarrollo sexual en esta levadura (Shiozaki y Russell, 1996). Sin embargo, y como se observa en la Figura D.2B, el mutante carente de *cpc2*⁺ mostró una activación defectiva de Sty1 en estas condiciones. Al mismo tiempo, un dato muy interesante fue que el defecto de activación de Sty1 no se observa en el mutante que expresa la versión no-ribosomal de Cpc2, al recuperar una fosforilación similar a la de la cepa que expresa la versión control Cpc2-GFP (Figura D.2B). Este resultado supondría la primera evidencia en este trabajo sobre una posible función de Cpc2 *independiente* de su unión al ribosoma, y que será estudiada con más detalle en trabajos posteriores.

El estudio original de McLeod *et al.* (2000) sobre Cpc2 describía que las células carentes de *cpc2*⁺ mostraban un defecto en el bloqueo en fase G₁ previo al inicio de la conjugación durante el ayuno de nitrógeno. Los mutantes Δ *cpc2* no son estériles, pero muestran un retraso en el inicio de la conjugación, lo que provoca una disminución en la eficiencia de la esporulación (Figura D.2C). Curiosamente, un porcentaje de las ascas generadas (~7%) presentan un número atípico de esporas (2 o 3), en lugar de las 4 habituales (Figura D.2D). Además, las esporas en este mutante son más grandes y alargadas que las del control, que muestran un aspecto más redondeado (Figura D.2E).

Recientemente, se ha descrito la interacción de Cpc2 con las proteínas Moc ("*multicopy suppressor of overexpressed cyr1*⁺"), identificadas como elementos supresores de la esterilidad parcial producida por altos niveles de AMPc asociada a la sobre-expresión de *cyr1*⁺ (Paul *et al.*, 2009). Cpc2 interacciona *in vivo* con Moc1 y Moc2, y en ensayos de dos híbridos también con Moc3. Hay que señalar que Moc3 es un regulador transcripcional implicado en la respuesta a estrés y desarrollo sexual. Curiosamente, las células Δ *moc3* generan ascas aberrantes, con un número variable de esporas en su interior (Goldar *et al.*, 2005). Aunque la interacción entre Cpc2 y Moc3 no se ha demostrado *in vivo*, se ha sugerido la existencia de un complejo molecular entre las distintas proteínas Moc y mediada por Cpc2 (Paul *et al.*, 2009). Sin embargo, los defectos en la conjugación y la esporulación también se manifiestan en el mutante que expresa la versión no-ribosomal de Cpc2 (Figuras D.2, paneles C-E). Ello sugiere que estos fenotipos son consecuencia de un defecto vinculado a la función de Cpc2 como regulador traduccional.

4.- Cpc2 REGULA LA TRANSICION G₂/M DEL CICLO CELULAR POR MEDIO DE Wee1

La quinasa Wee1 fosforila a Cdc2 e inhibe la entrada en mitosis de manera dosis-dependiente (Russell y Nurse, 1987), lo que significa que sus niveles intracelulares deben estar fuertemente regulados durante el ciclo celular. De hecho, varios estudios realizados en distintos organismos, incluyendo *S. pombe*, han confirmado que los niveles de Wee1 disminuyen drásticamente durante la transición G₂/M, lo que sugiere la existencia de mecanismos específicos que regulan tanto su abundancia como su actividad (McGowan y Russell, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Aligue *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos en esta Memoria indican que Cpc2 regula la transición G₂/M del ciclo celular por medio de Wee1. Así, el incremento en el tamaño en división de las células del mutante $\Delta cpc2$ (indicativo de un retraso en la entrada en mitosis) sólo se suprimió en ausencia de Wee1 (Figura RII.9). Por el contrario, tanto la supresión de la actividad de Cdc25 en un fondo genético *cdc2-3w*, como la falta de Sty1 (que inhibe la actividad de Cdc25 vía *Srk1*), aumentaron de forma aditiva el defecto de entrada en mitosis que provoca la ausencia de *cpc2*⁺ (Figuras RII.6 y 8). Por último, el mutante $\Delta cpc2$ mostró un incremento importante en los niveles de Wee1, mientras que los niveles de Cdc25 permanecieron invariables (Figura RII.11). Dado que, como hemos comentado, Wee1 inhibe la actividad de Cdc2 de forma dosis-dependiente, el incremento en los niveles intracelulares de Wee1 en el mutante $\Delta cpc2$ podría explicar, al menos en parte, el retraso en el inicio de la mitosis.

En *S. pombe* la inhibición parcial de la síntesis proteica en presencia de cicloheximida incrementa los niveles de proteína de Wee1 e induce un bloqueo del ciclo celular en fase G₂ (Suda *et al.*, 2000). Nuestros resultados han confirmado esta observación, pero también indicaron que el tratamiento con cicloheximida en las células carentes de Cpc2 provocaba un incremento adicional en los niveles de Wee1 (Figura RII.12), lo que sugiere la existencia de mecanismos regulatorios independientes. Esta posibilidad tiene sentido si consideramos que mientras Cpc2 está asociado a la subunidad ribosomal 40S, la cicloheximida lo hace específicamente a la subunidad 60S, bloqueando el paso de elongación durante la síntesis de proteínas (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010).

La regulación de la actividad biológica de Wee1 es bastante compleja y poco conocida (ver Introducción). Aún así, parece claro que la hiperfosforilación de Wee1 constituye un mecanismo conservado de inactivación de esta quinasa (revisión de Kellogg, 2003; Lee *et al.*, 2005; Harvey *et al.*, 2005). En *S. pombe*, dos quinastas homólogas, Nim1/Cdr1 y Cdr2, fosforilan e inactivan a Wee1 *in vitro* e *in vivo* (Russell y Nurse, 1987; Coleman *et al.*, 1993;

Parker *et al.*, 1993; Wu y Russell, 1993; Kanoh y Russell, 1998; Breeding *et al.*, 1998). Como consecuencia, su ausencia produce un incremento del tamaño celular en división debido a la falta de represión de la actividad de Wee1. Sorprendentemente, los mutantes carentes de *cpc2*⁺ muestran un descenso claro en los niveles de Cdr2, mientras que los niveles de ARNm no se ven afectados (Figura RII.13), lo que sugiere que Cpc2 regula positivamente la traducción de *cdr2*⁺. Además, este control traduccional es específico de *cdr2*⁺, ya que los niveles de proteína de la quinasa homóloga Cdr1 permanecen invariables en ausencia de Cpc2. En resumen, nuestros resultados apoyan la idea de que el control que ejerce Cpc2 sobre la transición G₂/M de ciclo celular por medio de Wee1 se establece a dos niveles:

- i) Regulando negativamente los niveles de proteína de Wee1
- ii) Estimulando la traducción de Cdr2, un inhibidor específico de Wee1.

El incremento del tamaño en división del doble mutante $\Delta cdr2 \Delta cpc2$ comparado con los mutantes sencillos $\Delta cdr2$ y $\Delta cpc2$, y la supresión parcial de la delección de *cpc2*⁺ sobre el menor tamaño en división de las células $\Delta pom1$ (sin inhibición por Cdr2), sugieren la existencia de este segundo nivel de regulación.

RACK1 se une e inhibe la actividad de Src durante la fase G₁ del ciclo celular en células inmortalizadas de ratón NIH3T3, produciendo un retraso de la entrada en fase S. (Chang *et al.*, 1998; Mamidipudi *et al.*, 2004). Así, la falta de interacción entre RACK1 y Src promueve cambios importantes en los moduladores de la transición G₁/S: se incrementa la actividad de ciertas CDKs (CDK2 y CDK4), se induce la expresión de las ciclinas A, E y D1, se inhibe la expresión de los inhibidores de las CDKs p16, p15 y p27, y aumenta el grado de fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) (Mamidipudi *et al.*, 2007). Por el contrario, en *S. pombe* nuestros resultados indican que Cpc2 no participa en la regulación de esta fase del ciclo celular, ya que la cinética de la transición G₁/S analizada mediante citometría de flujo, la formación del complejo de pre-replicación y la cinética de fosforilación de Cdc2 en Tyr¹⁵ fueron similares en las células control y en el mutante $\Delta cpc2$ (Figuras RII.3-5). Esta diferencia entre RACK1 y Cpc2 sugiere que la función de RACK1 como modulador del ciclo celular ha cambiado probablemente a lo largo de la evolución. Por otra parte, se había descrito previamente que la expresión de RACK1 humano complementa estructural y funcionalmente los defectos de los mutantes de *S. pombe* carentes de *cpc2*⁺, incluyendo el retraso en mitosis (McLeod *et al.*, 2000; Won *et al.*, 2001). Puesto que RACK1 se encuentra unido al ribosoma en células de mamíferos (Link *et al.*, 1999; Sengupta *et al.*, 2004), es muy probable que también regule la transición G₂/M por medio de Wee1, de manera similar al modelo descrito en este trabajo para Cpc2. El hecho de que en las células de mamíferos la fase G₁ sea, con diferencia,

la más larga de todo el ciclo (al contrario que *S. pombe* que pasa tres cuartos de su ciclo celular en fase G₂), podría "ocultar" la existencia de un control de RACK1 sobre la transición G₂/M.

En cualquier caso, los resultados obtenidos en este trabajo han revelado el papel clave que Cpc2 ejerce durante la transición G₂/M en *S. pombe*, así como la existencia de un novedoso mecanismo de control del ciclo celular basado en un minucioso control a nivel traduccional de los niveles y actividad biológica de Wee1.

5.- LA LOCALIZACIÓN DE Cpc2 EN EL RIBOSOMA ES NECESARIA PARA UNA ADECUADA RESPUESTA A ESTRÉS, EL DESARROLLO SEXUAL Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN *S. pombe*

La reciente descripción de la existencia de ciertos aminoácidos conservados en la secuencia de *RACK1/ASC1* responsables de su asociación al ribosoma (Coyle *et al.*, 2009), nos ha permitido demostrar en esta Memoria de Tesis que la función de Cpc2 como modulador de la actividad de las rutas de MAPK o de la respuesta defensiva frente al estrés oxidativo depende en su capacidad para unirse a la subunidad 40S del ribosoma en *S. pombe*. Así, los mutantes que expresan una versión no-ribosomal de Cpc2, Cpc2(DE), mostraron niveles menores de las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2, del factor transcripcional Atf1 (Figuras RI.31 y 32) y presentan una sensibilidad apreciable al crecimiento en presencia del pro-oxidante DEM (Figura D.1). Asimismo, estos mutantes también manifiestan un claro retraso en la entrada en mitosis (Figura RII.10), y defectos evidentes en el desarrollo sexual (Figura D.2). El hecho de que la mayoría los fenotipos del mutante nulo $\Delta cpc2$ sean compartidos por el mutante que expresa la versión no-ribosomal de Cpc2 sugiere que la función biológica de esta proteína está vinculada fundamentalmente con su papel como regulador traduccional a nivel ribosomal.

De acuerdo con nuestros resultados, Cpc2 parece ejercer una regulación selectiva de la traducción de determinados ARN mensajeros, tanto en células creciendo vegetativamente como en respuesta a diferentes tipos de estímulos ambientales. Curiosamente, la función de las proteínas sometidas a esta regulación no parece estar restringida a un único proceso, afectando tanto a proteínas reguladoras de la actividad de las rutas de MAPK como de la progresión del ciclo celular. En *S. cerevisiae* se ha descrito que las células carentes de *ASC1* presentan un incremento en el estado de fosforilación del factor eIF2 α . La fosforilación de este factor en respuesta a estrés está relacionada con la inhibición general de la síntesis proteica y la estimulación específica de la traducción de ciertos ARNm que codifican proteínas implicadas

en la adaptación a las nuevas condiciones (Wek *et al.*, 2006). En *S. pombe* las células carentes de *cpc2*⁺ también presentan un incremento de la fosforilación de eIF2 α (datos no mostrados). Por el contrario, los resultados obtenidos con el mutante *eIF2 α (S52A)* sugieren que el mecanismo de regulación de Cpc2 a nivel traduccional no se produce a través de este elemento (Figura R1.20).

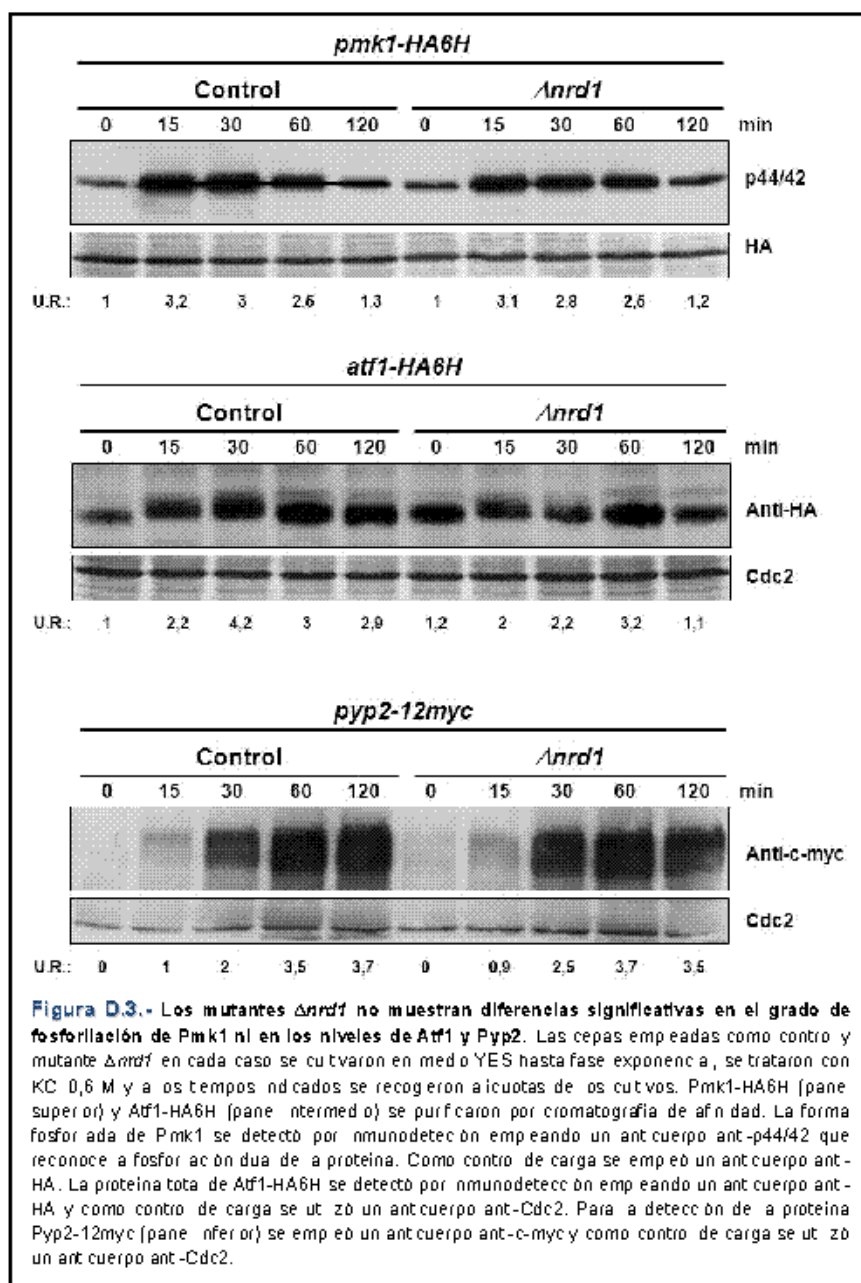
¿Cómo podría entonces Cpc2 llevar a cabo esta regulación? Dado que en su secuencia no existen motivos conservados de unión a ARN pero sí dominios WD40 implicados en la interacción entre proteína-proteína, una hipótesis muy atractiva es que Cpc2 fuese capaz de interactuar con diferentes proteínas de unión a ARN dependiendo del estado de la célula y las condiciones ambientales, regulando específicamente la traducción de determinados mensajeros y favoreciendo la adaptación celular frente a distintas situaciones. De acuerdo con esta hipótesis, la falta de *cpc2*⁺ provocaría la alteración de distintos procesos fisiológicos, coincidente con los defectos pleiotrópicos que muestra el mutante $\Delta cpc2$.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que SCP160, una proteína de unión a ARNm y ortólogo a la Vigilina de vertebrados, se asocia a los ribosomas de manera dependiente de *ASC1* (Baum *et al.*, 2004). Según estos autores, un complejo formado por SCP160-ASC1 mediaría la traducción de un grupo específico de ARNm (Baum *et al.*, 2004). El ortólogo de *SCP160* en *S. pombe*, *vgl1*⁺, presenta 12 motivos KH de unión a ARN y sería un buen candidato a asociarse a Cpc2 para desempeñar esta función en la levadura con fisión. Sin embargo, los mutantes carentes de *vgl1*⁺ no manifiestan ninguno de los fenotipos asociados a la delección de *cpc2*⁺, como el incremento en el tamaño en división, o la hiperactivación de Pmk1 o Sty1 (datos no mostrados). Por tanto, parece poco probable que Vgl1 interactúe funcionalmente con Cpc2. Otro candidato potencial es la proteína de unión a ARN Msa2/Nrd1, que interactúa *in vivo* con Cpc2, y cuya delección induce el desarrollo sexual en ausencia de limitación de nutrientes (Tsukahara *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2004). Además, recientemente se ha descrito que Pmk1 fosforila a Nrd1 e inhibe su actividad (Sato *et al.*, 2009). Sin embargo, los fenotipos opuestos de los mutantes $\Delta cpc2$ y $\Delta nrd1$ en cuanto al desarrollo sexual y la ausencia de otros defectos asociados a la delección de *cpc2*⁺, sugieren que Nrd1 no es el factor intermediario entre Cpc2 y los ARNm. Los resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio apoyan esta idea. Contrariamente a lo que ocurre en el mutante $\Delta cpc2$, el mutante $\Delta nrd1$ no muestra diferencias significativas con el control en cuanto a los niveles de Atf1 y Pyp2 en respuesta a estrés (Figura D.3). Además, las células carentes de *nrd1*⁺ tampoco muestran diferencias con el control en el estado de activación de Pmk1 (Figura D.3), lo que sugiere que no existe una relación funcional entre Nrd1 y Cpc2. Una conclusión similar es aplicable para el caso de Rnc1. Esta proteína de unión a ARN estabiliza el mensajero de la fosfatasa Pmp1 y es fosforilada por Pmk1,

estableciendo una retroalimentación negativa sobre la ruta de integridad celular (Sugiura *et al.*, 2003). Nuestros resultados demuestran que la expresión de Pmp1 es independiente de Cpc2, ya que los niveles de esta proteína no se ven alterados en ausencia de *cpc2*⁺ (Figura R1.16).

Como se mencionó anteriormente, Cpc2 interacciona con las proteínas Moc (Paul *et al.*, 2009). Dada la estructura de Cpc2 y su capacidad para poder interactuar con diferentes proteínas simultáneamente, se ha sugerido que Cpc2 sirva de nexo entre Moc1 y Moc2 para formar un complejo molecular que regule el desarrollo sexual en *S. pombe*. *moc2*⁺/*ded1*⁺ codifica una helicasa de ARN esencial implicada en la diferenciación sexual

(Kawamukai, 1998). El homólogo en *S. cerevisiae* (DED1) parece estar implicado en los pasos iniciales de la traducción, de modo que en su ausencia se reducen el número de polisomas (De La Cruz *et al.*, 1997). Además, la sobre-expresión de *DED1* rescata la letalidad producida por otros elementos implicados en la traducción y estabilidad de ARN mensajeros (Chuang *et al.*, 1997; De La Cruz *et al.*, 1997). Por otra parte, las células carentes de *moc2*⁺ muestran defectos en la progresión del ciclo celular en *S. pombe*, aunque relacionados con la transición G₁/S y asociados a una reducción en los niveles de las ciclinas Cig2 y Cdc13 (Grallert *et al.*, 2000). *moc1*⁺/*sds23*⁺ codifica un inductor del desarrollo sexual que participa en la resistencia a estrés térmico y salino (Kawamukai, 1998; Goldar *et al.*, 2005). En base a ensayos de doble híbrido se



ha propuesto que el complejo Moc1-Cpc2-Moc2 interacciona con Moc3, un activador transcripcional cuya delección conduce a la formación de ascas con un número anormal de esporas (Goldar *et al.*, 2005). La similitud de alguno de estos fenotipos con los del mutante $\Delta cpc2$, y la participación de las proteínas Moc en procesos como el desarrollo sexual, la resistencia a estrés y el control del ciclo celular, sugiere que Cpc2 podría relacionarse estructural y funcionalmente con alguna de estas proteínas, aunque es necesario realizar un estudio en profundidad para verificar esta hipótesis.

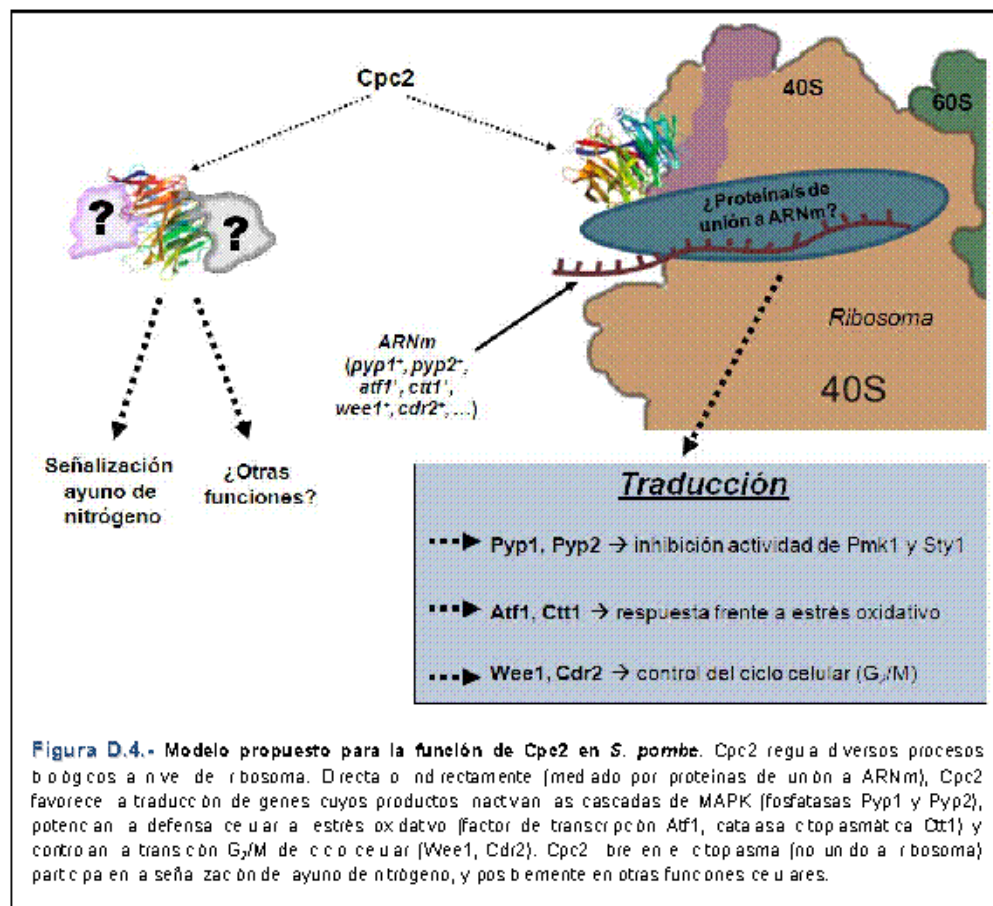
Algunos autores han descrito la existencia de unidades de RACK1/Cpc2 libres en el citoplasma, dejando la puerta abierta al descubrimiento de nuevas funciones independientes de su unión al ribosoma (Ceci *et al.*, 2003; Shor *et al.*, 2003). En *S. cerevisiae* se han descrito algunos ejemplos en este sentido. ASC1 puede actuar a modo de subunidad β de las proteínas G en la señalización de glucosa en el medio (Zeller *et al.*, 2007). Asimismo, Coyle *et al.* (2009) demostraron que la presencia de ASC1, pero no su localización en el ribosoma, es necesaria para el crecimiento invasivo de *S. cerevisiae* en respuesta al ayuno de nutrientes. Recientemente, hemos observado que en *S. pombe* la correcta fosforilación de Sty1 frente al ayuno de nitrógeno requiere la presencia de Cpc2, pero no su localización en el ribosoma (Figura D.2). Sin embargo, los defectos en la conjugación y esporulación del mutante nulo $\Delta cpc2$ en respuesta a este estímulo no son rescatados por la versión no-ribosomal de Cpc2. Estos datos aparentemente contradictorios apoyan la hipótesis de que Cpc2 ejerce funciones independientes de su actividad desde el ribosoma. De alguna manera, Cpc2 contribuye positivamente a la fosforilación de Sty1 durante la señalización del ayuno de fuente de nitrógeno, además de su papel como regulador traduccional responsable de un correcto desarrollo de la conjugación y/o esporulación.

6.- UN MODELO PARA EXPLICAR LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE Cpc2 EN *S. pombe*

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral nos permiten proponer el siguiente modelo funcional para Cpc2 (Figura D.4). En *S. pombe*, Cpc2 ejerce su actividad fundamentalmente a nivel del ribosoma, actuando como regulador selectivo de la traducción de ARN mensajeros específicos. Así, Cpc2 modula el grado de fosforilación de las MAP quinasas Sty1 y Pmk1 regulando positivamente la traducción de los mensajeros de las fosfatasa *pyp1⁺* y *pyp2⁺* que desfosforilan a ambas quinasas. También promueve la expresión de Atf1, el factor de transcripción clave en la respuesta celular frente a múltiples tipos de

estrés, y estimula la traducción de enzimas detoxificantes, como la catalasa citoplasmática Ctt1, necesarios para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno.

Asimismo, Cpc2 regula la progresión del ciclo celular reprimiendo la expresión de Wee1 y estimulando la traducción de Cdr2, un inhibidor de la actividad de esta quinasa. Dado que su secuencia no presenta motivos de unión a ARN (aunque sí múltiples motivos WD40), postulamos que Cpc2 lleva a cabo su función de forma indirecta mediante la interacción con proteínas de unión a ARN y su reclutamiento al ribosoma.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Cpc2, el ortólogo de RACK1 en células superiores, regula negativamente el grado de fosforilación de las MAP quinasas de integridad celular, Pmk1, y de respuesta a estrés, Sty1, favoreciendo la traducción de las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2 responsables de la desfosforilación de ambas quinasas.

2.- Cpc2 regula de manera positiva la síntesis del factor de transcripción Atf1. Sin embargo, la disminución en los niveles de Atf1 en las células carentes de *cpc2*⁺ no compromete su función como activador transcripcional en la respuesta a estrés.

3.- En ausencia de Cpc2, las células ven reducida su viabilidad en respuesta al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno. Este fenotipo se debe, en parte, a la incapacidad de sintetizar cantidades suficientes de catalasa citoplasmática (Ctt1), el principal detoxificante de peróxido de hidrógeno presente en células eucariotas.

4.- Cpc2 regula la transición G₂/M del ciclo celular reduciendo los niveles de la quinasa Wee1 (responsable del bloqueo en la entrada en mitosis por fosforilación e inhibición de Cdc2), y estimulando la síntesis de Cdr2, uno de los principales inhibidores de la actividad de Wee1.

5.- La asociación *in vivo* de Cpc2 a la subunidad 40S del ribosoma es crítica para su función como regulador de la respuesta a estrés y el control del ciclo celular en *S. pombe*.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abram, C.L. y Courtneidge, S.A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res.* 254(1):1-13.

Aligue, R., Wu, L. y Russell, P. (1997). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Wee1 tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 272(20):13320-5.

Amon, A., Irrniger, S. y Nasmyth, K. (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell.* 77(7):1037-50.

Aoyama, K., Aiba, H. y Mizuno T. (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(10):2347-52.

Arellano, M., Duran, A. y Perez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* Rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 110 (Pt 20):2547-55.

Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H. y Takekawa, M. (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol.* 10(11):1324-32.

Asp, E., Nilsson, D. y Sunnerhagen, P. (2008). Fission yeast mitogen-activated protein kinase Sty1 interacts with translation factors. *Eukaryot Cell.* 7(2):328-38.

B

Bähler, J. y Nurse, P. (2001). Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *EMBO J.* 20(5):1064-73.

Bähler, J. y Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* 12(9):1356-70.

Baum, S., Bittins, M., Frey, S. y Seedorf, M. (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J.* 380(Pt 3):823-30.

Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto M. y Cansado J. (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal.* 20(4):748-57.

Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S. y Snyder, M. (1999). Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev.* 13(2):176-87.

Battaini, F., Elkabes, S., Bergamaschi, S., Ladisa, V., Lucchi, L., De Graan, P.N., Schuurman, T., Wetsel, W.C., Trabucchi, M. y Govoni, S. (1995). Protein kinase C activity, translocation, and conventional isoforms in aging rat brain. *Neurobiol Aging.* 16(2):137-48.

Baum, S., Bittins, M., Frey, S. y Seedorf, M. (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J.* 380(Pt 3):823-30.

Benko, Z., Sipiczki, M. y Carr, A.M. (1998). Cloning of *caf1+*, *caf2+* and *caf4+* from *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in multidrug resistance, UV and pH sensitivity. *Mol Gen Genet.* 260(5):434-43.

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

Berns, H., Humar, R., Hengerer, B., Kiefer, F.N. y Battegay, E.J. (2000). RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas. *FASEB J.* 14(15):2549-58.

Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A. y Sunnerhagen, P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol.* 53(6):1743-56.

Blanco, M.A., Sánchez-Díaz, A., de Prada, J.M. y Moreno, S. (2000). APC^{ste9/svcl} promotes degradation of mitotic cyclins in G₁ and is inhibited by Cdc2 phosphorylation. *EMBO J.* 19(15):3945-55.

Boddy, M.N., Furnari, B., Mondesert, O. y Russell, P. (1998). Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science*. 280(5365):909-12.

Bone, N., Millar, J.B., Toda T, y Armstrong, J. (1998). Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol*. 8(3):135-44.

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

Breeding, C.S., Hudson, J., Balasubramanian, M.K., Hemmingsen, S.M., Young, P.G. y Gould, K.L. (1998). The *cdr2⁺* gene encodes a regulator of G₂/M progression and cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. 9(12):3399-415.

Buck, V., Quinn, J., Soto Pino T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B.A. y Millar, J.B. (2001). Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Biol Cell*. 12(2):407-19.

Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basur, V., Potapova, .O, Appella, E., Fornace, A.J. Jr. (2001). Initiation of a G₂/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*. 411(6833):102-7.

Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody an radioiodinated protein. *Anal Biochem*. 112:195-203.

C

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. 257(13):7847-51.

Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S. y Young, R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 12(2):323-37.

Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhäuser, N., Marchisio, P.C. y Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature*. 426(6966):579-84.

Chang, B.Y., Conroy, K.B., Machleder, E.M. y Cartwright, C.A. (1998). RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*. 18(6):3245-56.

Chantrel, Y., Gaisne, M., Lions, C. y Verdière, J. (1998). The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. *Genetics*. 149(2):559-69.

Chasse, S.A., Flanary, P., Parnell, S.C., Hao, N., Cha, J.Y., Siderovski, D.P. y Dohlman, H.G. (2006). Genome-scale analysis reveals Sst2 as the principal regulator of mating pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 5(2):330-46.

Chen, J.G., Ullah, H., Temple, B., Liang, J., Guo, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. y Jones, A.M. (2006). RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*. 57(11):2697-708.

Chen, M.S., Hurov, J., White, L.S., Woodford-Thomas, T. y Piwnicka-Worms, H. (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol Cell Biol*. 21(12):3853-61.

Chen, G. y Courey, A.J. (2000). Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene*. 249(1-2):1-16.

Cherel, I. y Thuriaux, P. (1995). The IFH1 gene product interacts with a fork head protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 11(3):261-70.

Chuang, R.Y., Weaver, P.L., Liu, Z. y Chang, T.H. (1997). Requirement of the DEAD-Box protein Ded1p for messenger RNA translation. *Science*. 275(5305):1468-71.

Coleman, T.R., Tang, Z. y Dunphy, W.G. (1993). Negative regulation of the *wee1* protein kinase by direct action of the *nim1/cdr1* mitotic inducer. *Cell*. 72(6):919-29.

Cook, J.G., Bardwell, L. y Thorner, J. (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature*. 390(6655):85-8.

Correa-Bordes, J., Gulli, M.P. y Nurse, P. (1997). p25^{um1} promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56^{cdc13} during G1 of the fission yeast cell cycle. *EMBO J.* 16(15):4657-64.

Correa-Bordes, J. y Nurse, P. (1995). p25^{um1} orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34^{cdc2} mitotic kinase. *Cell*. 83(6):1001-9.

Cottarel, G. (1997). Mcs4, a two-component system response regulator homologue, regulates the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle control. *Genetics*. 147(3):1043-51.

Cox, E.A., Bennin, D., Doan, A.T., O'Toole, T. y Huttenlocher, A. (2003). RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell*. 14(2):658-69.

Coxon, A., Maundrell, K. y Kearsey, S.E. (1992). Fission yeast *cdc21⁺* belongs to a family of proteins involved in an early step of chromosome replication. *Nucleic Acids Res.* 20(21):5571-7.

Coyle, S.M., Gilbert, W.V. y Doudna, J.A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome *in vivo*. *Mol Cell Biol*. 29(6):1626-34

D

Davis, R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103(2):239-52.

De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. y Kim, S.H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 363(6430):595-602.

De la Cruz, J., Iost, I., Kressler, D. y Linder, P. (1997). The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(10):5201-6.

Degols, G. y Russell, P. (1997). Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*. 17(6):3356-63.

Degols, G., Shiozaki, K. y Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*. 16(6):2870-7.

Dever, T.E., Feng, L., Wek, R.C., Cigan, A.M., Donahue, T.F. y Hinnebusch, A.G. (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell*. 68(3):585-96.

Donzelli, M. y Draetta, G.F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* 4(7):671-7.

Dunand-Sauthier, I., Walker, C.A., Narasimhan, J., Pearce, A.K., Wek, R.C. y Humphrey, T.C. (2005). Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryot Cell*. 4(11):1785-93.

E

Edwards, R.J., Bentley, N.J. y Carr, A.M. (1999). A Rad3-Rad26 complex responds to DNA damage independently of other checkpoint proteins. *Nat Cell Biol*. 1(7):393-8.

F

Fantes, P. (1979). Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature*. 279(5712):428-30.

Fantes, P.A. (1981). Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method: characterization of mutants and implications for division control mechanisms. *J Bacteriol*. 146(2):746-54.

Faraonio, R., Vergara, P., Marzo, D.D., Napolitano, M., Russo, T. y Cimino, F. (2006). Transcription regulation in NIH3T3 cell clones resistant to diethylmaleate-induced oxidative stress and apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. 8(3-4):365-74.

Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J. y Piwnica-Worms, H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol Cell Biol.* 25(7):2853-60.

Fisher, D.L. y Nurse, P. (1996). A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J.* 15(4):850-60.

Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H. y Russell, P. (1999). Cdc25 inhibited *in vivo* and *in vitro* by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell.* 10(4):833-45.

Furnari, B., Rhind, N. y Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by Chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science.* 277(5331):1495-7.

G

Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K. y Russell P. (1998). Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev.* 12(10):1464-73.

Gao, W., Mizukawa, Y., Nakatsu, N., Minowa, Y., Yamada, H., Ohno, Y. y Urushidani, T. (2010). Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione depletion-related hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* Epub ahead of print.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. y Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 11(12):4241-57.

George, V.T., Brooks, G. y Humphrey, T.C. (2007). Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 18(10):4168-79.

Gerbasi, V.R., Weaver, C.M., Hill, S., Friedman, D.B. y Linkm A.J. (2004). Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol.* 24(18):8276-87.

Grallert, B., Kearsey, S.E., Lenhard, M., Carlson, C.R., Nurse, P., Boye, E. y Labib, K. (2000). A fission yeast general translation factor reveals links between protein synthesis and cell cycle controls. *J Cell Sci.* 113 (Pt 8):1447-58.

Goldar, M.M., Jeong, H.T., Tanaka, K., Matsuda, H. y Kawamukai, M. (2005). Mcc3, a novel Zn finger type protein involved in sexual development, ascus formation, and stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* 48(6):345-55.

Goldar, M.M., Nishie, T., Ishikura, Y., Fukuda, T., Takegawa, K. y Kawamukai, M. (2005). Functional conservation between fission yeast *mcc1/sds23* and its two orthologs, budding yeast SDS23 and SDS24, and phenotypic differences in their disruptants. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(7):1422-6.

Gould, K.L. y Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2⁺* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature.* 342(6245):39-45.

Guo, J. y Chen, J.G. (2008). RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 8:108.

H

Hagan, I.M. y Hyams, J.S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 89 (Pt 3), 343-57.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4):557-80.

Harvey, S.L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S.P. y Kellogg, D.R. (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell.* 122(3):407-20.

Heckman, D., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L. y Hedges, S.B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293, 1129-33.

Hermanto, U., Zong, C.S., Li, W. y Wang, L.H. (2002). RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol.* 22(7):2345-65.

Herruer, M.H., Mager, W.H., Woudt, L.P., Nieuwint, R.T., Wassenaar, G.M., Groeneveld, P., Planta, R.J. (1987). Transcriptional control of yeast ribosomal protein synthesis during carbon-source upshift. *Nucleic Acids Res.* 15(24):10133-44.

Higuchi, R., Krummel, B. y Saiki, R.K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16(15):7351-67.

Hill, C.S. y Treisman, R. (1985). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* 80(2):199-211.

Hoffman, C.S. (2005). Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 1):257-60.

Hoffmann, B., Mösch, H.U., Sattlegger, E., Barthelmess, I.B., Hinnebusch, A. y Braus, G.H. (1999). The WD protein Cpc2p is required for repression of Gcn4 protein activity in yeast in the absence of amino-acid starvation. *Mol Microbiol.* 31(3):807-22.

Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E. y Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* 12(1):63-69.

Huang, F.L., Young, W.S. 3rd, Yoshida, Y. y Huang, K.P. (1990). Developmental expression of protein kinase C isozymes in rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* 52(1-2):121-30.

I

Iino, Y. y Yamamoto, M. (1985). Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(8):2447-51.

Inada, T., Winstall, E., Tarun, S.Z. Jr., Yates, J.R. 3rd, Schieltz, D. y Sachs, A.B. (2002). One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA.* 8(7):948-58.

Izumi, T. y Maller, J.L. (1993). Elimination of Cdc2 phosphorylation sites in the Cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell.* 4(12):1337-50.

J

James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schüssler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkman-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lücking, R., Büdel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. y Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature.* 443(7113):818-22.

Jeong, H.T., Oowatari, Y., Abe, M., Tanaka, K., Matsuda, H. y Kawamukai, M. (2004). Interaction between a negative regulator (Msa2/Nrd1) and a positive regulator (Cpc2) of sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68(7):1621-6.

Jung, U.S. y Levin, D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol.* 34(5):1049-57.

K

Kadmas, J.L., Smith, M.A., Pronovost, S.M. y Beckerle, M.C. (2007). Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. *Dev Dyn.* 236(8):2207-15.

Kadura, S. y Sazer, S. (2005). SAC-ing mitotic errors: how the spindle assembly checkpoint (SAC) plays defense against chromosome mis-segregation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 61(3):145-60.

Kanoh, J. y Russell, P. (1998). The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 9(12):3321-34.

Karin, M. y Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*. 5(7):747-57.

Karlsson-Rosenthal, C. y Millar, J.B. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol*. 16(6):285-92.

Kato, T. Jr., Okazaki, K., Murakami, H., Stettler, S., Fantes, P.A y Okayama, H. (1996). Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett*. 378(3):207-12.

Kawamukai, M. (1999). Isolation of a novel gene, *moc2⁺*, encoding a putative RNA helicase as a suppressor of sterile strains in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta*. 1446(1-2):93-101.

Kearsey, S.E., Montgomery, S., Labib, K. y Lindner, K. (2000). Chromatin binding of the fission yeast replication factor Mcm4 occurs during anaphase and requires ORC and Cdc18. *EMBO J*. 19(7):1681-90.

Kelly, T.J., Martín, G.S., Forsburg, S.L., Stephen, R.J., Russo, A. Nurse, P. (1993). The fission yeast *cdc18⁺* gene product couples S-phase to start and mitosis. *Cell*. 74:371-382.

Kellogg, D.R. (2003). Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci*. 116(Pt 24):4883-90.

Kief, D.R. y Warner, J.R. (1981). Hierarchy of elements regulating synthesis of ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1(11):1016-23.

Kitamura, K., Maekawa, H. y Shimoda, C. (1998). Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G1-phase. *Mol Biol Cell*. 9(5):1065-80.

Kleinschmidt, M., Schulz, R. y Braus, G.H. (2006). The yeast CPC2/ASC1 gene is regulated by the transcription factors Fhl1p and lfh1p. *Curr Genet*. 49(4):218-28.

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

Korchak, H.M. y Kilpatrick, L.E. (2001). Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells. *J Biol Chem*. 276(12):8910-7.

Kovelman, R. y Russell, P. (1996). Stockpiling of Cdc25 during a DNA replication checkpoint arrest in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*. 16(1):86-93.

Kristjánisdóttir, K. y Rudolph, J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol*. 11(8):1043-51.

Kumagai, A. y Dunphy, W.G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science*. 273(5280):1377-80.

Kwon, H.J., Bae, S., Son, Y.H. y Chung, H.M. (2001). Expression of the *Xenopus* homologue of the receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) in the *Xenopus* embryo. *Dev Genes Evol*. 211(4):195-7.

L

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-85.

Lawrence, C.L., Maekawa, H., Worthington, J.L., Reiter, W., Wilkinson, C.R., Jones, N. (2007). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *J Biol Chem*. 282(8):5160-70.

Lee, K.S., Asano, S., Park, J.E., Sakehaisri, K. y Erikson, R.L. (2005). Monitoring the cell cycle by multi-kinase-dependent regulation of Swe1/Wee1 in budding yeast. *Cell Cycle*. 4(10):1346-9.

Lee, M.G. y Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*. 327(6117):31-5.

Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., Zeitlinger, J., Jennings, E.G., Murray, H.L., Gordon, D.B., Ren, B., Wyrick, J.J., Tagne, J.B., Volkert, T.L., Fraenkel, E., Gifford, D.K. y Young, R.A. (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 298(5594):799-804.

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

Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(2):262-91.

Liliental, J. y Chang, D.D. (1999). Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem.* 273(4):2379-83.

Lincoln, A.J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R.M., Palko, M.E., De Miguel, M.P., Tessarollo, L. y Donovan, P.J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet.* 30(4):446-9.

Lindsay, H.D., Griffiths, D.J., Edwards, R.J., Christensen, P.U., Murray, J.M., Osman, F., Walworth, N. y Carr, A.M. (1998). S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 12(3):382-95.

Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M. y Yates, J.R. 3rd. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 17(7):676-82.

Loewith, R., Hubberstey, A. y Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the Mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 113 (Pt 1):153-60.

Longtine, M.S., Theesfeld, C.L., McMillan, J.N., Weaver, E., Pringle, J.R. y Lew, D.J. (2000). Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 20(11):4049-61.

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

López-Avilés, S., Lambea, E., Moldón, A., Grande, M., Fajardo, A., Rodríguez-Gabriel, M.A., Hidalgo, E. y Aligue, R. (2008). Activation of Srk1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Mol Biol Cell.* 19(4):1670-9.

López-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L.H., Ronai, Z. (2005). RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C. *Mol Cell.* 19(3):309-20.

López-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. y Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature.* 397(6715):172-5.

Lopez-Girona, A., Kanoh, J. y Russell, P. (2001). Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Curr Biol.* 11(1):50-4.

Lowndes, N.F., Melnery, C.J., Johnson, A.L., Fantes, P.A. y Johnston, L.H. (1992). Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene *cdc10⁺*. *Nature.* 355(6359):449-53.

Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. y Beach, D. (1991). Mik1 and Wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of Cdc2. *Cell.* 64(6):1111-22

M

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

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

Madrid, M., Núñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2007). Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol Biol Cell.* 18(11):4405-19.

- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., Gaeto, M. y Cansado, J.** (2004). A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 279(40):41594-602.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gaeto, M. y Cansado, J.** (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 281(4):2033-43.
- Mamidipudi, V., Chang, B.Y., Harte, R.A., Lee, K.C. y Cartwright, C.A.** (2004). RACK1 inhibits the serum- and anchorage-independent growth of v-Src transformed cells. *FEBS Lett.* 567(2-3):321-6.
- Manke, J.A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M.Q., Elia, A.E. y Yaffe, M.B.** (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G₂/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell.* 17(1):37-48.
- Marshall, C.J.** (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80(2):179-85.
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M.A., de Prada, J.M. y Moreno, S.** (2000). The puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol Biol Cell.* (2):543-54.
- Martin-Castellanos, C., Labib, K. y Moreno, S.** (1996). B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25^{umt1} cdk inhibitor. *EMBO J.* 15(4):839-49.
- Martin, S.G. y Berthelot-Grosjean, M.** (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature.* 459(7248):852-6.
- Martín, V., Rodríguez-Gabriel, M.A., McDonald, W.H., Watt, S., Yates, J.R. 3rd, Bähler, J. y Russell, P.** (2006). Cip1 and Cip2 are novel RNA-recognition-motif proteins that counteract Csx1 function during oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 17(3):1176-83.
- Matsusaka, T. y Pines, J.** (2004). Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol.* 166(4):507-16.
- Mattison, C.P. y Ota, I.M.** (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev.* 14(10):1229-35.
- Mattison, C.P., Spencer, S.S., Kresge, K.A., Lee, J. y Ota, I.M.** (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol.* 19(11):7651-60.
- Maundrell, K.** (1990). nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem.* 265(19):10857-10864.
- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D. y Yarwood, S.J.** (2002). The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol.* 62(6):1261-73.
- McGowan, C.H. y Russell, P.** (1995). Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* 14(10):2166-75.
- McLeod, M., Shor, B., Caporaso, A., Wang, W., Chen, H. y Hu, L.** (2000). Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase to regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol Cell Biol.* 20(11):4016-27.
- McMillan, J.N., Sia, R.A., Bardes, E.S. y Lew, D.J.** (1999). Phosphorylation-independent inhibition of Cdc28p by the tyrosine kinase Swe1p in the morphogenesis checkpoint. *Mol Cell Biol.* 19(9):5981-90.
- McMillan, J.N., Theesfeld, C.L., Harrison, J.C., Bardes, E.S. y Lew, D.J.** (2002). Determinants of Swe1p degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 13(10):3560-75.
- Mikhailov, A., Shinohara, M. y Rieder, C.L.** (2005). The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephasis and entry into mitosis. *Cell Cycle.* 4(1):57-62.
- Millar, J.B., Buck, V. y Wilkinson, M.G.** (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* 9(17):2117-30.

Millar, J., McGowan, C., Jones, R., Sadhu, K., Bueno, A., Richardson, H. y Russell, P. (1991). Cdc25 M-phase inducer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 56:577-84.

Miller, R.C. (1972). Assymmetric annealing of an RNA linked DNA molecule isolated during the initiation of bacteriophage T7 DNA replication. *Biochem Biophys Res Commun.* 49:1082-1086.

Mitchison, J. (1970) *Methods in Cell Physiology. Academic Press.* 4: 131-165.

Mochida, S., Esashi, F., Aono, N., Tamai, K., O'Connell, M.J. y Yanagida, M. (2004). Regulation of checkpoint kinases through dynamic interaction with Crb2. *EMBO J.* 23(2):418-28.

Mochly-Rosen, D., Khaner, H. y Lopez, J. (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(9):3997-4000.

Moreno, S., Klar, A. y Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol.* 194:795-823.

Moreno, S., Labib, K., Correa, J. y Nurse, P. (1994). Regulation of the cell cycle timing of Start in fission yeast by the *rum1⁺* gene. *J Cell Sci Suppl.* 18:63-8.

Moreno, S. y Nurse, P. (1994). Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1⁺* gene. *Nature.* 367(6460):236-42.

Morgan, D. O (2007). *The cell cycle. Principles of control. New Science Press. Oxford University Press, U.K.*

Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M. y Shiozaki, K. (2008). Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol Cell.* 30(1):108-13.

Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A. y Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature.* 459(7248):857-60.

Mueller, P.R., Coleman, T.R. y Dunphy, W.G. (1995). Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell.* 6(1):119-34.

N

Nakano, K., Arai, R. y Mabuchi, I. (1997). The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells.* 2(11):879-94.

Nakano, K., Mutoh, T. y Mabuchi, I. (2001). Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells.* 6(12):1031-42.

Nakashima, A., Chen, L., Thao, N.P., Fujiwara, M., Wong, H.L., Kuwano, M., Umemura, .K, Shirasu, K., Kawasaki, T. y Shimamoto, K. (2008). RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell.* 20(8):2265-79.

Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G. y Marton, M.J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol.* 21(13):4347-68.

Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. y Smith, T.F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature.* 371(6495):297-300.

Nguyen, A.N. y Shiozaki, K. (1999). Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev.* 13(13):1653-63.

Nguyen, A.N., Lee, A., Place, W. y Shiozaki, K. (2000). Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol Biol Cell.* 11(4):1169-81.

Nigg, E.A. (1993). Cellular substrates of p34^{cdc2} and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol.* (9):296-301.

Norbury, C. y Nurse, P. (1990). Controls of cell proliferation in yeast and animals. *Ciba Found Symp.* 150:168-77

Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature.* 256(5518):547-51.

Nurse, P. (1985). Mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* which alter the shift between cell proliferation and sporulation. *Mol Gen Genet.* 198:497-502.

Nurse, P. y Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* 96(3):627-37

Nurse, P., Thuriaux, P. y Nasmyth, K. (1978). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet.* 146(2):167-78.

O

O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M. y Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G₂ DNA damage checkpoint inhibiting Cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* 16(3):645-64.

O'Connell, M.J., Walworth, N.C. y Carr, A.M. (2000). The G₂-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol.* 10(7):296-303.

P

Paul, S.K., Oowatari, Y. y Kawamukai, M. (2009). A large complex mediated by Moc1, Moc2 and Cpc2 regulates sexual differentiation in fission yeast. *FEBS J.* 276(18):5076-93.

Paredes, V., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M y Cansado, J. (2003). Different roles for the stress-activated protein kinase pathway in the regulation of trehalose metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology.* 149(Pt 7):1745-52.

Paredes, V., Franco, A., Madrid, M., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2004). Transcriptional and post-translational regulation of neutral trehalase in *Schizosaccharomyces pombe* during thermal stress. *Yeast.* 21(7):593-603.

Parker, L.L., Walter, S.A., Young, P.G. y Piwnicka-Worms, H. (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the *nim1/cdr1* kinase. *Nature.* 363(6431):736-8.

Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J. y Karnitz, L. (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst).* 3(8-9):1009-14.

Pascale, A., Fortino, I., Govoni, S., Trabucchi, M., Wetsel, W.C. y Battaini, F. (1996). Functional impairment in protein kinase C by RACK1 (receptor for activated C kinase 1) deficiency in aged rat brain cortex. *J Neurochem.* 67(6):2471-7.

Petersen, J. y Hagan, I.M. (2003). *S. pombe* aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Curr Biol.* 13(7):690-7.

Petersen, J. y Hagan, I.M. (2005). Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature.* 435(7041):607-12.

Q

Quinn, J., Findlay, V.J., Dawson, K., Millar, J.B., Jones, N., Morgan, B.A. y Toone, W.M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 13(3):805-16.

R

Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B. y Levin, D.E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19(6):3969-76.

Reiter, W., Watt, S., Dawson, K., Lawrence, C.L., Bähler, J., Jones, N. y Wilkinson, C.R. (2008). Fission yeast MAP kinase Sty1 is recruited to stress-induced genes. *J Biol Chem.* (15):9945-56.

Rhind, N. y Russell, P. (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *J Cell Sci.* 113 (Pt 22):3889-96.

Rodríguez-Gabriel, M.A., Burns, G., McDonald, W.H., Martín, V., Yates, J.R. 3rd, Bähler, J. y Russell, P. (2003). RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *EMBO J.* 22(23):6256-66.

Rodríguez-Gabriel, M.A., Watt, S., Bähler, J. y Russell, P. (2006). Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast. *Mol Cell Biol.* 26(17):6347-56.

Rodríguez-Gabriel, M.A. y Russell, P. (2005). Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* 4(8):1396-402.

Rodríguez, M.M., Ron, D., Touhara, K., Chen, C.H. y Mochly-Rosen, D. (1999). RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains *in vitro*. *Biochemistry.* 38(42):13787-94.

Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. y Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(3):839-43.

Ron, D., Jiang, Z., Yao, L., Vagts, A., Diamond, I. y Gordon, A. (1999). Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIIPKC. *J Biol Chem.* 274(38):27039-46.

Rupes, I. (2002). Checking cell size in yeast. *Trends Genet.* 18(9):479-85.

Russell, P. y Nurse, P. (1988). *cdc25⁺* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell.* 45(1):145-53.

Russell, P. y Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1⁺*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell.* 49(4):559-67.

Russell, P. y Nurse, P. (1987). The mitotic inducer *nim1⁺* functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell.* 49(4): 569-76.

S

Sakchaisri, K., Asano, S., Yu, L.R., Shulewitz, M.J., Park, C.J., Park, J.E., Cho, Y.W., Veenstra, T.D., Thorner, J. y Lee, K.S. (2004). Coupling morphogenesis to mitotic entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(12):4124-9.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1998). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* Cold Spring Harbor, N.Y.

Samejima, I., Mackie, S., Warbrick, E., Weisman, R., Fantes, P.A. (1998). The fission yeast mitotic regulator *win1⁺* encodes an MAP kinase kinase kinase that phosphorylates and activates Wis1 MAP kinase kinase in response to high osmolarity. *Mol Biol Cell.* 9(8):2325-35.

Samejima, I., Mackie, S. y Fantes P.A. (1997). Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J.* 16(20):6162-70.

Sánchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O. y Aligue, R. (2002). The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J Biol Chem.* 277(20):17722-7.

Sanguino, E., Roglans, N., Alegret, M., Sánchez, R.M., Vázquez-Carrera, M. y Laguna, J.C. (2004). Prevention of age-related changes in rat cortex transcription factor activator protein-1 by hypolipidemic drugs. *Biochem Pharmacol.* 68(7):1411-21.

Sansó, M., Gogol, M., Ayté, J., Seidel, C. y Hidalgo, E. (2008). Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryot Cell.* 7(5):826-35.

Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H. y Sugiura, R. (2009). Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 20(9):2473-85.

Sazer, S. y Sherwood, S.W. (1990). Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci.* 97(Pt 3):509-16.

Schüller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. y Ruis, H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* 13(18):4382-9.

Schaeffer, H.J. y Weber, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Biol Cell.* 19(4):2435-44.

Schechtman, D. y Mochly-Rosen, D. (2001). Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 20(44):6339-47.

Schloss, J.A. (1990). A *Chlamydomonas* gene encodes a G protein beta subunit-like polypeptide. *Mol Gen Genet.* 221(3):443-52.

Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B. y Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol.* 6(3):209-17.

Selcher, J.C., Weeber, E.J., Varga, A.W., Sweatt, J.D. y Swank, M. (2002). Protein kinase signal transduction cascades in mammalian associative conditioning. *Neuroscientist.* 8(2):122-31.

Sengar, A.S., Markley, N.A., Marini, N.J. y Young, D. (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 17(7):3508-19.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P. y Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol.* 11(10):957-62.

Shieh, J.C., Wilkinson, M.G., Buck, V., Morgan, B.A., Makino, K. y Millar, J.B. (1997). The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev.* 11(8):1008-22.

Shieh, J.C., Wilkinson, M.G. y Millar, J.B. (1998). The Win1 mitotic regulator is a component of the fission yeast stress-activated Sty1 MAPK pathway. *Mol Biol Cell.* 9(2):311-22.

Shiozaki, K. y Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature.* 378(6558):739-43.

Shiozaki, K. y Russell, P. (1995). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J.* 14(3):492-502.

Shiozaki, K. y Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* 10(18):2276-88.

Shiozaki, K. y Russell, P. (1997). Stress-activated protein kinase pathway in cell cycle control of fission yeast. *Methods Enzymol.* 283:506-20.

Shiozaki, K., Shiozaki, M., Russell, P. (1997). Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell.* 8(3):409-19.

Shiozaki, K., Shiozaki, M. y Russell, P. (1998). Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 9(6):1339-49.

Shor, B., Calaycay, J., Rushbrook, J. y McLeod, M. (2003). Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 278(49):49119-28.

Shulewitz, M.J., Inouye, C.J. y Thorner, J. (1999). Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19(10):7123-37.

Sia, R.A., Bardes, E.S. y Lew, D.J. (1998). Control of Swe1p degradation by the morphogenesis checkpoint. *EMBO J.* 17(22):6678-88.

Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* 1(2): reviews1011.1

Smith, D.A., Toone, W.M., Chen, D., Bähler, J., Jones, N., Morgan, B.A. y Quinn, J. (2002). The Srk1 protein kinase is a target for the Sty1 stress-activated MAPK in fission yeast. *J Biol Chem.* 277(36):33411-21.

Soto, T., Beltrán, F.F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J.B., Vicente-Soler, J., Cansado, J. y Gacto, M. (2002). Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem.* 269(20):6056-66.

Soto, T., Núñez, A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M. y Cansado J. (2007). Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology.* 153(Pt 5):1519-29.

Soto, T., Villar-Tajadura, M.A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P. y Cansado J. (2010). Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem.* 285(15):11516-25.

Sprang, S.R. (1997). G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* 7(6):849-56.

Sreenivasan, A. y Kellogg, D. (1999). The *elm1* kinase functions in a mitotic signaling network in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 19(12):7983-94.

Stern, B. y Nurse, P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* 12(9):345-50.

Stettler, S., Warbrick, E., Prochnik, S., Mackie, S. y Fantès, P. (1996). The *wis1* signal transduction pathway is required for expression of cAMP-repressed genes in fission yeast. *J Cell Sci.* 109 (Pt 7):1927-35.

Suda M., Yamada, S., Toda, T., Miyakawa, T. y Hirata, D. (2000). Regulation of Wee1 kinase in response to protein synthesis inhibition. *FEBS Lett.* 486(3):305-9.

Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S.O. y Kuno, T. (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature.* 424(6951):961-5.

Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H. y Kuno, T. (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature.* 399(6735):479-83.

Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M. y Kuno, T. (1998). *pmp1⁺*, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.* 17(1):140-8.

T

Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Kuno, T. y Sugiura, R. (2007). Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 18(12):4794-802.

Takada, H., Nishida, A., Domae, M., Kita, A., Yamano, Y., Uchida, A., Ishiwata, S., Fang, Y., Zhou, X., Masuko, T., Kinoshita, M., Kakehi, K. y Sugiura, R. (2010). The cell surface protein gene *ecm33⁺* is a target of the two transcription factors Atf1 and Mbx1 and negatively regulates Pmk1 MAPK cell integrity signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 21(4):674-85.

Takizawa, C.G. y Morgan, D.O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol.* 12(6):658-66.

Tang, Z., Coleman, T.R. y Dunphy, W.G. (1993). Two distinct mechanisms for negative regulation of the Wee1 protein kinase. *EMBO J.* 12(9):3427-36.

Tibbles, L.A. y Woodgett, J.R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci.* 55(10):1230-54.

Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. y Kuno, T. (1996). The fission yeast *pmp1⁺* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol.* 16(12):6752-64.

Toda, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J.* 12(5):1987-95.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:4350-54.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol.* 8(2):205-15.

Tsukahara, K., Yamamoto, H. y Okayama, H. (1998). An RNA binding protein negatively controlling differentiation in fission yeast. *Mol Cell Biol.* 18(9):4488-98.

Tvegård, T., Soltani, H., Skjølberg, H.C., Krohn, M., Nilssen, E.A., Kearsley, S.E., Grallert, B. y Boye E. (2007). A novel checkpoint mechanism regulating the G₁/S transition. *Genes Dev.* 21(6):649-54.

V

Valerius, O., Kleinschmidt, M., Rachfall, N., Schulze, F., López Marin, S., Hoppert, M., Streckfuss-Bömeke, K., Fischer, C. y Braus, G.H. (2007). The *Saccharomyces* homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11-dependent adhesive growth and dimorphism. *Mol Cell Proteomics.* 6(11):1968-79.

Vani, K., Yang, G. y Mohler, J. (1997). Isolation and cloning of a *Drosophila* homolog to the mammalian RACK1 gene, implicated in PKC-mediated signalling. *Biochim Biophys Acta.* 1358(1):67-71.

Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A. y Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25):13804-9.

Villar-Tajadura, M.A., Coll, P.M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B. y Pérez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol Microbiol.* 70(4):867-81.

Vivanco, A.P., Castillo, E.A., Jones, N., Ayté, J. y Hidalgo, E. (2004). Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol.* 52(5):1427-35.

Vivanco, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M. y Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Mol Genet Genomics.* 276(6):495-502.

W

Wang, X.J., Warren, B.S., Rupp, T., Beltrán, L.M. y DiGiovanni, J. (1994). Loss of mouse epidermal protein kinase C isozyme activities following treatment with phorbol ester and non-phorbol ester tumor promoters. *Carcinogenesis.* 15(12):2795-803.

Wanke, V., Accorsi, K., Porro, D., Esposito, F., Russo, T. y Vanoni, M. (1999). In budding yeast, reactive oxygen species induce both RAS-dependent and RAS-independent cell cycle-specific arrest. *Mol Microbiol.* 32(4):753-64.

Warbrick, E. y Fantes, P.A. (1991). The Wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 10(13):4291-9.

Watanabe, N., Broome, M. y Hunter, T. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* 14(9):1878-91.

Weinert, T.A. y Hartwell, L.H. (1988). The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 241(4863):317-22.

Wek, R.C., Jiang, H.Y. y Anthony, T.G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 1):7-11.

Whalen, S.G., Gingras, A.C., Amankwa, L., Mader, S., Branton, P.E., Aebersold, R. y Sonenberg, N. (1996). Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. *J Biol Chem.* 271(20):11831-7.

Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W.M., Shieh, J.C., Toda, T., Millar, J.B. y Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* 10(18):2289-301.

Wolfe, B.A. y Gould, K.L. (2004). Inactivating Cdc25, mitotic style. *Cell Cycle.* 3(5):601-3.

Wolfe, B.A., McDonald, W.H., Yates, J.R. 3rd y Gould, K.L. (2006). Phospho-regulation of the Cdc14/Clp1 phosphatase delays late mitotic events in *S. pombe*. *Dev Cell.* 11(3):423-30.

Won, M., Park, S.K., Hoe, K.L., Jang, Y.J., Chung, K.S., Kim, D.U., Kim, H.B. y Yoo, H.S. (2001) Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homolog, is involved in actin cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 282(1):10-5.

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

Wu, L., Shiozaki, K., Aligue, R. y Russell, P. (1996). Spatial organization of the Nim1-Wee1-Cdc2 mitotic control network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. 7(11):1749-58.

Wu, L. y Russell, P. (1993). Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature*. 363(6431):738-41.

Y

Yang, W., Tabancay, A.P. Jr., Urano, J. y Tamanoi, F. (2001). Failure to farnesylate Rheb protein contributes to the enrichment of G0/G1 phase cells in the *Schizosaccharomyces pombe* farnesyltransferase mutant. *Mol Microbiol*. 41(6):1339-47.

Yang, W., Urano, J. y Tamanoi F. (2000). Protein farnesylation is critical for maintaining normal cell morphology and canavanine resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 275(1):429-38.

Yamada, K., Nakagawa, C.W. y Mutoh, N. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant. *Yeast*. 15(11):1125-32.

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

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

Z

Zaitsevskaya-Carter, T. y Cooper, J.A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J*. 16(6):1318-31.

Zeller, C.E., Parnell, S.C. y Dohlman, H.G. (2007). The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem*. 282(34):25168-76.

Zhan, K., Vattem, K.M., Bauer, B.N., Dever, T.E., Chen, J.J. y Wek, R.C. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *J Biol Chem*. 277(10):7134-46.

Zhan, X.L., Deschenes, R.J. y Guan, K.L. (1997). Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 11(13):1690-702.

