UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Papel de Ksg1 y el ortólogo de PKC Pck2 sobre la regulación de la ruta de integridad celular en *Schizosaccharomyces pombe*

D. Rafael Jiménez Nicolás

2016

“Papel de Ksg1 y el ortólogo de PKC Pck2 sobre la regulación de la ruta de integridad 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 **Rafael Jiménez Nicolás**

2016

ABREVIATURAS

AA: Aminoácido

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMPK: "AMP-activated protein kinase" o Proteín quinasa activada por AMP.

ARN: Ácido Ribonucleico

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

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

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

CIP: Ruta de MAP quinasas de integridad celular

DAG: diacilglicerol

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNTP: Deoxirribonucleótidos trifosfato

DO: Densidad Óptica en nm

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

DTT: Ditiotreitol

EDTA: "*EtilenDiaminTetracetic Ácid*" o Ácido etilendiaminotetraacético

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

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

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

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

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

GST: Glutatión S-transferasa

GTP: Guanosina 5'-trifosfato

GTPasa: Trifosfatasa de guanosina

HA: Epítopo de hemaglutinina del virus de la gripe humana

HA6H: Epítopo de hemaglutinina seguido de 6 histidinas consecutivas

HEPES: Ácido N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-(2-etanolsulfónico)

HK: Histidín quinasa

HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase)

Kb: Kilobases de DNA o 1000 pb

Kd: 1000 Dalton

MAPK: MAP quinasa

MAPKK (MEK): MAP quinasa quinasa

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

MAP-quinasa: Quinasa activada por mitógenos

Mb: Megabases en una secuencia de DNA

MIN: Minutos

MKP: Fosfatasa de MAP quinasa

mTOR: "*mammalian target of rapamycin*" o Diana de rapamicina en células de mamífero

MP: Membrana plasmática

NETO: "*New End Take Off*"

NP-40: Nonidet P-40

OE.: Sobreexpresión de un gen (OverExpresion)

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

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

Pb: Pares de bases en una secuencia de DNA

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

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

PC: Pared celular

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

PDK: Quinasa dependiente de fosfoinosítidos

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

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

PPasa: Fosfatasa

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

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

r.p.m: Revoluciones por minuto

RACK: *"Receptor for Active C protein Kinase"* o Receptor para protein quinasa C activa

RE: Retículo endoplasmático

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

SD*: "Standart Desviation"* o Desviación Estándar

SDS: "*Sodium Docecil Sulphate*" o Dodecil sulfato de sodio

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

SPB: "*Spindle Pole Body*" o Cuerpo polar del huso

TAE: Tampón de Tris, ácido Acético y EDTA

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

TE: Tris-EDTA

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

TOR: "*target of rapamycin*" o Diana de rapamicina

Tris: Tris-(hidroximetil)-amino-metano

U.R: Unidades relativas

V: Voltios

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

WT: "*Wild Type"* o Estirpe Silvestre

w/v: peso/volumen

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

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características Generales de *Schizosaccharomyces pombe*..... 1

1.1.1 Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe* 2

1.2 La Proteína Quinasa Dependiente de Fosfoinosítidos..... 4

1.2.1 La proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK-1) en organismos superiores 4

1.2.2 La proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos en levaduras modelo..... 7

1.2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* 7

1.2.2.2 *Schizosaccharomyces pombe*..... 7

1.3 Las Proteínas Quinasas C 8

1.3.1 Proteínas quinasas C (PKCs) en organismos superiores 8

1.3.1.1 Isoenzimas de la PKC..... 8

1.3.1.2 Localización de las PKCs..... 9

1.3.1.3 Estructura de las PKCs 10

1.3.1.3.1 Dominio pseudosustrato (PS) 10

1.3.1.3.2 Dominio C1 11

1.3.1.3.3 Dominio C2 12

1.3.1.3.4 Región V3..... 12

1.3.1.3.5 Dominio catalítico 12

1.3.1.3 Regulación de la PKC 13

1.3.1.3.1 Regulación por fosforilación 14

1.3.1.3.2 Regulación por cofactores 17

1.3.1.3.3 Regulación por unión a proteínas de anclaje..... 18

1.3.1.3.4 Regulación por desfosforilación..... 19

1.3.1.3.5 Regulación por proteólisis..... 19

1.3.1.3 Maduración de la PKC 20

1.3.1.4 La PKC como proteína de anclaje ("Scaffold protein") 22

1.3.1.5 Proteína quinasas asociadas a Rho ("PKC-Related Kinases o PRKs") 22

1.3.2 Proteínas quinasas C en levaduras modelo 23

1.3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* 23

1.3.2.2 *Schizosaccharomyces pombe* 24

1.4 La Ruta de Señalización Dependiente de la Proteína Quinasa TOR 25

1.4.1 TOR en organismos superiores 26

1.4.1.1 Características generales 26

1.4.1.1.1 TORC1 26

1.4.1.1.2 TORC2 27

1.4.1.2 mTOR y la regulación de la síntesis de proteínas 28

1.4.2 TOR en levaduras modelo 30

1.4.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* 30

1.4.2.1.1 TORC1 30

1.4.2.1.2 TORC2 31

1.4.2.2 *Schizosaccharomyces pombe* 32

1.4.2.2.1 TORC1 32

1.4.2.2.2 TORC2 33

1.5 Biosíntesis de Pared Celular en *S. pombe* 34

1.5.1 Composición de la pared celular 35

1.5.2 Síntesis del α y β-glucano 35

1.6 Las Rutas de MAP Quinasas 37

1.6.1 Organización de las rutas de MAP quinasas 37

1.6.1.1 Sensores 37

1.6.1.2 Módulo de MAP Quinasas 37

1.6.1.3 Efectores de MAP Quinasas 38

1.6.1.4 Reguladores de MAP Quinasas 38

1.6.2 Conservación evolutiva 39

1.6.3 Ruta de MAPKs de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe* 39

1.6.3.1 Sensores 41

1.6.3.2 Regulador de respuesta Mcs4 41

1.6.3.3 Módulo de MAP quinasas 41

1.6.3.3.1 MAPKK quinasa Wak1 y Win1 41

1.6.3.3.2 MAPK quinasa Wis1 42

1.6.3.3.3 MAP quinasa Sty1 42

1.6.3.3.4 Efectores de la ruta SAPK 42

1.6.3.4 Reguladores negativos de la ruta SAPK 44

1.6.4 Ruta de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe* 44

1.6.4.1 Sensores 45

1.6.4.2 Reguladores aguas arriba de módulo de MAP quinasas 45

1.6.4.2.1 Las GTPasas Rho1 y Rho2 y los ortólogos a PKC Pck1 y Pck2 45

1.6.4.3 Módulo de MAP quinasas 47

1.6.4.3.1 MAPKK quinasa Mkh1 47

1.6.4.3.2 MAPK quinasa Pek1 48

1.6.4.3.3 MAP quinasa Pmk1 48

1.6.4.4 Efectores de la ruta de integridad celular 49

1.6.4.4.1 Proteínas de unión a ARN: Rnc1 y Nrd1 49

1.6.4.4.2 Factores de transcripción: Atf1 y Mbx1 50

1.6.4.4.3 Canal iónico: Cch1-Yam8 50

1.6.4.4.4 Proteínas reguladoras de ciclo celular: Clp1 51

1.6.4.5 Regulación negativa de la ruta de integridad celular 51

1.6.5 Interconexión ("*crosstalk*") entre las rutas de MAP quinasas de respuesta a estrés y de integridad celular en *S. pombe* 52

2. OBJETIVOS

Justificación y Objetivos 54

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos Utilizados 56

3.1.1 Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* 56

3.1.2 Cepas de *Escherichia coli* 58

3.2 Medios de Cultivo 58

3.2.1 Medios empleados para el crecimiento y selección de *E. coli* 58

3.2.2 Medios empleados para el crecimiento, selección y mantenimiento de *S. pombe*. 58

3.3 Condiciones de Cultivo de los Microorganismos, Estimación del Crecimiento y Recuento Celular 60

3.3.1 Condiciones de cultivo para el crecimiento de *E. coli* 60

3.3.2 Condiciones de cultivo para el crecimiento de *S. pombe* 60

3.3.3 Estimación del crecimiento y recuento celular 60

3.3.4 Ensayos de crecimiento en gota 61

3.4 Tratamientos de Estrés 61

3.5 Métodos Genéticos 62

3.5.1 Conjugación 62

3.5.2 Aislamiento de Ascosporas al Azar 62

3.6 Procedimientos Generales de Biología Molecular 62

3.6.1 Vectores utilizados y obtención de las construcciones plasmídicas empleadas 62

3.6.1.1 Vectores de *Escherichia coli* 62

3.6.1.2 Vectores de *Schizosaccharomyces pombe* 63

3.6.2 Obtención y manipulación de muestras de DNA 64

3.6.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* 64

3.6.2.2 Aislamiento de DNA genómico de *S. pombe* 65

3.6.2.3 Determinación de la concentración de DNA total 65

3.6.2.4 Digestión del DNA con enzimas de restricción 65

3.6.2.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa y purificación de DNA a partir de geles 65

3.6.2.6 Clonación de fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción 66

3.6.2.7 Reacción de amplificación de DNA (PCR) y mutagénesis dirigida por PCR 66

3.6.2.8 Secuenciación del DNA 68

3.6.3 Técnicas de transformación 68

3.6.3.1 Transformación de *E. coli* 68

3.6.3.2 Transformación de *S. pombe* 69

3.7 Marcaje y Fraccionamiento de los Polímeros de la Pared Celular 69

3.8 Análisis de Proteínas 70

3.8.1 Obtención de los extractos celulares y preparación de las muestras de proteína 70

3.8.2 Purificación de proteínas fusionadas a HA6H 71

3.8.3 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST en *E. coli* 71

3.8.4 Experimentos de interacción *in vitro* 72

3.8.5 Ensayos quinasa *in vitro* 72

3.8.6 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 73

3.8.7 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (*Western blot*) 73

3.8.7.1 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa 73

3.8.7.2 Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa 73

3.8.7.3 Análisis densitométrico 75

3.9 Técnicas Microscópicas 75

3.9.1 Microscopía de contraste de fases 75

3.9.2 Microscopía de fluorescencia 75

3.9.3 Tinción de calcoflúor 75

3.10 Análisis Bioinformático 75

4. RESULTADOS

4. 1 Ksg1 es un regulador positivo de la ruta MAPK de integridad celular en *Schizosaccharomyces pombe* 77

4.2 Ksg1 es un regulador positivo de la ruta de integridad celular en condiciones de estrés 78

4.3 Ksg1 no participa en la regulación de la ruta SAPK de *S. pombe* 81

4.4 Ksg1 es necesario para la transmisión de la señal de activación de Pmk1 dependiente de Rho2-Pck2 82

4.5 La actividad de Ksg1 es necesaria para la síntesis de glucano mediada por Pck2 84

4.6 Ksg1 interacciona con Pck1 y Pck2 *in vivo* 85

4.7 Ksg1 fosforila *in vitro* a Pck2 en el residuo T842 del bucle de activación 86

4.8 Ksg1 fosforila *in vivo* a Pck2 en el residuo conservado de treonina-842 del bucle de activación 90

4.9 Fosforilación *in vivo* del motivo de giro de Pck2 92

4.10 Significación funcional de la fosforilación del dominio de activación de Pck2 por Ksg1 93

4.11 La fosforilación del bucle de activación de Pck2 no es necesaria para el mantenimiento de los niveles basales de Pmk1 activo 95

4.12 Efecto de la fosforilación de Pck2 sobre la actividad basal de Pmk1 y la viabilidad celular en respuesta al daño en pared celular 97

4.13 La fosforilación de Pck2 en el residuo T842 del bucle de activación no es necesaria para la activación de Pmk1 en respuesta a estrés 98

4.14 La fosforilación simultánea de T842 y T984 en el dominio de activación de Pck2 es necesaria para la correcta activación de la ruta de integridad celular en respuesta a estrés 100

4.15 Los residuos T842 y T846 del bucle de activación de Pck2 son necesarios para su correcta activación y señalización hacia la ruta de integridad celular 102

4.16 Significación biológica de la fosforilación *in vivo* de Pck2 en T846 104

4.17 Los residuos fosforilables conservados del dominio de activación de Pck2 son esenciales para el mantenimiento de los niveles de proteína durante la respuesta a estrés 106

4.18 Las Rho GTPasas Rho1 y Rho2 junto con la fosforilación del bucle de activación de Pck2 son esenciales para el mantenimiento de los niveles de la quinasa en respuesta a estrés 108

4.19 La síntesis *de novo* de Pck2 es necesaria para la actividad basal de la ruta de integridad celular en *S. pombe* 109

4.20 El incremento en la síntesis *de novo* de Pck2 es necesario para la activación de la ruta de integridad celular en respuesta al daño en la pared celular 110

4.21 El complejo TORC2 regula la síntesis de novo de Pck2 durante el crecimiento vegetativo..... 112

4.22 Tor1 regula positivamente la síntesis *de novo* de Pck2 en respuesta al estrés por daño en la pared celular y por ayuno de glucosa 114

5. DISCUSIÓN

Discusión 118

6. CONCLUSIONES

Conclusiones 125

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía 128

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Imágenes de la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* obtenidas mediante diversas técnicas microscópicas 1

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de *Schizosaccharomyces pombe* 2

Figura 1.2. Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe* 3

Figura 1.3. Mecanismo de activación de PKB, S6K y SGK por PDK-1 6

Tabla 1.2. Clasificación de las isoformas de PKC, estructura y mecanismo de activación 9

Figura 1.4. Estructura de las isoformas de PKC en humanos 11

Figura 1.5. Alineación de las secuencias del bucle de activación de los dominios catalíticos de las distintas isoformas de PKC, PKN, PKB, PKA, S6K y RSK. 15

Figura 1.6. Alineación de las secuencias del motivo de giro e hidrofóbico del dominio catalítico de las distintas isoformas de PKC, PKN, PKB, PKA, S6K y RSK 17

Figura 1.7. Modelo de regulación de la PKC desde su biosíntesis a su degradación 21

Figura 1.8. Estructura de las isoformas de PKC en *S. pombe* y *S. cerevisiae* 23

Figura 1.9. Estructura de mTOR 25

Figura 1.10. Composición y función de los complejos mTORC1 y mTORC2 en mamíferos 27

Figura 1.11. Control de la capacidad y eficacia traduccional por mTORC1 28

Figura 1.12. Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. cerevisiae* 31

Figura 1.13. Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. pombe* 33

Figura 1.14. Ultraestructura y organización de la pared celular de *S. pombe* 35

Figura 1.15. Papel de Pck1 y Pck2 durante la biosíntesis del α y β-glucano de la pared celular en *S. pombe* 36

Figura 1.16. El módulo de MAP quinasas y la transmisión de señales 38

Figura 1.17. Conservación evolutiva de las rutas de MAP quinasas 40

Figura 1.18. La ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe* 43

Figura 1.19. La ruta de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe* 46

Figura 1.20. Regulación antagónica de la concentración de Ca^{2+} intracelular por parte de Pmk1 y Ppb1 51

Figura 1.21. Interconexión ("*crosstalk"*) entre las rutas de respuesta a estrés y de integridad celular en *S. pombe* 53

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe* empleadas en este trabajo 56-58

Tabla 3.2. Plásmidos empleados como molde de DNA en las reacciones de PCR 67

Tabla 3.3. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo 67-68

Tabla 3.4. Anticuerpos y condiciones de uso empleadas en este trabajo 74

RESULTADOS

Figura 4.1. Ksg1 es un regulador positivo de la ruta MAPK de integridad celular en *S. pombe* 78

Figura 4.2. Ksg1 es un regulador positivo de la ruta de integridad celular de *S. pombe* en respuesta a estrés.. 80

Figura 4.3. Ksg1 no participa en la activación de la ruta SAPK en respuesta a estrés. 82

Figura 4.4. La función de Ksg1 es necesaria para la activación de Pmk1 dependiente del módulo Rho-Pck2 83

Figura 4.5. Ksg1 regula la biosíntesis de pared celular en *S. pombe* 85

Figura 4.6. Ksg1 interacciona físicamente con Pck1 y Pck2 86

Figura 4.7. (A) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los dominios de activación de distintas quinasas de la familia AGC presentes en seres humanos y en levaduras **(B)** Validación del fosfo-anticuerpo específico para el residuo conservado T842 del bucle de activación de Pck2. 87

Figura 4.8. Ksg1 fosforila a Pck2 en T842 *in vitro* 89

Figura 4.9. Ksg1 fosforila *in vivo* a Pck2 en el residuo T842 91

Figura 4.10. Validación del fosfo-anticuerpo específico para el residuo conservado T984 del motivo de giro de Pck2. 92

Figura 4.11. Significación funcional de la fosforilación en el bucle de activación de Pck2. 94

Figura 4.12. Niveles basales de actividad de Pmk1 en distintos mutantes de Pck2 en el dominio de activación. 96

Figura 4.13. Papel del dominio de activación de Pck2 sobre la actividad basal de Pmk1 y la viabilidad celular en respuesta al daño en pared celular 97

Figura 4.14. La fosforilación de Pck2 en T842 no es necesaria para la activación de la ruta de integridad en respuesta a estrés 99

Figura 4.15. Papel de la fosforilación de Pck2 en T984 y S1002 sobre la activación de la ruta de integridad en respuesta a estrés 100

Figura 4.16. La fosforilación simultánea de T842 y T984 dentro del dominio de activación de Pck2 es necesaria para la activación de Pmk1 en respuesta a estrés 101

Figura 4.17. Papel de T846 en la activación catalítica de Pck2 103

Figura 4.18. Significación biológica de la fosforilación de Pck2 en T846 105

Figura 4.19. Los residuos fosforilables conservados del bucle de activación y del motivo de giro son necesarios para el incremento de los niveles de Pck2 en respuesta a estrés 107

Figura 4.20. Las Rho GTPasas Rho1 y Rho2 son esenciales para el mantenimiento de los niveles de Pck2 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés 109

Figura 4.21. La síntesis *de novo* de Pck2 es necesaria para el mantenimiento de la actividad basal de la ruta de integridad celular 110

Figura 4.22. El incremento de la síntesis *de novo* de Pck2 es necesario para la activación de la ruta de integridad celular en respuesta al daño en la pared celular pero no durante el estrés salino..... 111

Figura 4.23. Tor1 regula la síntesis *de novo* de Pck2 113

Figura 4.24. Tor1 regula la síntesis de novo de Pck2 en respuesta a estrés salino y de pared celular 115

Figura 4.25. (A) Mutantes en componentes del complejo TORC2 son sensibles a caspofungina. (B) Interacción genética entre Pck2 y Tor1 116

Figura 4.26. Tor1 regula la síntesis *de novo* de Pck2 y la activación de Pmk1 en respuesta al ayuno de glucosa 117

DISCUSIÓN

Figura 4.27. 122

Figura 4.28. 123

Figura 4.29. Modelo sobre los mecanismos de regulación de la función de Pck2 en el control de la integridad celular en *S. pombe* 124

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características Generales de *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Figura 1.1) fue aislada por primera vez por Lindner en 1893 a partir de cerveza de mijo elaborada en ciertas regiones de África. Su nombre genérico hace referencia, por un lado, a su condición de levadura (-*Saccharomyces*) y por otro, a su mecanismo de división por fisión (*Schizo*-). En cuanto al epíteto, indica el nombre local de la cerveza elaborada con esta levadura. Sin embargo, la mayoría de las cepas silvestres y mutantes de *S. pombe* que se utilizan en los laboratorios proceden de un aislamiento realizado en Europa por A. Osterwalder en 1921 a partir de mosto. En los años 40 Urs Leupold caracterizó genéticamente a *S. pombe,* y en 1950 Murdoch Mitchison reconoció su potencial único para los estudios de crecimiento y división celular debido a su peculiar morfología y forma de división. Posteriormente, en los años 70, Paul Nurse combinó con éxito los estudios de Mitchison con la aproximación genética de Leupold, dando lugar a un incremento exponencial en el empleo de esta levadura como modelo experimental.

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

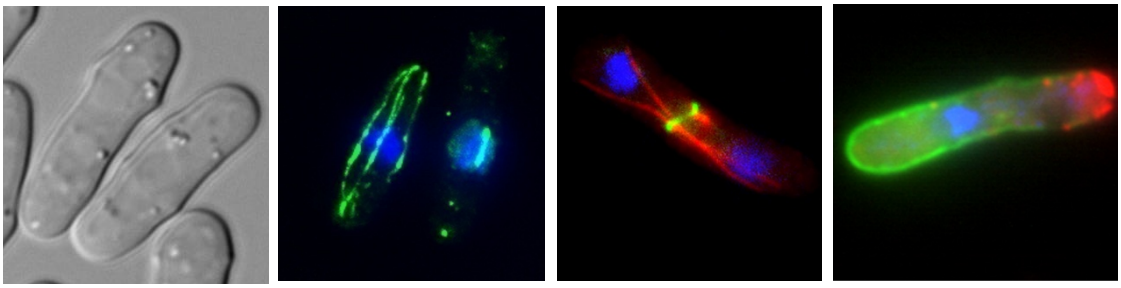


Figura 1.1 Imágenes de la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* obtenidas mediante diversas técnicas microscópicas

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

El genoma de *S. pombe* está totalmente secuenciado (3 cromosomas, ~14 Mb, Wood *et al*., 2002), y su ciclo biológico es rápido y principalmente haploide, lo que facilita su manipulación genética y lo hace especialmente apropiado como organismo modelo en biología celular.

REINO	***Mycota***	
SUBREINO	*Neomycota*	***Cavalier-Smith 1998***
FILO	*Ascomycota*	***Berkeley 1857***
SUBFILO	*Archiascomycotina* *(Taphrinomycotina)*	***Erikson y Winka 1997*** ***Erikson y Winka 1997***
CLASE	*Schizosaccharomycetes* *Taphrinomycetes*	***Erikson y Winka, 1997;*** ***Cavalier-Smith 1998***
ORDEN	*Schizosaccharomycetales*	***Prillinger, Dörfler, Laaser,*** ***Eckerlein y Lehle 1990***
FAMILIA	*Schizosaccharomycetaceae*	***Beijerinck y Klöcker 1906***
GÉNERO	*Schizosaccharomyces*	***Lindner 1893***

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de *Schizosaccharomyces pombe*

Al tratarse de un eucariota simple, posee un alto grado de similitud con células de organismos superiores en lo que se refiere a procesos biológicos tales como la organización del citoesqueleto, la compartimentalización celular, o el procesamiento de RNA, entre otros. Además, su mecanismo de división por bipartición la convierte en idónea para el estudio del ciclo celular, ya que, atendiendo a su morfología, es relativamente sencillo identificar la fase del ciclo en que se encuentra. Por otro lado, sus proteínas se encuentran fuertemente conservadas evolutivamente en relación a organismos superiores, siendo un organismo enormemente atractivo para el estudio de rutas de señalización y transducción de señales. Finalmente, al tratarse de un hongo, posee una pared celular rígida que lo protege mecánicamente y mantiene la forma y la estabilidad osmótica. Esta característica permite su empleo como modelo para el estudio de los procesos implicados en la formación, biosíntesis y degradación de este componente celular, y en la identificación y cribado de fármacos antifúngicos.

1.1.1 Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*

En condiciones favorables de crecimiento, *S. pombe* es haploide y se divide asexualmente por mitosis (ciclo haploide; Figura 1.2). Sin embargo, cuando las condiciones externas empeoran y las células detectan la falta de nutrientes, *S. pombe* puede entrar en un estado de latencia (fase estacionaria), o bien iniciar el ciclo sexual por conjugación entre tipos sexuales opuestos, denominados h^+ y h^- (cepas heterotálicas). Por otro lado, existen cepas homotálicas (h^{90}) capaces de conjugar entre sí, ya que en condiciones adversas algunas células pueden variar el tipo sexual. En medios de cultivo ricos en glucosa el ciclo vegetativo de una cepa haploide de *S. pombe* tiene una duración aproximada de entre 2 y 4 horas. Cuando las células detectan la limitación de nutrientes, y en especial en ausencia de nitrógeno, se induce el ciclo sexual (Figura 1.2). Las células bloquean su ciclo

celular en la fase G1, y cuando en la población existen ambos tipos sexuales (h^+ y h^-), comienza el proceso de conjugación. Dos células de sexo opuesto se reconocen mediante feromonas y a continuación se produce la elongación de las células hacia la fuente emisora de feromonas del sexo contrario ("*shmooing*"). Las dos células se fusionan dando lugar a un zigoto diploide que inicia un proceso de meiosis que concluye con la formación de un asca con cuatro esporas haploides (Figura 1.2). Finalmente las paredes del asca se autolisan, liberando los cuatro productos meióticos que pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en condiciones abióticas (Leupold, 1950). Cuando las condiciones ambientales lo permiten, las esporas germinan y entran nuevamente en el ciclo mitótico (Yamamoto *et al*., 1997) (Figura 1.2).

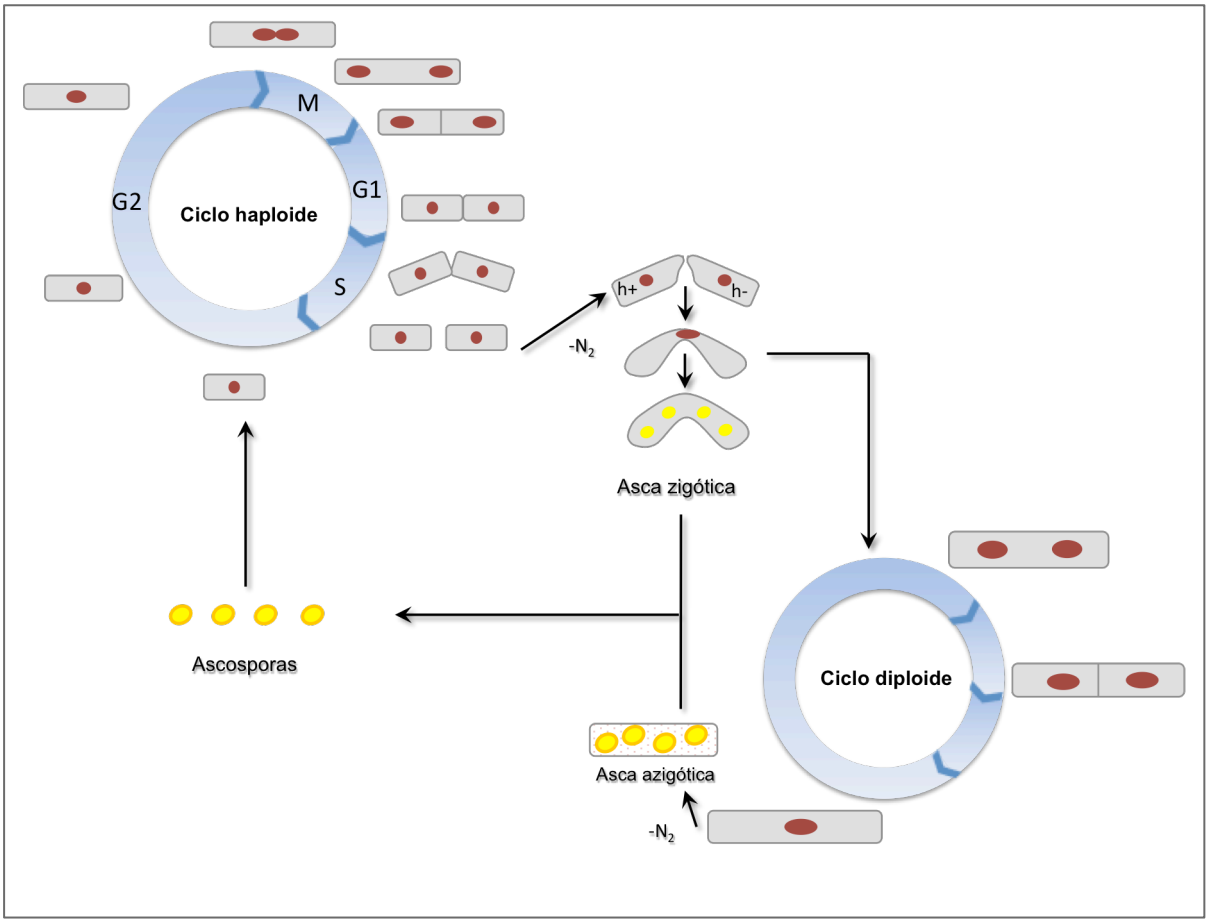


Figura 1.2 Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*

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

Dado que se trata de un organismo eucariota, el ciclo mitótico de *Schizosaccharomyces pombe* está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (Mitchison, 1970; Figura 1.2). La fase G1 o "Gap 1"

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

Tras la división celular, el crecimiento de las células hijas se produce de forma monopolar por el polo existente en el ciclo celular anterior (polo "viejo"). Una vez alcanzan una masa crítica determinada, se inicia el crecimiento simultáneo por el polo "nuevo" originado a partir de la división de la célula madre en dos células hijas. Esta activación del crecimiento bipolar conocida como NETO, ("*New End Take Off*") se inicia en la fase G2 o "Gap 2". La transición entre las distintas etapas del ciclo celular es un proceso altamente regulado en el que las proteínas participantes se sintetizan y/o activan de forma periódica.

1.2 La Proteína Quinasa Dependiente de Fosfoinosítidos

1.2.1 La proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK-1) en organismos superiores

La proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (PDK-1) está implicada en la regulación del crecimiento, la proliferación, el metabolismo y la supervivencia celulares. Esta quinasa controla la mayoría de las respuestas celulares inducidas por el incremento de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3) por medio de la activación de un grupo de proteínas quinasas de la superfamilia AGC entre las que destacan PKB, S6K, RSK, SGK, y las distintas isoformas de PKC (Mora *et al*., 2004). La PDK-1

activa a estas proteínas quinasas a través de la fosforilación directa de su bucle de activación localizado en el dominio catalítico.

En humanos el gen que codifica la PDK-1 se encuentra localizado en el cromosoma 16p13.3, y se traduce en una proteína citosólica de 556 aminoácidos que consta de dos dominios bien caracterizados, un dominio quinasa N-terminal y un dominio C-terminal con homología a la pleckstrina (PH) que interacciona con gran afinidad con PtdIns(3,4,5)P_3 y PtdIns(3,4)P_2, así como otros fosfoinosítidos como PtdIns(4,5)P_2 (Alessi *et al*., 1997a; Alessi *et al*., 1997b; Stephens *et al*., 1998; Currie *et al*., 1999). La unión a PtdIns causa la redistribución del enzima del citoplasma a la membrana plasmática (Anderson *et al*., 1998; Filippa *et al*., 2000).

Los estudios iniciales sobre la regulación de la PDK-1 pusieron de manifiesto que se trataba de un enzima activo de forma constitutiva y cuya actividad quinasa intrínseca es independiente de PtdIns u otros mecanismos moleculares. Es por ello que muchos de los estudios realizados sobre esta proteína quinasa se han centrado en comprender cómo es capaz de fosforilar de manera inducible a un conjunto tan amplio de sustratos en respuesta a estímulos específicos. Los numerosos estudios realizados hasta la fecha sugieren que, en ausencia de señal, la PDK-1 tiene un acceso limitado a sus sustratos, los cuales sí son accesibles tras la estimulación con distintos agonistas. Además, trabajos más recientes han demostrado que, aunque la quinasa tiene una actividad elevada *per se*, existen mecanismos capaces de incrementarla en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos. La regulación por fosforilación de la PDK-1 depende de la modificación del residuo Ser241 de su bucle de activación mediante autofosforilación, la cual se incrementa de forma notable en presencia de esfingosina (King *et al*., 2000). Además, otros estudios han demostrado que dicha fosforilación también aumenta en respuesta a insulina y pervanadato (Park *et al*., 2001; Chen *et al*., 2001). Por otro lado, se ha descrito la existencia de otros residuos fosforilables que podrían ser importantes para regular la función de la proteína en determinadas circunstancias. Por ejemplo, en respuesta a pervanadato, se produce un incremento en la fosforilación de determinados residuos de Tyr que son importantes para la actividad de la quinasa *in vivo* (Park *et al*., 2001). En cuanto a la regulación de PDK-1 mediada por lípidos, se ha evidenciado que el dominio PH, además de promover la asociación a membranas biológicas, actúa como un módulo autoinhibitorio cuyo efecto desaparece tras la unión a PtdIns(3,4,5)P_3 (Filippa *et al*., 2000). Otro mecanismo importante en la regulación de la actividad de la PDK-1 es su unión al motivo hidrofóbico, una vez fosforilado, presente en la mayoría de sus sustratos. La interacción entre el sustrato fosforilado y la PDK-1 se produce por medio de una secuencia reguladora denominada bolsillo PIF, y tiene como consecuencia la activación alostérica de la PDK-1 (Mora *et al*., 2004; Biondi, 2004).

La PDK-1 regula de manera diferente a sus distintos sustratos (Figura 1.3). Algunos son fosforilados de forma constitutiva, mientras otros, como PKB, S6K, SGK y RSK, son fosforilados en

respuesta al mismo agonista celular aunque con diferente dinámica (Biondi, 2004). La regulación de la PKB ha sido una de las más estudiadas por su implicación en el desarrollo de distintos tipos de cáncer. En condiciones basales, la PKB se encontraría en una conformación inactiva en la que el dominio PH se encontraría plegado sobre el dominio quinasa, impidiendo la fosforilación del bucle de activación (Thr^{308}) por PDK1 y del motivo hidrofóbico (Ser473) por el complejo mTORC2 (Calleja *et al*., 2007; 2009) (Figura 1.3). Una vez que las células son estimuladas por factores de crecimiento o insulina, se produce un incremento de PtdIns(3,4,5)P_3, al que se unen a través de su dominio PH tanto PKB como PDK-1, de manera que tanto sustrato como quinasa co-localizan en la membrana plasmática (Lizcano y Alessi, 2002) (Figura 1.3). La unión a PtdIns(3,4,5)P_3 promueve un cambio conformacional en la PKB que interrumpe la interacción del dominio PH con el dominio quinasa, favoreciendo la fosforilación de los dos residuos mencionados anteriormente. Una vez fosforilada, la PKB se puede disociar de la membrana plasmática y relocalizarse en el citosol en su conformación activa hasta ser desfosforilada, tras lo cual sufre un nuevo cambio conformacional para recuperar la conformación inactiva "cerrada".

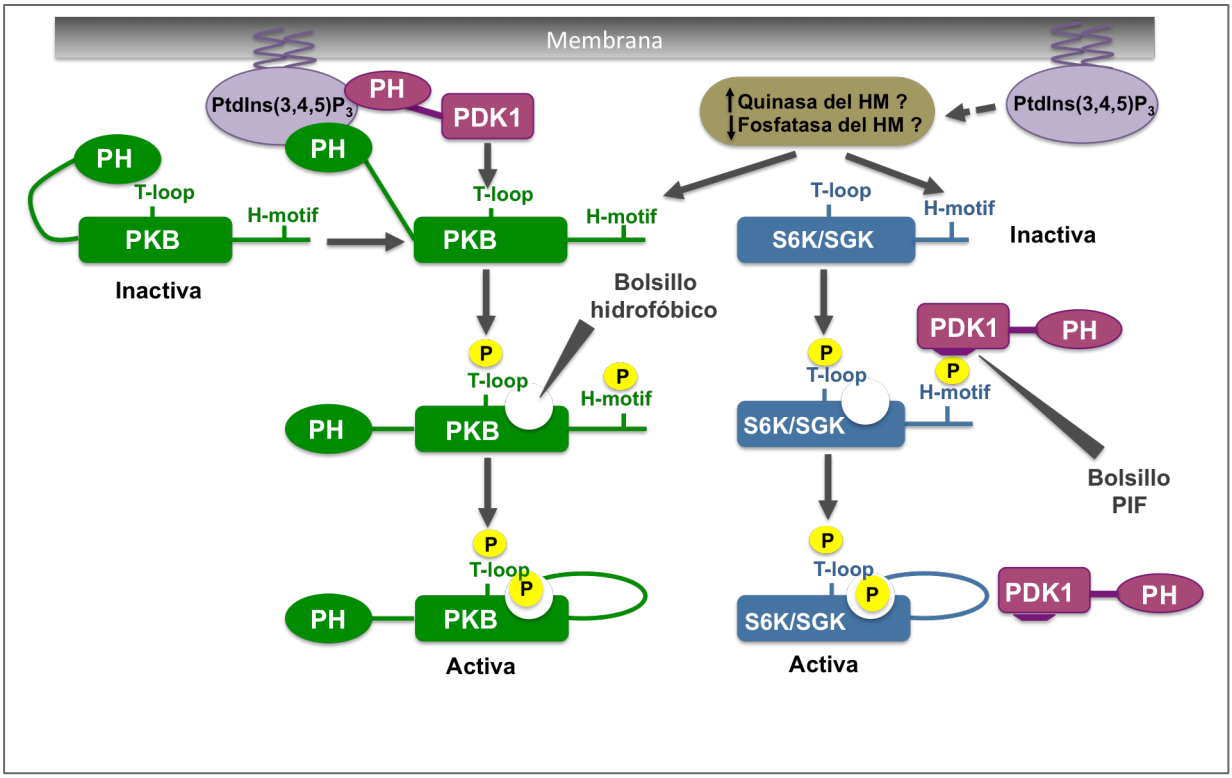


Figura 1.3 Mecanismo de activación de PKB, S6K y SGK por PDK-1 (modificado a partir de Mora *et al*., 2004)

En el caso de otros sustratos, la PDK1 interacciona específicamente con el motivo hidrofóbico Phe-Xaa-Xaa-Phe (Figura 1.3). En algunas quinasas de la familia AGC, el motivo hidrofóbico presenta un sitio contiguo cuya fosforilación es necesaria para la unión de la PDK-1 (Balendran *et al*.,

1999; Frodin *et al*., 2000; Biondi *et al*., 2001; Frodin *et al*., 2002). Estos sustratos oscilan entre una conformación inactiva y activa tras la estimulación celular. Finalmente, la PDK-1 fosforila a otro grupo de sustratos de forma constitutiva, como en el caso de las isoformas de la PKC clásicas (cPKC) (Newton, 2001; Parekh *et al*., 2000). En estos casos, la conformación activa se adquiere tras su síntesis, y la regulación inducible depende de la unión a diacilglicerol (DAG) y Ca^{2+}. La PDK-1 interacciona con la PKC desfosforilada en su motivo hidrofóbico y la fosforila en el sitio conservado del bucle de activación. Tras adquirir una conformación más estable, la PKC se fosforila en su motivo de giro e hidrofóbico para alcanzar su conformación activa final. En dicha conformación, el motivo hidrofóbico no es accesible para su interacción con la PDK-1. Los datos estructurales obtenidos con otras quinasas de esta familia sugieren que, en la conformación activa, el motivo hidrofóbico fosforilado interacciona con la región catalítica (Gao *et al*., 2001).

1.2.2 La proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos en levaduras modelo

1.2.2.1 Saccharomyces cerevisiae

En *S. cerevisiae* existen tres ortólogos de la PDK-1 humana: *pkh1*, *pkh2* y *pkh3* (Casamayor *et al*., 1999). Los genes *pkh1* y *pkh2* son esenciales para el crecimiento y la supervivencia celular en esta levadura, aunque los mutantes sencillos son viables (Inagaki *et al*., 1999). Las proteínas codificadas por estos genes presentan un 69% de similitud e identidad con la PDK-1 humana, y su expresión complementa el defecto de crecimiento del mutante doble *pkh1Δ pkh2Δ* (Casamayor *et al*., 1999). Pkh1 y Pkh2 regulan procesos como la endocitosis (Friant *et al*., 2001; deHart *et al*., 2002; Bultynck *et al*., 2006), la integridad de la pared celular (Inagaki *et al*., 1999; Roelants *et al*., 2002; Schmelzle *et al*., 2002), la dinámica de la actina (Inagaki *et al*., 1999; Fadri *et al*., 2005; Tabuchi *et al*., 2006), y la exocitosis (Daquinag *et al*., 2007). Pkh3 fosforila los mismos sustratos que Pkh1 y Pkh2, aunque juega un papel secundario en condiciones fisiológicas (Inagaki *et al*., 1999). A diferencia de lo que ocurre con la PDK-1 de organismos superiores, Pkh1 y Pkh2 no poseen dominios PH aparentes y su localización subcelular no parece estar regulada por PtdIns(3,4,5)P_3 o PtdIns(3,4)P_2 (De Camilli *et al*., 1996). Sin embargo, existen evidencias de que determinados esfingolípidos podrían ser importantes para modular su actividad (Sun *et al*., 2000; Friant *et al*., 2001). Entre sus sustratos más relevantes en levaduras destacan Pkc1 (el único ortólogo a PKC en este organismo), y Ypk1 y Ypk2 (ortólogos de SGK) (Casamayor *et al*., 1999; Inagaki *et al*., 1999).

1.2.2.2 Schizosaccharomyces pombe

En la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* existe un único ortólogo a PDK-1 denominado Ksg1, que juega un papel esencial en los procesos de crecimiento, conjugación, y esporulación (Niederberger y Schweingruber, 1999). Presenta un 56% de homología estructural con la PDK-1 humana en la regiones de unión a ATP, centro activo, e interacción con sustratos, mientras que el dominio PH se encuentra menos conservado (Niederberger y Schweingruber, 1999). Así, el dominio

PH de Ksg1 carece de determinados aminoácidos que en PDK-1 son críticos para su unión a PtdIns(3,4,5)P_3 (Ferguson *et al*., 2000). Hasta el momento únicamente se ha demostrado que Ksg1 es la quinasa responsable de la fosforilación de los residuos conservados Thr387 del bucle de activación de Gad8 (ortóloga de AKT) (Matsuo *et al*., 2003), Thr356 del bucle de activación de Pka1 (ortóloga de PKA) (Tang y McLeod, 2004), y Ser248 de Psk1 (Nakashima *et al*., 2012**).** Asimismo, estudios previos en *S. pombe* han demostrado que Ksg1 interacciona con los ortólogos de PKC Pck1 y Pck2 en ensayos de dos híbridos (Graub *et al*., 2003), y que su pérdida parcial de actividad provoca graves defectos morfológicos que sugieren un papel regulador de la integridad celular en este organismo (Graub *et al*., 2003). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si Ksg1 fosforila *in vivo* a Pck1 y/o Pck2, y el significado de dicha modificación en el contexto del control de la integridad celular en esta levadura.

1.3 Las Proteínas Quinasas C

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

La actividad biológica de las PKCs se encuentra regulada de manera muy estricta a nivel estructural y espacial, de forma que su estado de fosforilación, su conformación, y su localización subcelular han de ser definidos precisamente para que pueda llevar a cabo correctamente sus funciones biológicas (Newton, 2001). La regulación por fosforilación ocurre en el dominio quinasa situado en la región catalítica. Dentro de este dominio están presentes tres sitios de fosforilación que son críticos para su activación catalítica, y que se conocen como el bucle de activación ("*activation loop"*, AL), motivo de giro ("*turn motif"*, TM), y motivo hidrofóbico ("*hydrophobic motif"*, HM).

1.3.1 Proteínas quinasas C (PKCs) en organismos superiores

1.3.1.1 Isoenzimas de la PKC

Los seres humanos poseen 10 isoformas de PKC que evolucionaron a partir de la única PKC presente en *Saccharomyces cerevisiae* (Pkc1; Levin *et al*., 1990), y que se subdividen en tres subfamilias denominadas PKCs convencionales o clásicas, nuevas, y atípicas (Tabla 1.2). La subfamilia de PKCs convencionales (isoformas α, βI, βII, y γ) requieren Ca^{2+}, diacilglicerol (DAG), y fosfatidilcolina para su activación (Tabla 1.2). Las PKCs nuevas (nPKCs) incluyen las isoformas δ, ε,

η, y θ, y requieren DAG, pero no Ca^{2+} para su activación (Tabla 1.2). Por último, las PKCs atípicas (aPKCs) (incluyendo la proteína quinasa C ζ y las isoformas ι / λ) no requieren Ca^{2+} ni DAG para su activación (Newton, 2001; Freeley, 2011) (Tabla 1.2). Estas últimas se encuentran reguladas de forma inducible por la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1). Otra subfamilia importante es la conformada por las denominadas PKN/PRKs ("*PKC-Related Kinases"*), donde destacan PRK1, PRK2 y PRK3. Estas proteínas son insensibles a calcio, a DAG y a ésteres de forbol, e interaccionan y son activadas por la Rho GTPasa RhoA (Kazanietz, 2005; Griner y Kazanietz, 2007) (Tabla 1.2). La fosfatidilserina estimula la actividad de todas las isoformas de la PKC, ya que participa en el anclaje del dominio C1 a la membrana. Las PKCs son enzimas anfitrópicos, es decir, pueden existir como formas solubles en el citosol o unidas a membranas biológicas.

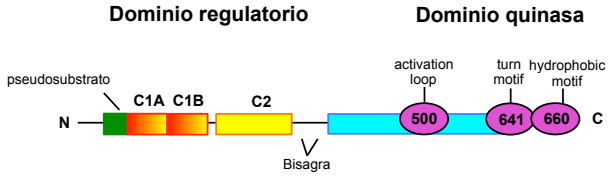
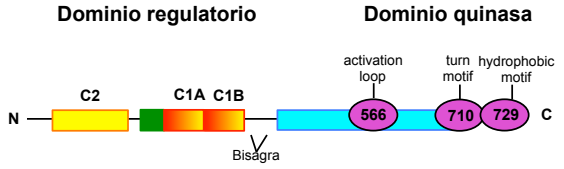
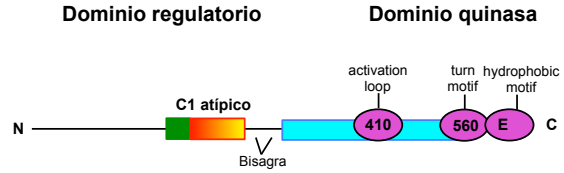
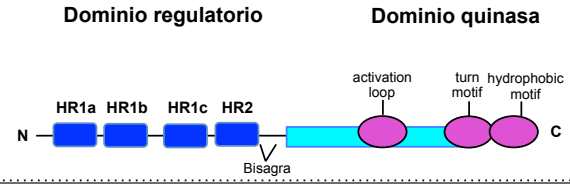
Isoformas	Estructura	Mecanismo de activación
Clásicas (α βI βII γ)		○ Fosforilación en tres sitios conservados: 1) Fosforilación constitutiva en el AL por PDK1 2) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el TM 3) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el HM ○ Unión de Ca^{2+} al dominio C2 ○ Unión de DAG al dominio C1 ○ Union a fosfatidilserina y anclaje del dominio C1 a membranas biológicas
Nuevas (δ ε θ η/L)		○ Fosforilación en tres sitios conservados: 1) Fosforilación constitutiva en el AL por PDK1 2) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el TM 3) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el HM ○ No existe unión de Ca^{2+} al dominio C2 ○ Unión de DAG al dominio C1 ○ Union a fosfatidilserina y anclaje del dominio C1 a membranas biológicas
Atípicas (ζ ι/λ)		○ Fosforilación en tres sitios conservados: 1) Fosforilación inducible por agonistas en el AL por PDK1 2) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el TM 3) Sitio de fosforilación sustituido por un residuo de Ácido glutámico en el HM ○ No existe unión a Ca^{2+} ○ El DAG no se une al dominio C1 ○ Union a fosfatidilserina y anclaje del dominio C1 a membranas biológicas
PRK1/2 (PKC-related kinases)		○ La interacción con Rho GTPasas activas a través de la unión a motivos HR facilita la fosforilación del AL por PDK1

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

Todas las isoformas de PKC son codificadas por genes diferentes, excepto PKCβI y βII, que son variantes formadas por corte y unión alternativa del mismo mRNA. La mayoría de las isoenzimas tiene un peso molecular aparente de 80 kDa, aunque varía entre los 62 kDa y 97 kDa según la isoforma. Su pH óptimo está entre 7,5 y 8, y su punto isoeléctrico es 5,6 (Liu, 1996).

1.3.1.2 Localización de las PKCs

Las PKCs localizan en sus formas activas e inactivas en diferentes compartimentos celulares, incluyendo las membranas celulares, el citoesqueleto, el núcleo y el citosol. En la línea celular U937

se ha demostrado mediante estudios de inmunofluorescencia la asociación de PKCβI a vesículas, de PKCβII a microtúbulos, de PKCε a estructuras filamentosas, mientras que PKCζ presenta una distribución citoplasmática difusa (Kiley y Parker, 1995). En células REF52 se ha demostrado la asociación de la PKCα con contactos focales, de PKCδ con filamentos y aparato de Golgi, de PKCε con microfilamentos, y la presencia de PKCζ a nivel citoplasmático (Jaken, 1997).

En numerosos tipos celulares se ha demostrado que la mayoría de PKCs se encuentra en el citoplasma en su forma inactiva, y se relocalizan a la membrana plasmática cuando se activan. Sin embargo, existen excepciones a este comportamiento. Por ejemplo PKCδ se encuentra casi exclusivamente en la fracción particulada de células en reposo y activadas (Kanashiro y Khalil, 1998), y PKCζ no se transloca a la membrana plasmática tras la activación con ésteres de forbol (Liu, 1996).

Aunque se cree que la localización de las diferentes isoformas de PKC está controlada por la interacción con distintas proteínas de unión, no se descarta la existencia de señales de localización nuclear, lo que explicaría su presencia en el núcleo celular (Martelli *et al.*, 1999, 2006).

1.3.1.3 Estructura de las PKCs

Desde el punto de vista estructural, todas las PKCs comparten una estructura similar caracterizada por la presencia de una región reguladora en el extremo amino terminal y una región catalítica en el extremo carboxilo terminal, que se encuentran separadas por la región variable V3, también conocida como región bisagra (Newton, 2001; Freeley, 2011) (Figura 1.4). La región reguladora de las PKCs contiene un dominio autoinhibidor, el dominio pseudosustrato, y los dominios C1 (presente en todas las isoenzimas) y C2 (presente en las PKCs nuevas y clásicas), que controlan su unión a componentes específicos de la membrana plasmática (Figura 1.4). La mitad carboxilo-terminal, que contiene los dominios C3 y C4, comprende el dominio quinasa que muestra una gran homología con otras proteínas quinasas (Kanashiro y Khalil, 1998) (Figura 1.4). A continuación se resumen las características fundamentales de las regiones que participan en la regulación de la actividad PKC.

1.3.1.3.1 Dominio pseudosustrato (PS)

Todas las PKCs contienen un dominio pseudosustrato (PS) autoinhibitorio que mantiene al enzima en una conformación inactiva al bloquear estéricamente su centro activo (House y Kemp, 1987; Makowske y Rosen, 1989; Orr *et al*., 1992). Su localización es variable dependiendo de la isoforma de PKC, y en la PKCα se localiza en la región antes del dominio C1 (Soderling, 1990). Consiste en una secuencia consenso polibásica que también se encuentra presente en los sustratos de la PKC, con la diferencia de que el residuo fosforilable (Ser o Thr) está sustituido por un residuo de Ala (House y Kemp, 1987).

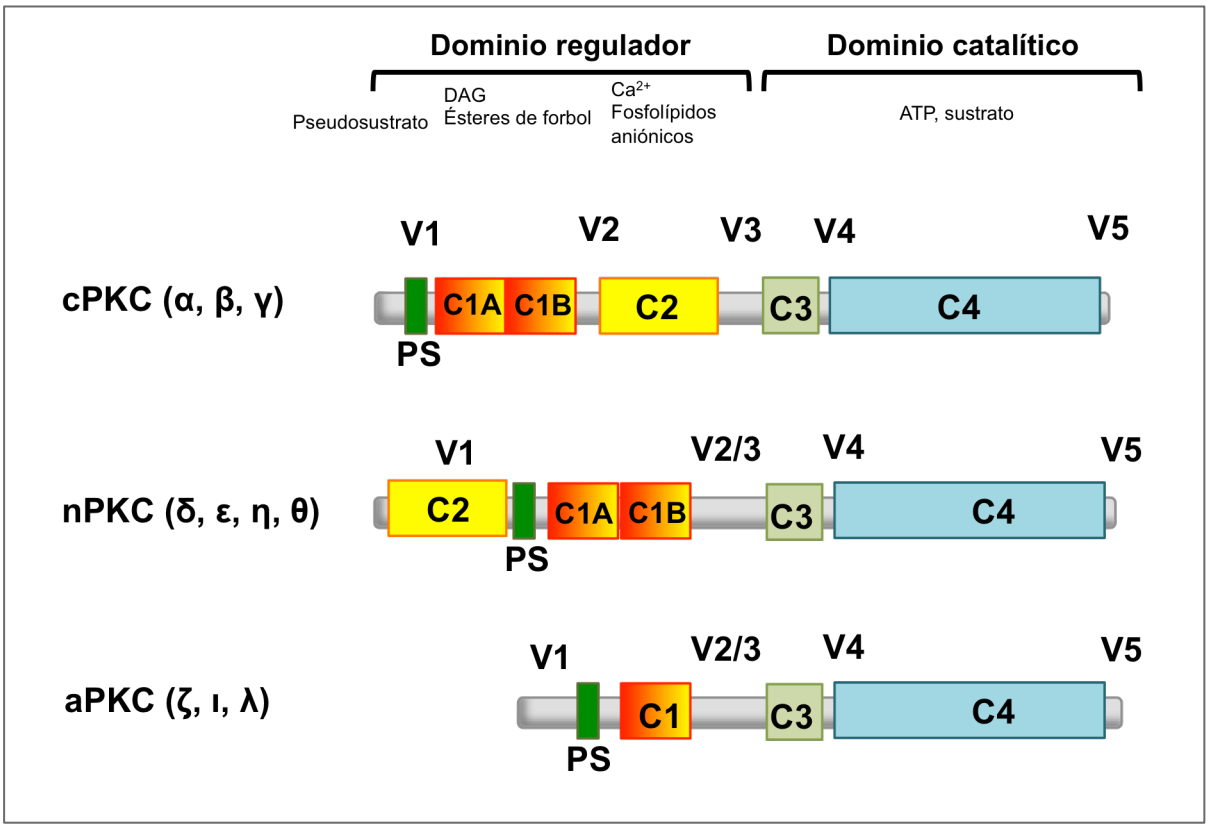


Figura 1.4 Estructura de las isoformas de PKC en humanos (Adaptado de Schmitz-Peiffer y Biden, 2008)

Como consecuencia de la unión a segundos mensajeros lipídicos se produce un cambio conformacional en la PKC que libera el centro activo del dominio PS, permitiendo la unión de los sustratos y su posterior fosforilación (Dutil y Newton, 2000). Se ha demostrado que tanto la deleción del dominio PS como la sustitución del residuo de Ala por Glu produce la activación constitutiva de la quinasa tanto *in vitro* como *in vivo*, e independiente de efectores (Pears *et al*., 1990; Genot *et al*., 1995).

1.3.1.3.2 Dominio C1

Los dominios C1 pertenecen a la superfamilia de dominios ricos en Cys. Se componen de 50-51 aminoácidos, con un patrón característico de Cys e His que es responsable de la coordinación de dos iones de Zn^{2+} (Ahmed *et al*., 1991; Burns y Bell, 1991; Quest *et al*., 1992). Se clasifican en típicos y atípicos según su capacidad de unirse o no a DAG/ésteres de forbol, respectivamente.

En las PKC clásicas y nuevas el dominio C1 completo está formado por los subdominios C1A y C1B colocados en tándem (Hurley *et al*., 1997), y une típicamente DAG y ésteres de forbol, aunque hay estudios que demuestran que cada uno de los subdominios lo hace con diferente afinidad (Ananthamarayanan *et al*., 2003). Las PKC atípicas sólo presentan un dominio C1 que no une DAG o

ésteres de forbol sino ceramidas, e interviene en las uniones proteína-proteína en el caso de las isoformas PKCζ y PKCι /λ (Moscat y Díaz Meco, 2000; Díaz Meco y Moscat, 2001; Suzuki *et al*., 2003; Ponting *et al.,* 2002; Moscat *et al*., 2006).

El dominio C1, a través de su interacción con los ligandos DAG y ésteres de forbol, participa en la localización de la proteínas en diferentes compartimentos membranales (Yang y Kazanietz, 2003). Distintos ensayos han demostrado que el mecanismo de activación de las PKC por DAG y ésteres de forbol consiste en el aumento de la afinidad de las PKC por las membranas de forma lineal con respecto a la fracción molar de ligando presente en la misma (Mosior y Newton, 1996).

1.3.1.3.3 Dominio C2

El dominio C2 (30-100 aminoácidos) se describió inicialmente en las PKC clásicas como un sitio de unión a Ca^{2+}, aumentando la afinidad por lípidos aniónicos (Coussens *et al*., 1986; Knof *et al*., 1986; Ono *et al*., 1986). En las PKCs nuevas este dominio se une en algunos casos a fosfolípidos cargados negativamente de forma independiente de Ca^{2+}, y en otras ocasiones media interacciones proteína-proteína (Newton, 2001, Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

1.3.1.3.4 Región V3

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

1.3.1.3.5 Dominio catalítico

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

El dominio catalítico de las PKCs contiene los sitios de unión a ATP y los sitios consenso de fosforilación, presentando, además, determinantes estructurales específicos de la familia. Concretamente, todas las PKCs conservan un grupo de residuos acídicos cerca de la entrada al centro activo que podría servir como un anclaje de tipo electrostático para mantener orientado el dominio pseudosustrato en esa zona, y permitiendo que el enzima se encuentre en estado inactivo (Orr y

Newton, 1994a). Además, la presencia de Mg^{2+} y ATP induce un cambio significativo en la estructura secundaria de este dominio (Sánchez-Bautista *et al*., 2006)

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

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

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

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

Este bucle ("*activation loop*", AL) comprende la región donde tiene lugar la fosforilación de los sustratos y está localizado cerca de la entrada del centro activo. En esta zona se encuentran dos regiones altamente conservadas en todos los dominios quinasa. Una de ellas es la región TPD (Thr-Pro-Asp), y la otra es la región DFG (Asp-Phe-Gly/Tyr), también conocida como elemento central de transferencia de fosfato, y que es idéntica en todos los isoenzimas humanos de la PKC y en muchas otras quinasas (Kemp y Pearson, 1990; Taylor *et al*., 1990) (Figura 1.5). Sólo los isoenzimas ζ y ι presentan una leve diferencia, caracterizada por la sustitución de la Phe de la secuencia consenso por Tyr (Ono *et al*., 1989) (Figura 1.5)**.** El responsable de la transferencia del grupo fosfato en la región DFG es el residuo de Asp, que está presente de forma invariable en todos los casos.

- ***Motivo de giro (Región V5)***

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

- ***Motivo hidrofóbico (Región V5)***

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

1.3.1.3 Regulación de la PKC

La actividad de las PKCs está sometida a una regulación estructural y espacial precisa por medio de distintos mecanismos, entre los que destacan: i- modificación covalente por fosforilación, que confiere a la enzima capacidad catalítica; ii- regulación alostérica, mediante unión a cofactores; ii-

regulación intraestérica, produciéndose una autoinhibición mediada por el sitio pseudosustrato; iii- interacción con proteínas que la localizan próxima a reguladores y sustratos; y iv- degradación proteolítica (Newton, 2001; Liu y Heckman, 1998).

1.3.1.3.1 Regulación por fosforilación

Las PKCs presentan tres sitios de fosforilación en el dominio quinasa que son críticos para su activación catalítica: AL, TM y HM (Newton, 2001; Freeley *et al*., 2011). Las fosforilaciones de estos sitios están conservadas entre los isoenzimas de la PKC, a excepción de las PKC atípicas que no se fosforilan en el HM. Estos sitios de fosforilación también se encuentran conservados en otras quinasas de la familia AGC como PRKs (PRK1/PKN, PRK2 y PKNβ), RSK, S6K y PKB (Figuras 1.5 y 1.6**).**

Fosforilación en el bucle de activación

En las células de mamíferos el primer paso en el procesamiento de las PKCs es la fosforilación de un residuo conservado de treonina en el AL (Figura 1.5). Múltiples evidencias han demostrado que la quinasa dependiente de fosfoinosítidos PDK-1, otro miembro de la superfamilia de quinasas AGC, es la responsable de la fosforilación del AL de la mayoría de las PKCs, así como de las proteínas quinasas relacionadas con PKC (PRK1, PRK2), o la proteína quinasa A (Newton, 2001). Además, en general, las células deficientes en PDK-1 presentan niveles reducidos de las distintas isoformas de PKC (Balendran *et al*., 2000; McManus *et al*., 2004), lo que sugiere que la fosforilación del AL regula su estabilidad y/o vida media.

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

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

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

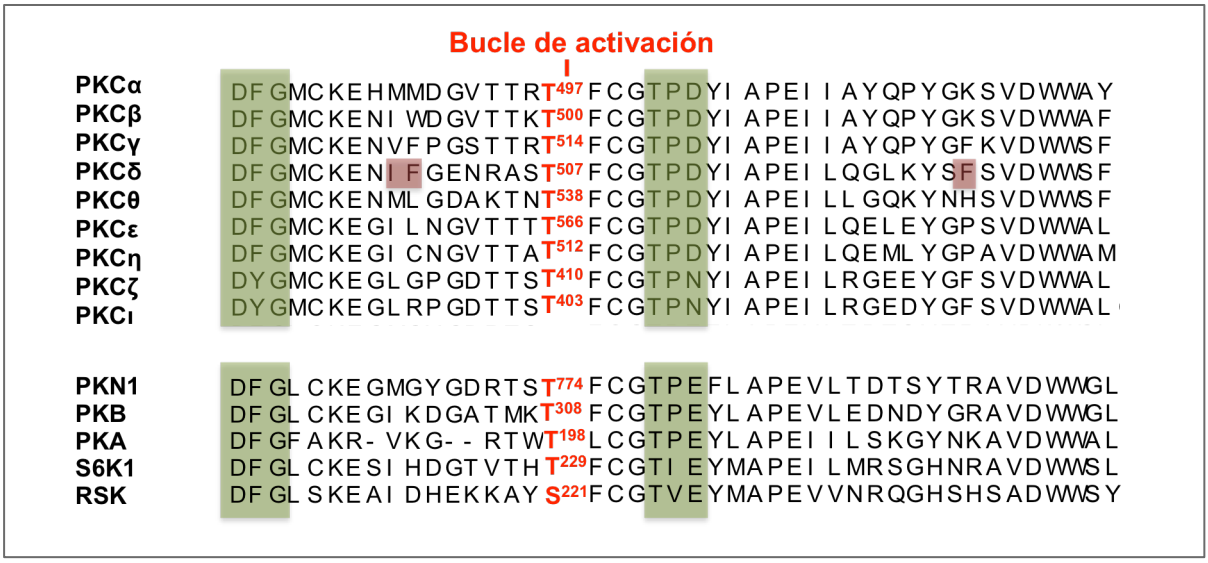


Figura 1.5 Alineación de las secuencias del bucle de activación de los dominios catalíticos de las distintas isoformas de PKC, PKN, PKB, PKA, S6K y RSK. En verde se marcan las regiones DFG y TPD, y en rojo el sitio fosforilable del AL.

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

Fosforilación en el motivo de giro

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

literatura en cuanto a la importancia de esta fosforilación para la actividad catalítica de las PKCs, ya que ésta se ve afectada de diferente manera según la isoforma estudiada. En el caso de la PKCβI y PKCβII la fosforilación en el TM es esencial para su actividad, mientras que no es necesaria en el caso de las isoformas PKC α, PKC θ y PKC ι (Liu *et al*., 2002; Hauge *et al*., 2007). Sin embargo, en el caso de PKCδ y PKCζ no existen resultados concluyentes al respecto (Li *et al*., 1997; Stempka *et al*., 1999; Good y Brindley, 2004). Una posible explicación para esta diversidad de resultados es que la dependencia de dicha fosforilación en las diferentes isoformas sea distinta debido a diferencias estructurales. Alternativamente, es también posible que otros residuos de Ser/Thr de las proximidades del TM puedan ser fosforilados y compensar la falta de dicha fosforilación, como ocurre en el caso de las isoenzimas PKCα (Thr638) y δ (Ser643) (Bornancin y Parker, 1996; Li *et al.,* 1997).

Estudios recientes han demostrado que el complejo mTOR (*mammalian target of rapamycin*) regula la fosforilación de este motivo en algunas isoformas de la PKC (Ikenoue *et al*., 2008; Facchinetti *et al*., 2008; Lee *et al*., 2010). mTOR es una proteína quinasa que forma los complejos multi-proteicos mTORC1 (sensible a rapamicina) y mTORC2 (insensible a rapamicina) (Jacinto y Lorberg, 2008). mTORC2 ha sido implicada de forma indirecta en la fosforilación del TM en las PKCs clásicas (α, βI, βII, y γ) y PKCε de fibroblastos embrionarios murinos (Ikenoue *et al*., 2008; Facchinetti *et al*., 2008). Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que la fosforilación de las isoformas PKC δ, θ,η, ζ y ι no es dependiente de mTORC2, por lo que otras rutas de señalización o mecanismos de autofosforilación estarían implicados en el proceso.

Fosforilación en el motivo hidrofóbico

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

Además, la secuencia adyacente al HM actúa como un motivo de anclaje para la PDK-1 (Balendran *et al*., 2000), de forma que este sitio queda expuesto para la unión de este enzima cuando la PKC no se encuentra fosforilada, pero se enmascara en la conformación fosforilada y activa (Gao *et al*., 2001) (Figura 1.6).

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

La ausencia de fosforilación en el HM de PKCθ reduce su actividad significativamente (Liu *et al*., 2002), mientras que en el caso de PKCδ se produce un incremento de actividad (Karmacharya *et al*., 2010). Una vez más estos estudios ponen de manifiesto el diferente papel que juegan las distintas fosforilaciones del dominio de activación sobre la activación y función de las PKCs.

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

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

1.3.1.3.2 Regulación por cofactores

Fosfatidilserina

La fosfatidilserina es un aminofosfolípido que se encuentra presente exclusivamente en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. En ausencia de diacilglicerol la PKC presenta poca selectividad por la fosfatidilserina, pero su presencia aumenta su afinidad por esa molécula. El dominio C1 confiere a la PKC la especificidad por la fosfatidilserina, aunque no se conoce la región concreta involucrada en dicho reconocimiento (Newton, 2001; Newton, 2004).

DAG y ésteres de forbol

Los ésteres de forbol y el DAG provocan un aumento muy fuerte en la afinidad de las PKCs por la membrana. Aunque los dos ligandos regulan la PKC mediante el mismo mecanismo, sus efectores son diferentes. Así, los ésteres de forbol son metabolizados con mucha más lentitud que el DAG, provocando una activación más prolongada y potente.

El DAG puede ser producido por dos rutas diferentes: mediante la hidrólisis del PIP_2 catalizada por la PLC ("*Phospholipase C*"), que produce IP_3 y DAG, o por la hidrólisis de la fosfatidilcolina, catalizada por la PLD ("*Phospholipase D*"). En este caso se produce ácido fosfatídico y colina, y el ácido fosfatídico es convertido en DAG por acción de una fosfomonoesterasa (Liu, 1998; Newton, 2001).

Calcio (Ca^{2+})

El IP_2 generado por la hidrólisis de PIP_2 provoca la movilización de Ca^{2+} intracelular. Este catión facilita la translocación de la PKC, incrementando la afinidad de su dominio C2 por los lípidos aniónicos. Sin embargo, el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular no es indispensable para la translocación y activación de la PKC si se produce una unión suficientemente fuerte a través del dominio C1. El DAG y el Ca^{2+} tienen un efecto sinérgico sobre la activación del enzima, y la presencia de uno de ellos reduce la cantidad del otro que es necesaria para la activación (Newton, 2001).

Fosfatidilinosítidos

El PIP_2 es un activador de PKC similar al DAG, y el PI puede sustituir a la PS como cofactor (Liu, 1998).

1.3.1.3.3 Regulación por unión a proteínas de anclaje

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

La localización subcelular de la PKC es regulada por proteínas de anclaje o adaptadoras que las mantienen cerca de sus sustratos, de reguladores de su actividad (fosfatasas o quinasas), o de compartimentos intracelulares específicos. Se han descrito un gran número de proteínas de unión a PKC que pueden ser específicas para una o varias isoformas. Algunas se unen a las formas inactivas del enzima, mientras que otras se unen a las formas activas. Dentro del primer grupo se encuentran las proteínas adaptadoras de la familia AKAP, que localizan a la PKC fosforilada e inactiva cerca de sus

sustratos. Dentro del segundo grupo están las proteínas de la familia RACK (*"Receptor for Active C protein Kinase"*), que anclan a la PKC fosforilada y activa a localizaciones celulares específicas. Algunas de estas proteínas adaptadoras son, además, sustratos de la PKC, como las proteínas STICKs (Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Ron y Kazanietz, 1999; Sim y Schott, 1999; Jaken, 1997; Jaken, 2004; Newton, 2001).

RACKs: Aunque estas proteínas no son sustratos de PKC, al unirse a ella aumentan la fosforilación de sus sustratos. En células humanas se han identificado dos isoformas, RACK1, que se une específicamente a PKCβII , y RACK2, que interacciona únicamente con PKCε.

STICKs: Son fosforiladas por la PKC y se unen a ella en presencia de fosfatidilserina. En este grupo se incluyen las MARCKs y las aducinas (proteínas del citoesqueleto implicadas en la interacción entre actina y espectrina).

Proteínas de andamiaje: Son proteínas que agrupan a otras proteínas señalizadoras, permitiendo la interacción entre diferentes cascadas de señalización. Entre ellas se encuentran la caveolina, las AKAPs, p62/ZIP, INAD, y las proteínas 14-3-3. Pueden inhibir o potenciar la actividad de la PKC. Los dominios que median la unión de la PKC a proteínas de anclaje se localizan en diferentes regiones. Así, se han definido secuencias que participan en las interacciones proteína-PKC en los dominios C1, C2 y en las regiones variables (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

Proteínas del citoesqueleto: Algunas proteínas del citoesqueleto como tubulina y la F-actina interaccionan específicamente con isoformas de la PKC.

1.3.1.3.4 Regulación por desfosforilación

Las isoformas clásicas y nuevas de la PKC son relativamente resistente a la desfosforilación cuando se encuentran en su conformación inactiva. Sin embargo, su sensibilidad a la desfosforilación incrementa en dos órdenes de magnitud cuando se encuentran en su conformación abierta y unida a membrana (Dutil *et al*., 1994). En general, la activación prolongada favorece la desfosforilación lo que genera una PKC inestable que es degradada mediante proteólisis (Dutil *et al*., 1994).

Recientemente, se ha demostrado que la fosfatasa PHLPP (*PH domain leucine rich repeat phosphatase*) desfosforila el HM de las isoformas de la PKC clásicas y nuevas, causando su localización en la fracción celular insoluble en detergentes, donde es desfosforilada en el TM por una fosfatasa sensible a ácido okadaico (Gao *et al*., 2008).

1.3.1.3.5 Regulación por proteólisis

Aunque los estudios iniciales relacionaron la proteólisis con la activación de la PKC (Inoue *et al*., 1977), hoy es considerado un proceso que inhibe su actividad biológica. El interés sobre la proteólisis de la PKC surgió al observar que los ésteres de forbol provocan una reducción ("*down-*

regulation") en la cantidad de PKC celular, y es debido, al menos en parte, a un aumento en la proteólisis de la quinasa (Young *et al*., 1987).

La PKC desfosforilada es degradada fundamentalmente a través de la vía de la ubiquitina-proteasoma (Lee *et al*., 1996; Lu *et al*., 1998). Curiosamente, la ubiquitinación es dependiente de la actividad de PKC (Lee *et al*., 1996), la cual, además, puede hiperactivar la actividad de la ubiquitina (Kong *et al*., 1992; Wall *et al*., 2000). Por tanto, la PKC actuaría en un circuito de retroalimentación negativa, en el que se incrementaría su tasa de destrucción, con la consiguiente inactivación. Estudios recientes han demostrado que la PKCα se encuentra sumoilada, y que dicha modificación es regulada dependiendo del grado de fosforilación del dominio de activación. La PKC desfosforilada presenta unos niveles menores de sumoilación, lo que promueve su ubiquitinación y degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma (Wang *et al*., 2015).

1.3.1.3 Maduración de la PKC

El modelo general que explica el comportamiento de la PKC implica una serie de cambios conformacionales que se encuentran regulados por la unión a nucleótidos, la fosforilación del dominio quinasa y la interacción alostérica con efectores (lípidos y/o proteínas).

El primer paso en la maduración de las isoformas PKC clásicas y nuevas consiste en la unión de la chaperona HSP90 y la co-chaperona Cdc37 al motivo PXXP del dominio quinasa (Gould *et al*., 2008) (Figura 1.7). A continuación, tras la unión a ATP se produce un cambio conformacional que la transforma en una quinasa competente para ser fosforilada (Grodsky *et al*., 2006). Seguidamente se producen una serie de fosforilaciones secuenciales que promueven su estabilización y son, por tanto, esenciales para evitar la degradación proteolítica del enzima (Borner *et al*., 1989). En primer lugar, la PDK-1 fosforila el AL de todas las isoformas de la PKC (Le Good *et al*., 1998), gracias a que la PKC recién sintetizada se encuentra en una conformación abierta en la que el motivo pseudosustrato no ocupa la cavidad de unión a sustrato (Dutil y Newton, 2000) (Figura 1.7). En el caso de las isoformas clásicas y nuevas la fosforilación en el AL es constitutiva, mientras que las atípicas es dependiente de agonistas. A continuación se produce la fosforilación en el TM, que en la mayoría de los casos es dependiente del complejo mTORC2 (Fachinetti *et al*., 2008; Ikenoue *et al*., 2008; Jacinto y Lorberg, 2008) (Figura 1.7). Finalmente tiene lugar la fosforilación en el HM bien por autofosforilación intramolecular, o mediada por los complejos mTORC1 o mTORC2 (Figura 1.7). Como consecuencia, la PKC adopta su conformación madura gracias a la interacción entre la región carboxilo terminal fosforilada y el dominio amino terminal, y se redistribuye por el citoplasma (Figura 1.7). Esta especie fosforilada es competente catalíticamente, pero mantiene una conformación inactiva "cerrada" en la que el dominio pseudosustrato ejerce una regulación negativa mediante su ocupación del dominio de unión al sustrato (Figura 1.7). De hecho, esta conformación "cerrada" es esencial para la acumulación eficiente de las isoformas PKCα y PKCε en su estado fosforilado (Cameron *et al*., 2009). Cuando la

PKC se encuentra en su conformación abierta con el bolsillo de unión a nucleótidos vacío es desfosforilada y degradada (Srivastava *et al*., 2002).

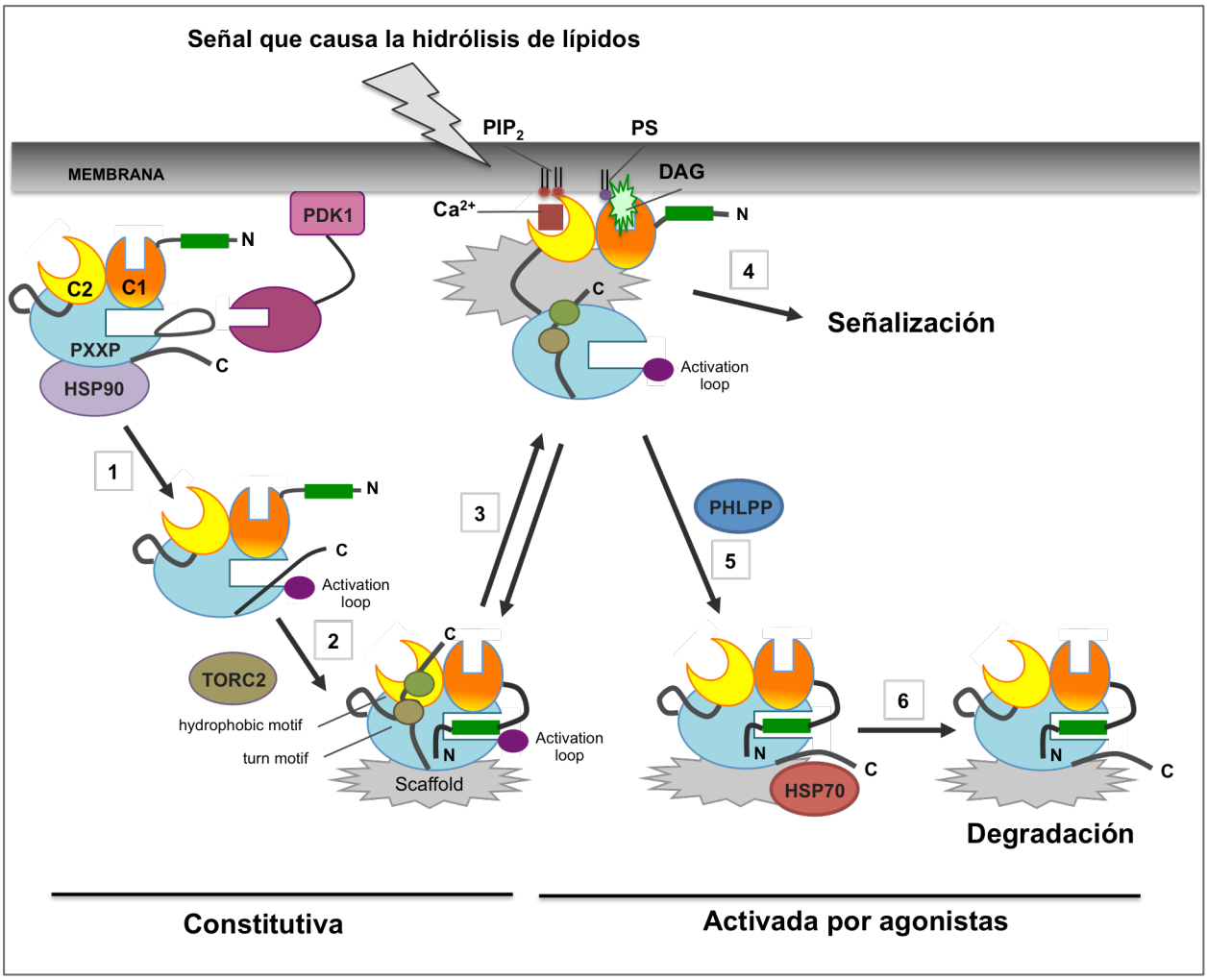


Figura 1.7 Modelo de regulación de la PKC desde su biosíntesis a su degradación (Adaptado de Newton, 2010)

En respuesta a determinados estímulos extracelulares que activan a los receptores acoplados a proteínas G o de tirosín-quinasa en la membrana plasmática se produce la activación de la fosfolipasa C (PLC), que promueve la hidrólisis de PtdIns(4,5)P_2 a Ins(1,4,5)P_3 y DAG. El DAG generado permanece en la membrana plasmática, mientras que el Ins(1,4,5)P_3 se transloca al citoplasma, lo que provoca un aumento intracelular de Ca^{2+}. El calcio se une al dominio C2 de la PKC aumentando su afinidad por la membrana donde se une a fosfatidilserina (Figura 1.7). Como consecuencia, se favorece la interacción del dominio C1 con lípidos de la membrana y DAG, produciéndose la liberación del pseudosustrato autoinhibidor del centro activo y la consiguiente fosforilación de sustratos (Steinberg, 2008.; Newton, 2009) (Figura 1.7).

1.3.1.4 La PKC como proteína de anclaje ("Scaffold protein")

Utilizando un modelo muy simplificado se podría argumentar que la proteína quinasa C actúa como un interruptor molecular dependiente de su unión a nucleótidos (ATP). Cuando no está unida a nucleótidos, se encuentra desfosforilada y en una conformación abierta con un dominio regulatorio totalmente expuesto. Cuando está unida a nucleótidos la proteína está fosforilada y en una conformación activa pero cerrada debido en parte a la interacción del dominio pseudosustrato con la cavidad de unión a sustrato (Cameron *et al*., 2009). Por tanto, una de las funciones del dominio quinasa es regular la disponibilidad del dominio regulatorio a través de interacciones intramoleculares. De hecho, existen evidencias que demuestran que en determinadas situaciones el dominio regulatorio de las PKCs *per se* puede ser funcional *in vivo*. Por ejemplo, la expresión del dominio regulatorio de PKCδ promueve el crecimiento de neuritas, siendo éste más eficiente tras la sobre-expresión de una versión catalíticamente inactiva de la quinasa en relación a la versión silvestre (Ling *et al*., 2004). Esta propiedad también la presentan los mutantes inactivos de PKCα que presentan una conformación abierta. Por ejemplo, la expresión del mutante en el sitio de unión a ATP de PKCα desencadena apoptosis, una capacidad que no presenta ni la versión silvestre ni una versión catalíticamente inactiva mutada en el residuo de aspártico presente en el subdominio VI en la secuencia YRDLK (Cameron *et al*., 2008; 2009). Estas y otras evidencias sugieren que la activación alostérica de la PKC le confiere múltiples funciones dependientes **tanto del dominio regulatorio como del dominio catalítico.**

1.3.1.5 Proteína quinasas asociadas a Rho ("PKC-Related Kinases o PRKs")

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

1.3.2 Proteínas quinasas C en levaduras modelo

1.3.2.1 Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae posee una única proteína ortóloga a PKC denominada Pkc1. Se trata de una proteína esencial que es parte integral de la ruta de MAP quinasas de integridad celular en este organismo, además de regular distintos procesos relacionados con el control de la morfogénesis y la progresión del ciclo celular (Levin *et al*., 1990; Levin, 2011) (Figura 1.8). Pkc1 es una proteína quinasa de 132 kDa que presenta varios dominios regulatorios. En la región amino-terminal posee dos copias del dominio HR1, estructuralmente similar al presente en PRK1/PKN y PRK2 en mamíferos, y que media su unión a la GTPasa RhoA (Mellor y Parker, 1998; Flynn *et al*., 2000). Además, presenta un dominio C2, un motivo pseudosustrato, un dominio C1, el dominio quinasa y la región V5 (Figura 1.8). Pkc1 no se activa ni por calcio ni por DAG, aunque una cepa que expresa una versión mutante sin las cisteínas conservadas del dominio C1 es sensible a cafeína y SDS (Antonsson *et al*., 1994; Jacoby *et al*., 1998).

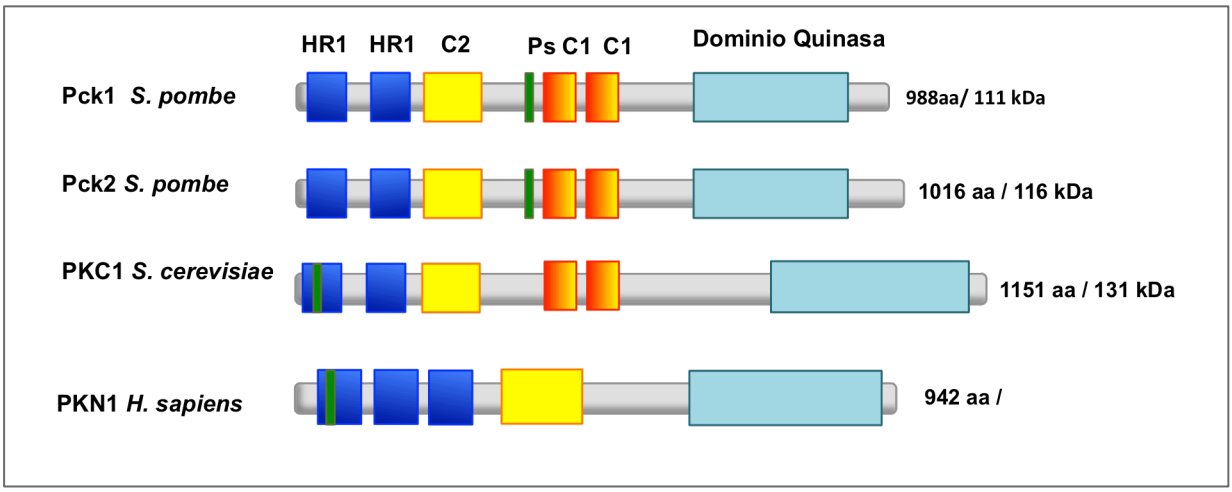


Figura 1.8 Estructura de las isoformas de PKC en *S. pombe* y *S. cerevisiae*

La GTPasa Rho1 contribuye a la estabilización y distribución espacio/temporal de Pkc1 en los sitios de crecimiento activo y en las zonas donde se produce daño en la pared celular (Andrews y Stark, 2000). Tras su interacción con Rho1, Pkc1 es fosforilado *in vivo* en el residuo de treonina T983 del AL por medio de las quinasas Pkh1 y Pkh2, que son los dos ortólogos a PDK-1 presentes en este organismo, siendo dicha fosforilación esencial para su activación catalítica y el desarrollo de sus funciones biológicas (Roelants *et al*., 2004). Se ha sugerido que la fosforilación de Pkc1 en T983 podría no ser necesaria en determinados contextos biológicos (Roelants *et al*., 2004). Por ejemplo, el mutante de Pkc1 no fosforilable por PDK1 es capaz de conferir resistencia a miriocina a una cepa *pkc1Δ*, lo que sugiere que la propia proteína independientemente de su actividad catalítica juega un papel importante en este proceso (Roelants *et al*., 2004). Sin embargo dichos estudios se han visto

condicionados por el hecho de que los mutantes nulos *pkc1Δ* no son viables en condiciones normales de crecimiento salvo en medios equilibrados osmóticamente (Levin *et al*., 1990; Roelants *et al*., 2004).

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

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

1.3.2.1 Schizosaccharomyces pombe

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

Pck1 y Pck2 también están relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional con las quinasas asociadas a Rho de mamíferos (*PKC-Related Kinases* o PRKs). Contienen en su extremo amino terminal dos secuencias HR1 responsables de su unión a las GTPasas Rho1 y Rho2 (Sayers *et al*., 2000) y secuencias tipo PEST, implicadas en su degradación por el proteasoma (Arellano *et al*., 1999) (Figura 1.8). Pck1 y Pck2 son muy inestables, y su unión a las formas activas de Rho1 y Rho2 aumenta su estabilidad. Además, dicha unión promueve cambios en su localización, estabilizándolas en los sitios donde su función es requerida. De hecho, Pck1 y Pck2 co-localizan con Rho1 y Rho2 en zonas de crecimiento (Matsuyama *et al.,* 2006). Probablemente Pck1 y Pck2 son fosforiladas y activadas por Ksg1, el único ortólogo a la quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1) presente en

S. pombe (Niederberger y Schweingruber, 1999), aunque esta hipótesis no ha sido todavía demostrada (Pérez y Cansado 2010).

Se ha demostrado que Rho1 y Rho2 regulan de forma coordinada la biosíntesis del (1,3) β-D-glucano (Rho1) y α-glucano (Rho2), los dos principales componentes de la pared celular de *S. pombe*, fundamentalmente por medio de Pck2 (Ver más adelante) (Arellano *et al*., 1999; Calonge *et al*., 2000). El papel de Pck1 en el control de la integridad celular aún no se ha dilucidado en detalle. *pck1*$^+$ presenta interacciones genéticas con *ras1*$^+$, *ral1*$^+$ y *ppe1*$^+$, por lo que podría estar controlando la integridad celular a través de vías alternativas. Además, Rho1, Rho2, Pck1 y Pck2 son activadores de la ruta de MAP quinasas de integridad celular de este organismo, cuya organización se describe detalladamente más adelante (Apartado 1.6.4).

1.4 La Ruta de Señalización Dependiente de la Proteína Quinasa TOR

TOR ("*Target Of Rapamycin*") es una proteína quinasa conservada desde levaduras hasta humanos que controla el crecimiento y metabolismo celulares en respuesta a cambios en las condiciones nutricionales (aminoácidos), factores de crecimiento, niveles de energía celular, y en respuesta a estrés. TOR activa el crecimiento mediante la regulación positiva de procesos anabólicos y negativa de procesos catabólicos, los cuales colectivamente favorecen la acumulación de masa celular. Los procesos anabólicos activados por TOR incluyen la transcripción, la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas, el transporte de nutrientes y el metabolismo mitocondrial. Por el contrario, TOR reprime los procesos catabólicos tales como la degradación del RNA mensajero, la proteólisis dependiente de ubiquitina, la autofagia y la apoptosis (Hall, 2008).

Las proteínas TOR presentes en organismos eucariotas poseen un gran tamaño (~280 kDa), y comparten un 40-60% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Pertenecen a un grupo de proteínas conocidas como PIKKs ("*Phosphoinositide 3'-Kinase-related Kinases*"), y que presentan un dominio quinasa en su extremo carboxilo terminal similar al dominio catalítico de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Figura 1.9).

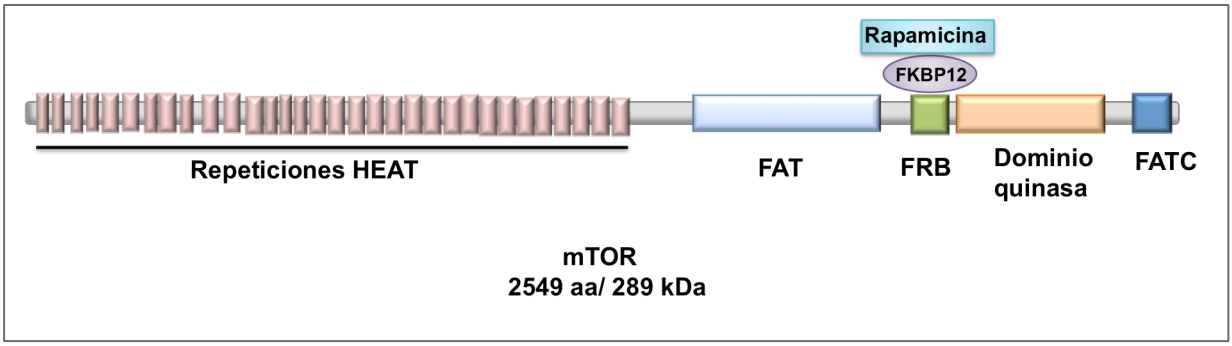


Figura 1.9 Estructura de mTOR

En la región amino terminal se encuentran las repeticiones HEAT en tándem que participan en las interacciones proteína-proteína (Figura 1.9). Además, poseen un dominio FAT central y un dominio FATC que flanquean los dominios FRB (dominio de unión al complejo FKBP12-rapamicina) y quinasa, respectivamente, y que son típicos de los miembros de la familia PIKK (Dames *et al*., 2005) (Figura 1.9). TOR se encuentra en dos complejos multiproteicos funcional y estructuralmente distintos, denominados TORC1 y TORC2, presentes tanto en organismos eucariotas superiores como en levaduras (Wullschleger *et al*., 2006).

1.4.1 TOR en organismos superiores

1.4.1.1 Características generales

A diferencia de lo que ocurre en levaduras, los eucariotas superiores poseen una única copia del gen TOR (Crespo *et al*., 2005). mTOR es un gen esencial para el desarrollo embrionario ya que, en su ausencia, éste queda bloqueado de manera temprana (Gangloff *et al*., 2004; Murakami *et al*., 2004).

1.4.1.1.1 TORC1

El complejo TORC1 de mamíferos (mTORC1) está formado por mTOR, RAPTOR ("*Regulatory Associated Protein of mTOR"*), mLST8 (Hara *et al*., 2002; Kim *et al*., 2002, 2003; Loewith *et al*., 2002), DEPTOR (Peterson *et al*., 2009) y PRAS40 (Sancak *et al*., 2007) (Figura 1.10). mTORC1 regula aspectos temporales del crecimiento celular y su actividad se inhibe por FKBP12-rapamicina tanto *in vivo* como *in vitro* (Jacinto *et al*., 2004; Sarbassov *et al*., 2004). Tanto RAPTOR como mLST8 son necesarias para la correcta actividad catalítica de TOR, aunque no se conoce el mecanismo molecular responsable del proceso. Los dos sustratos de mTORC1 mejor caracterizados son la proteína quinasa de la familia AGC S6K1 y la proteína de unión al factor de iniciación 4E (4EBP1), ambos implicados en la regulación de la traducción (Mahfouz *et al*., 2006; Tee y Blenis, 2005) (Figura 1.10). mTORC1 es activado por la GTPasa Rheb ("*Ras homolog enriched in brain"*), la cual se encuentra regulada negativamente por el complejo TSC1/2 ("*Tuberous Sclerosis Complex*"), y que presenta actividad GAP ("*GTPase Activating Protein*") (Inoki *et al*., 2003; Zhang *et al*., 2003) (Figura 1.10). Tras su activación en respuesta a factores de crecimiento u hormonas, las vías de señalización AKT/PI3K y RAS-ERK ("*Extracellular signal-Regulated Kinase*") estimulan la señalización dependiente del complejo mTORC1 a través de la inhibición de TSC1/2 (Hay y Sonenberg, 2004). Además, se ha demostrado que el sensor energético AMPK (AMP-activated protein kinase) fosforila a TSC2 en el residuo Ser1345 e incrementa su actividad GAP frente a Rheb-GTP, lo que produce la inhibición de mTORC1. Todos estos estudios sugieren que TSC2 es un regulador clave y receptor de las señales de las múltiples vías de señalización que influyen en la actividad de mTOR. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el complejo mTORC1 puede ser regulado incluso en ausencia de TSC2, lo que podría indicar la existencia de mecanismos de

regulación independientes de TSC, y probablemente también de Rheb (Roccio *et al*., 2006; Smith *et al*., 2005).

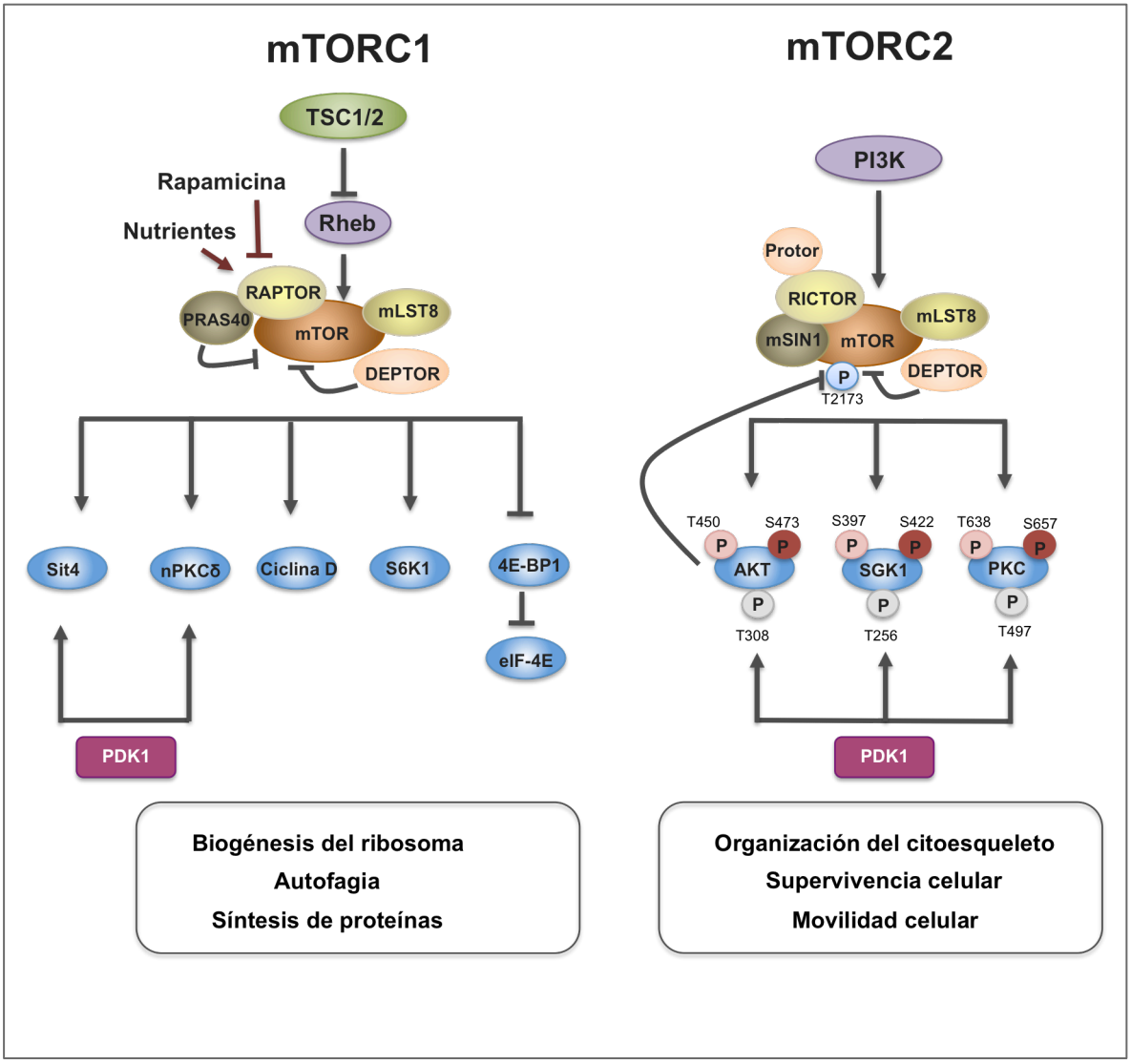


Figura 1.10 Composición y función de los complejos mTORC1 y mTORC2 en mamíferos (Adaptado de Cybulski y Hall, 2009)

1.4.1.1.2 TORC2

El complejo TORC2 de mamíferos (mTORC2) está compuesto por mTOR, RICTOR ("*Rapamycin- independent companion of mTOR*"), mLST8, mSIN1 ("*Stress activated protein kinase-interacting protein 1*"), PROTOR/PRR5 (Cybulski y Hall, 2009) y DEPTOR (Peterson *et al*., 2009) (Figura 1.10). Este complejo regula el metabolismo, el citoesqueleto y la supervivencia celulares en condiciones de estrés, y no se une a rapamicina, no afectando a su actividad catalítica *in vitro* (Jacinto *et al*., 2004; Sarbassov *et al*., 2004). La actividad de mTORC2 se encuentra regulada por la ruta PI3K, por su unión directa al ribosoma (Zinzalla *et al*., 2011) y, posiblemente, por GTPasas de la familia Rab

(Tatebe y Shiozaki, 2010) (Figura 1.10). mTORC2 fosforila a la quinasa AGC PKB/AKT en el residuo Ser473 de su motivo hidrofóbico, por lo que es importante para la activación de mTORC1. Además, mTORC2 participa en la activación de las proteínas RAC1 y de distintas isoformas de la PKC (Wullschleger *et al*., 2006; Guertin y Sabatini, 2007) (Figura 1.10).

1.4.1.2 mTOR y la regulación de la síntesis de proteínas

mTOR, principalmente a través del complejo mTORC1, controla un gran número de reguladores de la síntesis proteica, fundamentalmente durante los procesos de iniciación y elongación. La señalización dependiente de mTOR contribuye tanto a la activación de la traducción a corto plazo (minutos), como al aumento en la capacidad traduccional de la célula a largo plazo (horas), incrementando el número de ribosomas y otras proteínas (Figura 1.11). En células de mamíferos, los factores de iniciación (eIFs) juegan un papel clave en el comienzo de la traducción, ya que favorecen la unión de la subunidad 40S del ribosoma al RNA mensajero (eIF4), y la posterior unión del RNA de transferencia iniciador que reconoce el codón de inicio. Uno de estos factores, denominado eIF4E, se encuentra regulado negativamente por la proteína 4E-BP1. La fosforilación de 4E-BP1 por mTOR inhibe su unión y permite el inicio de la traducción (Wang *et al*., 2005) (Figura 1.11).

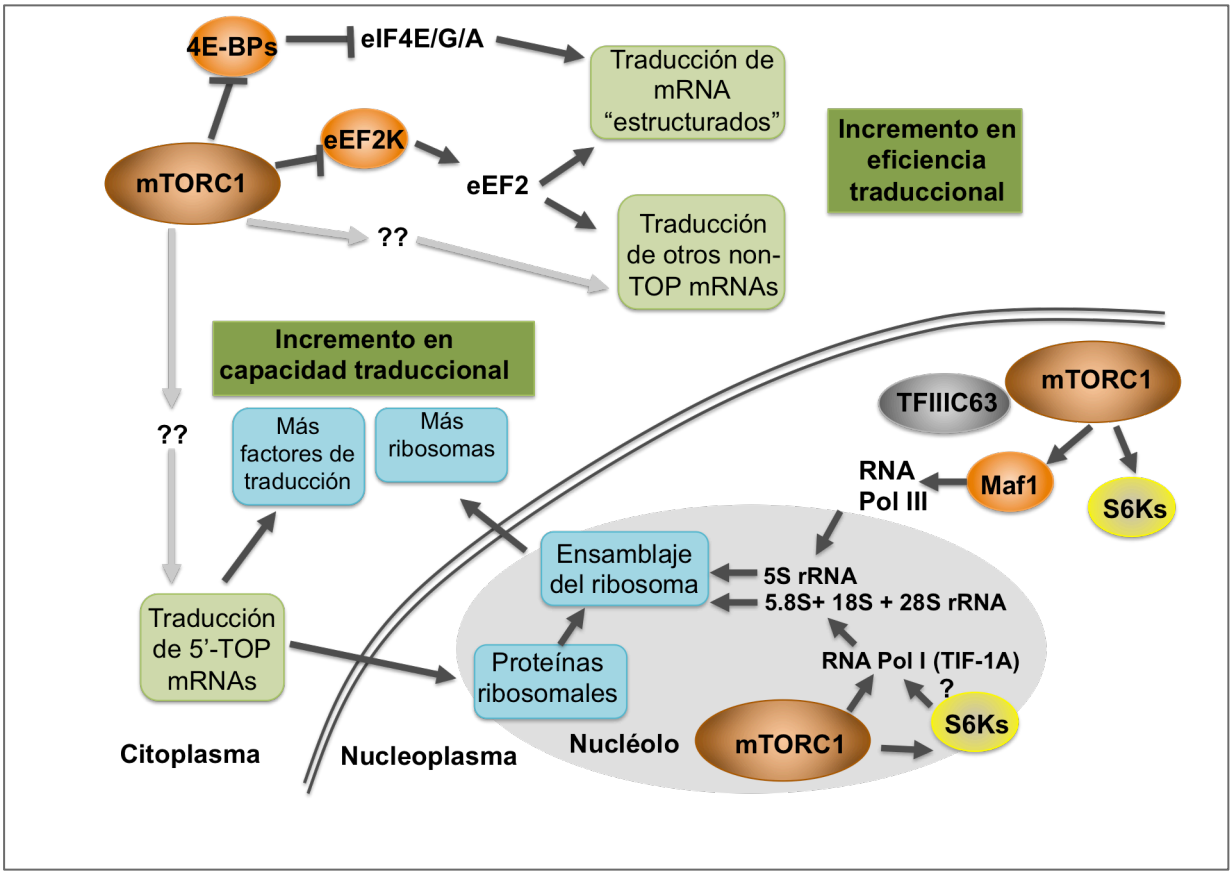


Figura 1.11 Control de la capacidad y eficacia traduccional por mTORC1 (Adaptado de Iadevaia *et al*., 2012)

Los protagonistas fundamentales de la fase de elongación son los factores eEF1 y eEF2. eEF2 está implicado en la etapa de translocación, en la cual se libera el tRNA no cargado del sitio P para permitir la entrada del nuevo peptidil-tRNA. mTOR regula a eEF2 fosforilando e inhibiendo la actividad de la quinasa eEF2K, promoviendo la desfosforilación del factor de elongación, y la consiguiente activación de la síntesis proteica (Wang *et al*., 2001) (Figura 1.11).

Uno de los sustratos mejor caracterizados de mTORC1 es la proteína quinasa de S6 (S6K), que modula de forma indirecta la síntesis de proteínas, regulando la transcripción de mRNAs implicados en la biogénesis de los ribosomas (Chauvin *et al*., 2014) (Figura 1.11). Además, S6K fosforila a otras proteínas que participan de forma directa o indirecta en la regulación de la traducción y/o procesamiento de mRNAs, como son eIF4B, eEF2K, PDCD4 ("*programmed cell death 4*"), y CBP80 ("*nuclear cap-binding protein subunit 1*") (Albert y Hall, 2015). Los ribosomas de mamíferos están compuestos de 4 tipos diferentes de RNA ribosomales (rRNAs) y alrededor de 85-90 proteínas distintas (proteínas r). Los mRNAs que cifran estas proteínas r se encuentran bajo un estricto control traduccional (Meyuhas y Hornstein, 2000). Dicho control es dependiente de la presencia de secuencias ricas en pirimidinas en sus extremo 5' (5' TOP), y que suprime su traducción en condiciones basales. Diversos estudios han demostrado que mTORC1 regula la traducción de estos mRNAs por medio de la activación de la transcripción del ADN ribosómico (rDNA) (Hannan *et al*., 2003; McMullen *et al*., 2004). Además, mTORC1 también regula la transcripción dependiente de la RNA polimerasa I (Pol I) modulando la actividad del factor regulador TIF-1A en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Mayer *et al*., 2004) (Figura 1.11).

Hasta el momento, no se conoce con exactitud el papel del complejo mTORC2 en la síntesis proteica. Zinzalla *et al*. (2011) han demostrado que mTORC2 se activa a través de su asociación con el ribosoma tras la estimulación con factores de crecimiento. De hecho, en las células cancerosas que presentan hiperactivación de la vía PI3K se produce una mayor asociación de mTORC2 con el ribosoma y un incremento en la actividad del complejo. Además, mTORC2 se asocia específicamente con los ribosomas que se encuentran traduciendo sustratos específicos del complejo, a los que fosforila co-traduccionalmente (Oh *et al*. 2010; Dai *et al*., 2013). Por ejemplo, tanto la fosforilación co-traduccional de AKT en el residuo Thr450 como la de PKC previenen su ubiquitinación y su consecuente degradación (Oh *et al*., 2010). Por otro lado, la fosforilación cotraduccional de IMP1 ("*IGF2 mRNA binding protein 1"*) en el residuo S181 conlleva una mayor producción de IGF2 al aumentar la traducción del mRNA correspondiente (Dai *et al*., 2013).

1.4.2 TOR en levaduras modelo

1.4.2.1 Saccharomyces cerevisiae

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

1.4.2.1.1 TORC1

Los componentes principales de TORC1 son TOR (Tor1 o Tor2), Kog1, Lst8 y Tco89. TORC1 es sensible a la rapamicina, y regula procesos celulares tales como la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas, la captación de nutrientes y la autofagia (Figura 1.12).

En *S. cerevisiae* TORC1 controla la síntesis de proteínas a través de la regulación del factor de inicio de la traducción eIF2, el cual es fosforilado tras el ayuno de aminoácidos o el tratamiento de las células con rapamicina, e interfiere con la traducción de mRNAs dependiente de 5'CAP (Hinnebusch, 2005). Además de eIF2, TORC1 parece regular otros factores reguladores de la traducción (Huber *et al*., 2009; Loewith 2010; Soulard *et al*., 2010). TORC1 regula la biogénesis de ribosomas a múltiples niveles: i) controlando la acumulación de transcritos dependientes de la RNA polimerasa I (Reiter *et al*, 2011); ii) regulando a la RNA polimerasa III por medio de las quinasas SCH9 y MAF1 (Vannini *et al*., 2010); iii) modulando la expresión de los 78 genes que cifran la síntesis de las correspondientes proteínas que conforman el ribosoma en la levadura (Lempiainen y Shore, 2009); iv) regulando el ensamblaje del ribosoma (Honma *et al*, 2006; Huber *et al*., 2009; Loewith, 2010); y v) regulando la estabilidad de ciertos mRNAs ribosomales (Loewith, 2010; Soulard *et al*., 2010).

Por otro lado, TORC1 es importante para la respuesta celular orquestada en situaciones de estrés, y que promueven su inhibición (Kuranda *et al*., 2006; Urban *et al*., 2007). Dicha inhibición activa la transcripción de los genes ESR (*Environmental Stress Response*) modificando la localización subcelular de la quinasa Rim15 (Figura 1.12). En principio este incremento en la transcripción podría ser infructuoso, dado que la inhibición de TORC1 también provoca un aumento en la degradación de mRNAs y una disminución drástica en la traducción. Sin embargo, Rim15 fosforila a las proteínas Igo1 e Igo2, las cuales protegen a los nuevos transcritos de la degradación (Talarek *et al*., 2010; Luo *et al*., 2011).

TORC1 también participa en la regulación negativa de la ruta de integridad celular, aunque el mecanismo molecular responsable del proceso no está todavía claro (Ai *et al*., 2002; Krause y Gray, 2002; Torres *et al*., 2002; Reinke *et al*., 2004; Soulard *et al*., 2010).

1.4.2.1.2 TORC2

El complejo TORC2, formado por Tor2, Avo1, Avo2, Avo3, Bit6 y Lst8, es insensible a la rapamicina y regula la organización del citoesqueleto de actina, la síntesis de lípidos, y la supervivencia celular en respuesta a estrés (Schmelzle y Hall, 2000) (Figura 1.12). TORC2 se localiza preferentemente cerca de la membrana plasmática por medio del dominio PH presente en AVO1 (Berchtold y Walther, 2009).

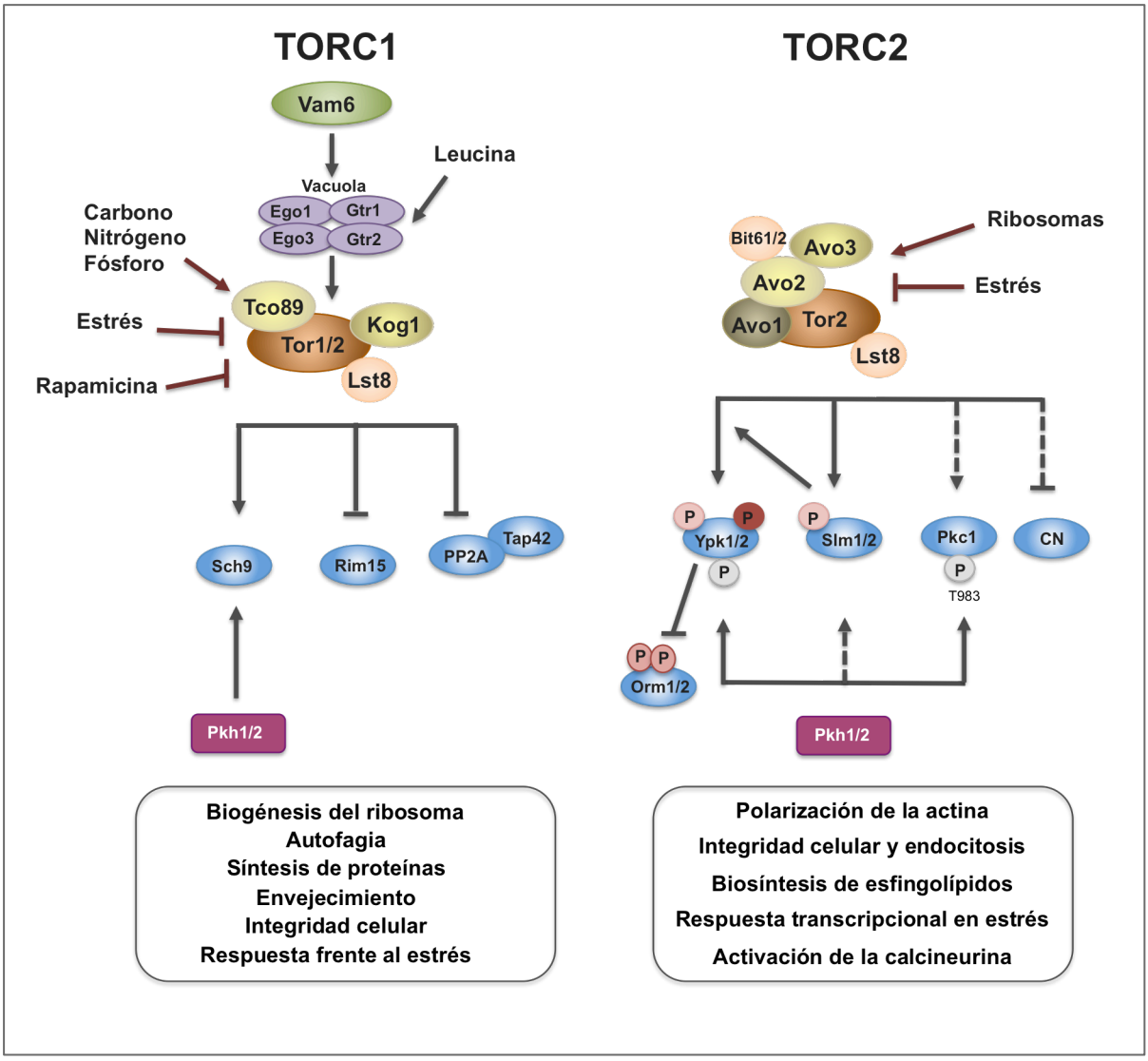


Figura 1.12 Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. cerevisiae* (Adaptado de Cybulski y Hall, 2009)

En *S. cerevisiae*, TORC2 fosforila y activa a las proteínas quinasas YPK1 y YPK2, y que son ortólogas a Gad8 y SGK1 en *S. pombe* y células de mamíferos, respectivamente (Kamada *et al*., 2005) (Figura1.12). Dichas quinasas constituyen los principales efectores del complejo TORC2 en todos los

organismos estudiados, ya que su ausencia causa fenotipos similares a la pérdida de función de TORC2.

TORC2 controla la regulación del citoesqueleto de actina a través de la ruta de MAP quinasas de integridad celular vía Pkc1, por medio de las GTPasas Rho1 y Rho2 y su GEF ("*Guanine nucleotide Exchange Factor*") Rom2 (Helliwell *et al*., 1998; Schmidt *et al*., 1997). Además, es importante para la fosforilación, directa o indirecta, de Pkc1 en su HM (Facchinetti *et al*., 2008) (Figura 1.12). La ruta Pkc1-MAP quinasa juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*, y es activada en respuesta a una gran variedad de estímulos externos que provocan un estrés sobre la pared celular, regulando la biogénesis de la misma en periodos de crecimiento polarizado de las células (Verna *et al*, 1997; Levin, 2005). Diversos resultados sugieren que el estrés ambiental regula negativamente a TORC2, posiblemente para evitar el crecimiento en condiciones desfavorables, aunque los mecanismos moleculares implicados y su interconexión con la ruta de integridad celular no se conocen en detalle (Bultynck *et al*., 2006; Mulet *et al*., 2006).

Recientemente se ha descrito que TORC2 participa en el control de la ruta biosintética de esfigolípidos siendo importante para la síntesis *de novo* de ceramidas actuando a través de las proteínas Orm1 y 2 (Aronova *et al*., 2008) (Figura 1.12).

1.4.2.2 Schizosaccharomyces pombe

La levadura con fisión también posee dos proteínas TOR, Tor1 y Tor2, codificadas por los genes *tor1*$^{+}$ y *tor2*$^{+}$, respectivamente (Kawai *et al*., 2001; Weisman y Choder, 2001). Tor1 es el ortólogo de Tor2 en *S. cerevisiae* y viceversa. Ambas quinasas regulan la respuesta celular tras el ayuno de fuente de nitrógeno, pero únicamente Tor2 es esencial para el crecimiento, siendo además un regulador clave durante la transición del crecimiento vegetativo a la diferenciación sexual. (Weisman y Choder, 2001). Tor1 es necesaria para la respuesta a la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo, promoviendo el arresto en G1 del ciclo celular y el inicio del desarrollo sexual. Además Tor1 interviene en la respuesta celular frente al estrés osmótico, oxidativo, térmico, y al cambio de pH (Kawai *et al.*, 2001).

1.4.2.2.1 TORC1

El complejo TORC1 está formado por Tor2, Mip1 (ortólogo de RAPTOR), Wat/Pop3 (ortólogo de LST8), Tco89 y Toc1 (Figura 1.13). Además, se ha descrito que Tor1 también puede formar parte de este complejo en determinadas condiciones de estrés nutricional (Hartmuth y Petersen, 2009).

La ruta TSC-Rhb1 (ortóloga a TSC-Rheb en mamíferos) regula la actividad de TORC1 en *S. pombe* (Matsuo *et al*., 2007; Urano *et al*., 2007; Uritani *et al*., 2006; Weisman *et al*., 2007) (Figura

1.13). TORC1 reprime la diferenciación sexual regulando negativamente al factor de transcripción Ste11 y a la proteína de unión a RNA Mei2 (Shiozaki-Yabana et al., 2000; Álvarez y Moreno, 2006) (Figura 1.13). Además, también controla la transcripción de genes que cifran proteínas ribosomales, y la síntesis de proteínas fosforilando a la proteína ribosomal S6 y al factor de iniciación eIF2, de manera similar a lo que ocurre en otros organismos (Álvarez y Moreno, 2006; Nakashima *et al*., 2010; Valbuena *et al*., 2012) (Figura 1.13).

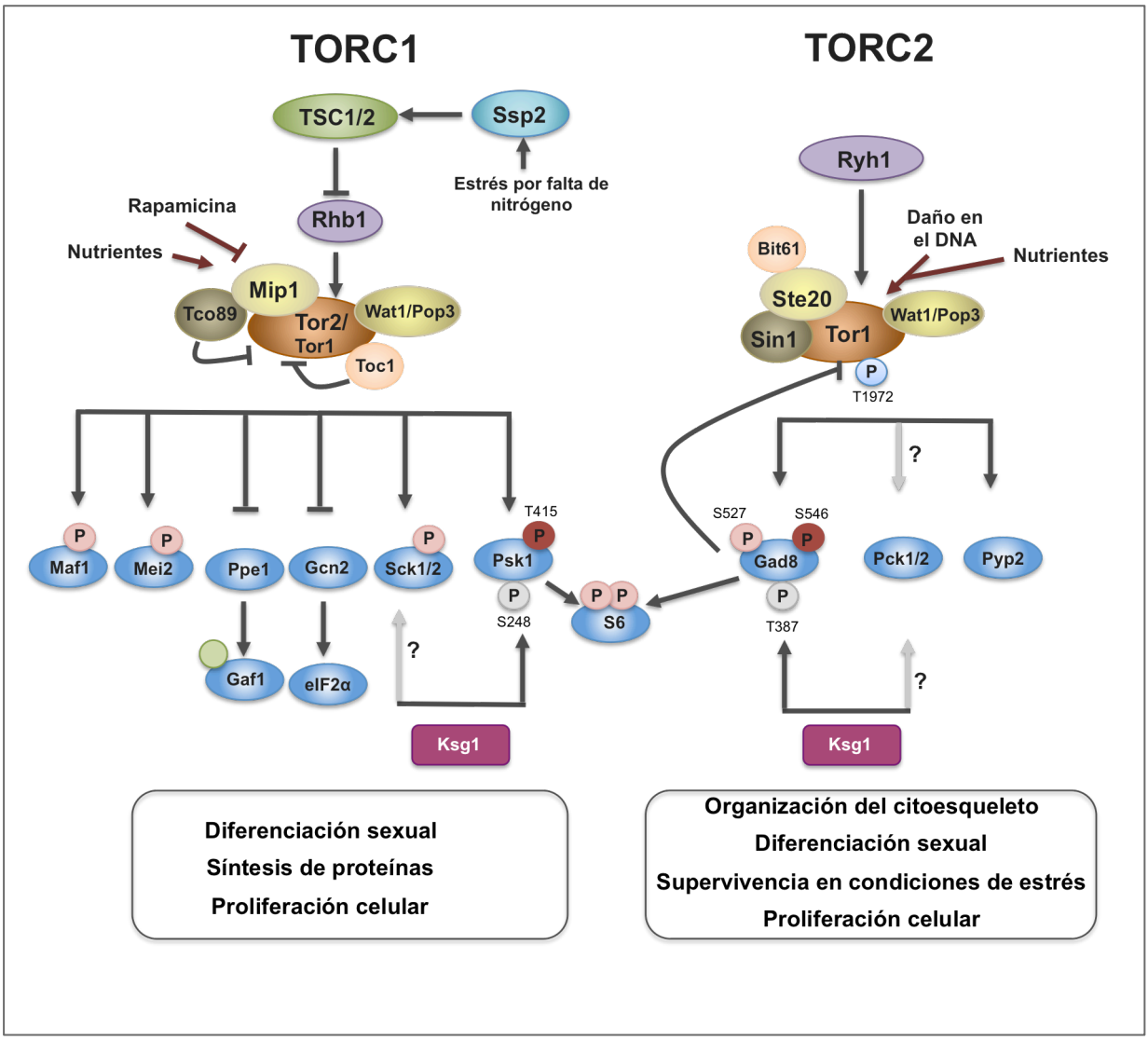


Figura 1.13 Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. pombe* (Adaptado de Cybulski y Hall, 2009)

1.4.2.2.2 TORC2

Por su parte, Tor1 forma el complejo TORC2 asociándose con Ste20 (ortólogo de RICTOR/Avo3), Wat1/Pop3, Sin1 (ortólogo de mSIN1) y Bit61 (ortólogo de PROTOR/PRR5) (Álvarez y Moreno, 2006; Hayashi *et al*., 2007; Matsuo *et al*., 2007) (Figura 1.13). Se ha descrito que

Tor2 interacciona físicamente con Ste20 en condiciones de sobre-expresión, lo que sugiere que una pequeña proporción de TORC2 podría incluir a esta quinasa (Matsuo *et al*., 2007).

El complejo TORC2 regula en la reorganización del citoesqueleto, la diferenciación sexual y la supervivencia celular en condiciones de estrés. TORC2 fosforila el TM y HM de la proteína quinasa de la familia AGC Gad8 (Matsuo *et al*., 2003; Ikeda *et al*., 2008), y que también es esencial durante la regulación del desarrollo sexual y la respuesta celular frente al estrés (Figura 1.13). Curiosamente, Gad8 retrofosforila a Tor1 (TORC2) en el residuo de Thr1972, reduciendo su actividad (Halova *et al*., 2013) (Figura 1.13). La actividad del complejo TORC2 es regulada positivamente por Ryh1 (Tatebe *et al*., 2010), una GTPasa de la familia Rab ortóloga a Rab6 en humanos y que está implicada en el transporte vesicular retrógrado entre el endosoma y el aparato de Golgi (He *et al*., 2006) (Figura 1.13). Curiosamente, la falta de Ryh1 no afecta a la actividad quinasa intrínseca de Tor1. Sin embargo, la sobre-expresión de una versión de Ryh1 constitutivamente activa promueve la interacción entre TORC2 y Gad8. Estos resultados sugieren que Ryh1 estimula la señalización aguas abajo del complejo TORC2 favoreciendo la interacción con sus sustratos (Tatebe *et al*., 2010).

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

Hasta el momento, no existen evidencias que relacionen directamente a los complejos TOR con la señalización mediada por las rutas de MAP quinasas en *S. pombe*.

1.5 Biosíntesis de Pared Celular en *S. pombe*

La pared celular es una estructura externa a la membrana plasmática presente en plantas, hongos y bacterias y que posee una elevada elasticidad y resistencia mecánica. Sus funciones principales son la estabilización de las condiciones osmóticas, la protección frente a estreses físicos y químicos, la regulación del tamaño y forma celulares, y actuar como sitio de anclaje de algunas proteínas (Klis *et al*., 2006). Es una estructura muy dinámica, y sufre durante el crecimiento numerosos cambios en su composición y estructura que son esenciales para el mantenimiento de la integridad celular. Su biosíntesis y degradación se encuentran por tanto estrechamente coordinados con el ciclo celular y el crecimiento. En *Saccharomyces cerevisiae* la ruta de la proteína quinasa C desempeña funciones esenciales en el control de la integridad de la pared celular, y se ha sugerido que además participa en la coordinación entre el crecimiento y la división celular. En *S .pombe* la ruta de MAP quinasas de integridad celular (ruta CIP) juega un papel importante en el control de la morfogénesis, el crecimiento polarizado y la citoquinesis (ver más adelante, Apartado 1.6.4).

1.5.1 Composición de la pared celular

La pared celular de *S. pombe* está compuesta por α-glucano (18-28%), β-glucano (46-54%) y galactomanano (9-14%) (Ishiguro, 1998). La capa externa es rica en galactomanano, mientras que la capa más interna contiene β(1,3), β(1,6) y α(1,3)-glucano (Pérez y Ribas, 2004) (Figura 1.14). Los dos tipos principales de β-glucano son el β(1,3)β(1,6)-glucano (el más abundante), y el β(1,6)β(1,3)-glucano, que únicamente representa el 2% total de la pared celular (Manners y Meyer, 1977). El α-glucano es un componente fundamental en la pared de *S. pombe* que no está presente en la pared celular de *S. cerevisiae*. Es un polímero esencial para el mantenimiento de la forma celular y en el control de la polaridad (Katayama *et al*., 1999).

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

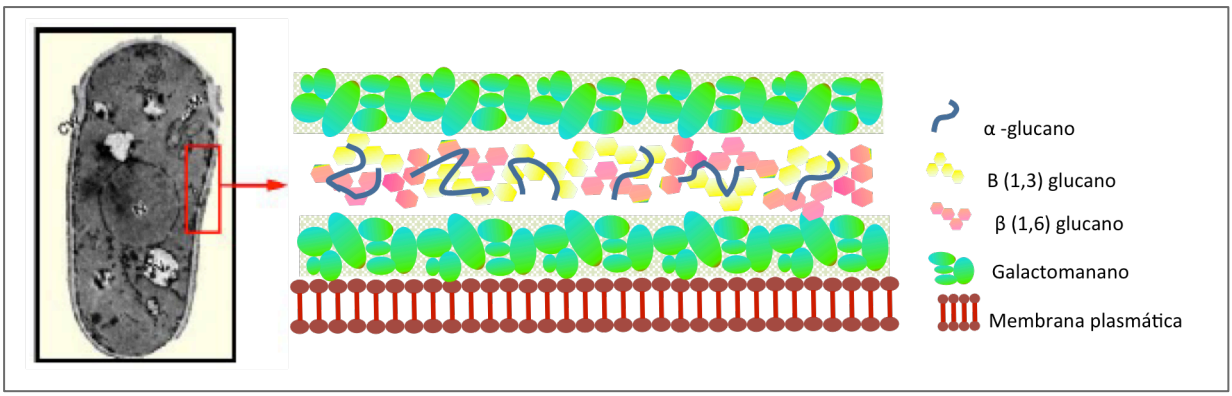


Figura 1.14 Ultraestructura y organización de la pared celular de *S. pombe*

1.5.2 Síntesis del α y β-glucano

El β-glucano es el componente principal de la pared celular de *S. pombe* y el responsable de la fuerza mecánica y del mantenimiento morfológico de la célula (Cortés *et al*., 2002). El β(1,3)-glucano es sintetizado por la enzima β(1,3)-glucán sintasa (GS), que consta de al menos una subunidad reguladora, la GTPasa Rho1, y una o varias subunidad/es catalítica/s codificadas por los genes *bgs1*$^+$ (*cps1*$^+$), *bgs2*$^+$, *bgs3*$^+$ y *bgs4*$^+$ (Arellano *et al*., 1996; Ribas *et al*., 1991). En *S. cerevisiae* la subunidad catalítica de este complejo enzimático está codificada por los genes FKS1 (Douglas *et al*., 1994; Mazur *et al*., 1995) y FKS2 (Mazur *et al*., 1995), que presentan una elevada homología con *bgs1*$^+$. Bgs1 es una proteína integral de membrana muy estable a lo largo del ciclo celular. Se localiza en el sitio de formación del septo y en los polos celulares (Cortés *et al*., 2002). El gen *bgs2*$^+$ codifica una proteína esencial para la esporulación (Martín *et al*., 2000). *bgs3*$^+$ participa en el crecimiento

vegetativo y en la germinación de esporas, y *bgs4*$^{+}$ regula el crecimiento de la pared celular y es necesario para compensar el exceso de degradación de la misma durante el proceso de citocinesis (Cortés *et al*., 2002).

Se han identificado cinco genes en *S. pombe* que conforman la familia α(1,3)-glucán sintasa denominados *mok1*$^{+}$, *mok11*$^{+}$, *mok12*$^{+}$, *mok13*$^{+}$ y *mok14*$^{+}$. Los cuatro últimos son inducidos transcripcionalmente durante los procesos de meiosis y esporulación (Mata *et al*., 2002; García *et al*., 2006). *mok1*$^{+}$/*ags1*$^{+}$ cifra una α(1,3)-glucán sintasa esencial en *S. pombe* (Hochstenbach *et al*., 1998; Katayama *et al*., 1999). Mok1 localiza en los sitios de crecimiento activo de las células, los polos celulares y el septo, y es regulado por la proteína quinasa Pck2 (Katayama *et al*., 1999), cuya presencia es necesaria para su correcta localización (Calonge *et al*., 2000). El α-glucano sintetizado por Mok1 es esencial para la integridad de la pared celular durante el crecimiento. Durante la septación interviene en la síntesis del septo secundario y la correcta formación del septo primario, confiriéndole la rigidez necesaria para soportar la presión de turgencia durante la separación celular (Cortés *et al*., 2012).

La función de Rho1 durante la biosíntesis de pared celular tiene lugar a través de su interacción con al menos tres elementos: la enzima β(1,3)-glucán sintasa, responsable de la síntesis del β-glucano (Arellano *et al*., 1996), y las quinasas ortólogas a PKC, Pck1 y Pck2, que también regulan la síntesis de pared celular (Arellano *et al*., 1999; Sayers *et al*., 2000). Por tanto, Rho1 controla la biosíntesis del β-glucano de manera dual, bien directamente o indirectamente a través de Pck1 y Pck2 (Arellano *et al*., 1999; Calonge *et al*., 2000; Sayers *et al*., 2000) (Figura 1.15).

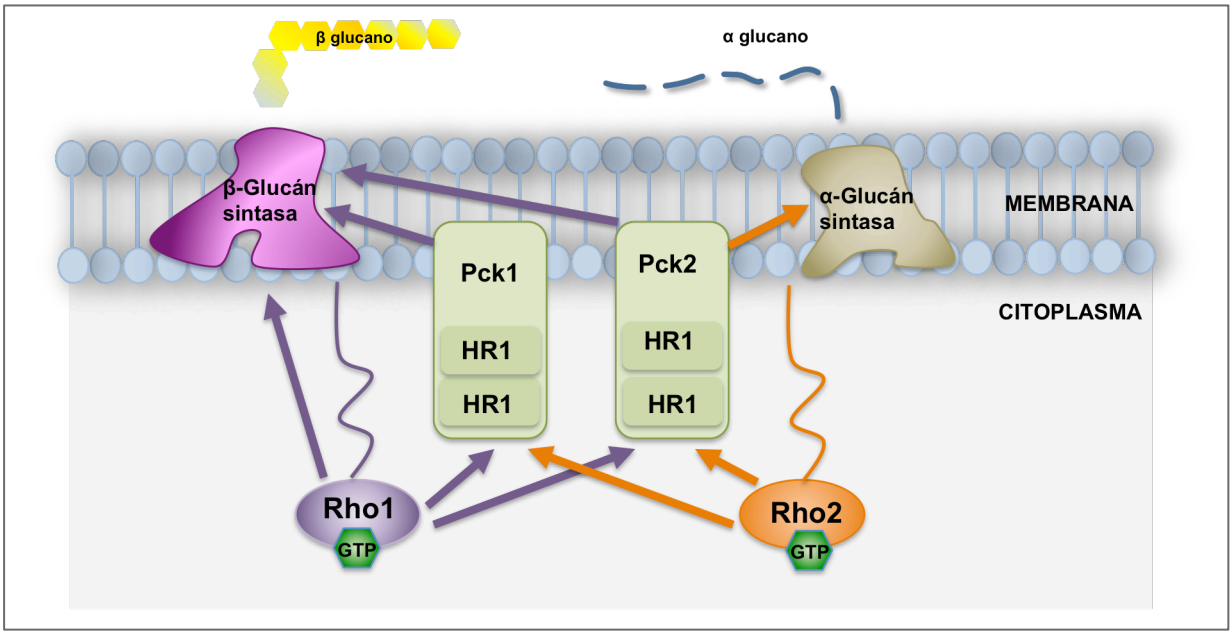


Figura 1.15 Papel de Pck1 y Pck2 durante la biosíntesis del α y β-glucano de la pared celular en *S. pombe*

La GTPasa Rho2 promueve la biosíntesis de α-glucano regulando positivamente a Mok1 (Calonge *et al*., 2000) (Figura 1.15). Aunque la forma activa de Rho2 interacciona con Pck1 y Pck2 (Arellano *et al*., 1999), su actividad reguladora sobre la α-glucán sintasa se produce casi exclusivamente a través de Pck2 (Katayama *et al*., 1999; Calonge *et al*., 2000) (Figura 1.15).

1.6 Las Rutas de MAP Quinasas

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

1.6.1 Organización de las rutas de MAP quinasas

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

1.6.1.1 Sensores

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

1.6.1.2 Módulo de MAP Quinasas

Está compuesto por tres proteínas quinasas, la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), la MAPK quinasa (MAPKK), y la MAP quinasa (MAPK), que mantienen un alto grado de conservación evolutiva y cuya estructura básica es muy similar. En respuesta al estímulo, la MAPKKK es normalmente activada por fosforilación dependiente de quinasas o proteínas de la familia Rho o Ras, aunque también puede activarse por oligomerización o relocalización subcelular (Figura 1.16).

La MAPKKK, una vez activada, fosforila y activa al segundo elemento del módulo, la MAPKK (MEK) en un residuo de serina y otro de treonina (a veces serina). Por último, la MAPKK reconoce y fosforila dualmente a la MAPK en residuos de treonina y tirosina del motivo Thr-X-Tyr (Figura 1.16), donde X puede ser prolina, glicina, o ácido glutámico, según la familia de MAPK de que se trate (Songyang *et al*., 1996).

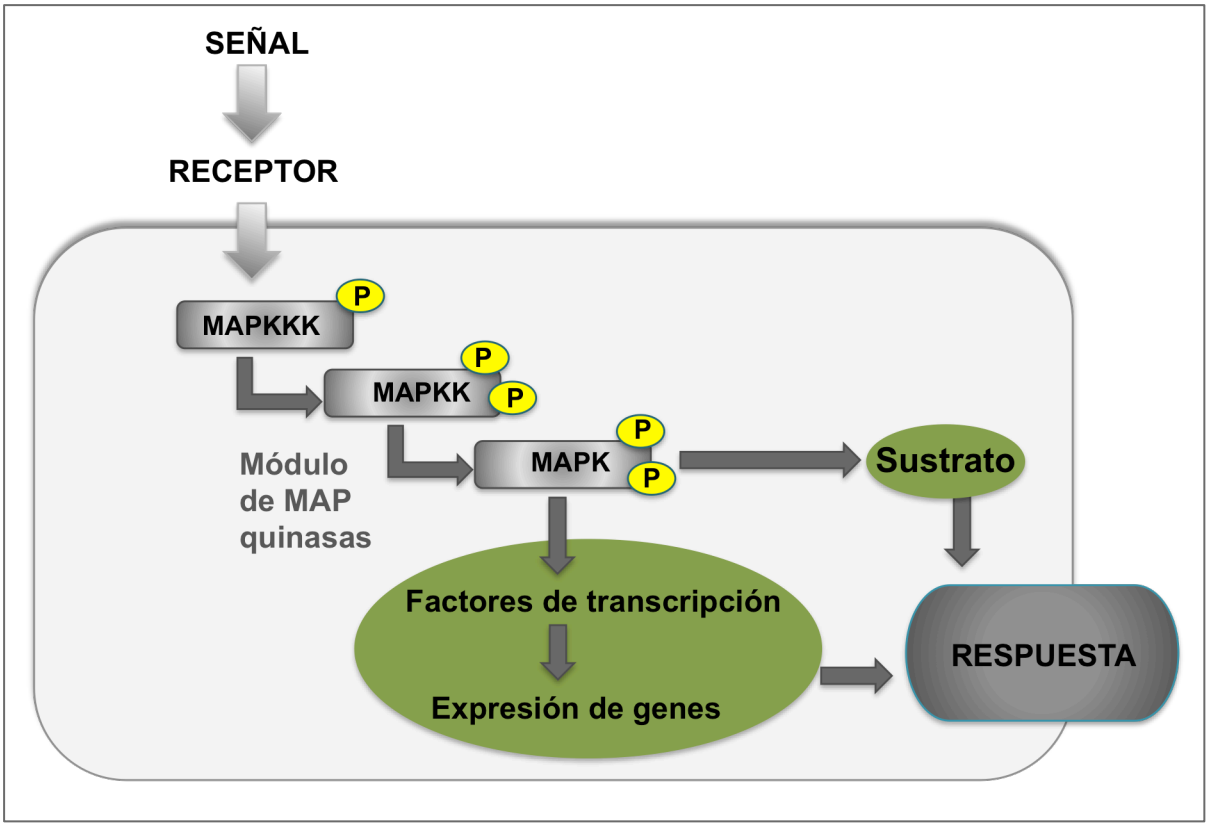


Figura 1.16 El módulo de MAP quinasas y la transmisión de señales

1.6.1.3 Efectores de MAP Quinasas

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

1.6.1.4 Reguladores de MAP Quinasas

Una de las principales características de la respuesta a estrés es el elevado grado de plasticidad y especificidad en la función y activación de las MAP quinasas, y que viene determinado por distintos mecanismos. El más importante es la interacción física secuencial entre los distintos miembros de una ruta, aunque también existen proteínas adaptadoras que agrupan los tres componentes de la cascada en un módulo específico. Además, la localización subcelular diferencial de los componentes de la ruta también modula su función, constituyendo otro mecanismo esencial de regulación de su actividad biológica (Paul *et al*., 1997).

Una vez que las células se han adaptado a las nuevas condiciones, la cascada de MAP quinasas debe ser desactivada por reguladores negativos que limitan la duración e intensidad de la señal (Karin y Hunter, 1995). Los principales reguladores negativos son las fosfatasas de MAP

quinasas (MKPs), que pueden presentar especificidad dual o desfosforilar específicamente residuos de tirosina (fosfatasas de tirosina), o de serina y treonina (fosfatasas de serina y treonina) (Farooq y Zhou, 2004).

1.6.2 Conservación evolutiva

Las rutas de MAPKs regulan en mamíferos multitud de procesos celulares como diferenciación, movilidad, proliferación y apoptosis, y se dividen en tres grupos: ERK, p38 y JNK (Figura 1.17). ERK y p38 presentan homólogos en levaduras, mientras que las MAPKs de tipo JNK solamente se han descrito en humanos (Davis, 2000). ERK1 y ERK2 están relacionadas con la regulación de la diferenciación y proliferación celular, mientras que JNK y p38 participan en las respuestas celulares frente al estrés y la apoptosis (Schaeffer y Weber, 1999), y son conocidas como SAPKs ("*Stress Activated Protein Kinases"*).

En *S. cerevisiae* se han identificado cinco rutas de MAPKs (Figura 1.17). De ellas, cuatro están presentes en células vegetativas, y son: FUS3, que regula la respuesta a feromonas y la conjugación; KSS1, que participa en filamentación e invasividad; HOG1, que controla el crecimiento en condiciones de alta osmolaridad; y SLT2/MPK1, implicada en la regulación de la integridad celular. La quinta ruta, controlada por la quinasa SMK1, regula la síntesis de la pared de ascosporas (Krisak *et al*., 1994) (Figura 1.17). En *S. pombe* solamente se han descrito tres rutas de MAPKs, y que se conocen como: la ruta de respuesta a feromonas, cuya MAPK es Spk1; la ruta de respuesta a estrés o SAPK, en la que la MAPK es Sty1, y la ruta de integridad celular, cuyo elemento central es la MAPK Pmk1 (Figura 1.17).

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

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

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

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la ruta SAPK en el ciclo vital de *S. pombe*, ya que su pérdida de función provoca graves defectos en el control del ciclo celular y en la respuesta general de la levadura frente a distintas situaciones de estrés (Warbrick y Fantes, 1991; Shiozaki y Russell, 1995; Millar *et al*., 1995; Soto *et al*., 2002; George *et al*., 2007). El elemento central de la ruta SAPK es la MAPK Sty1, también denominada Spc1 o Phh1 (Shiozaki y Russell, 1995; Millar *et al*., 1995; Kato *et al*., 1996). Los principales componentes de esta ruta se describen a continuación (Figura 1.18).

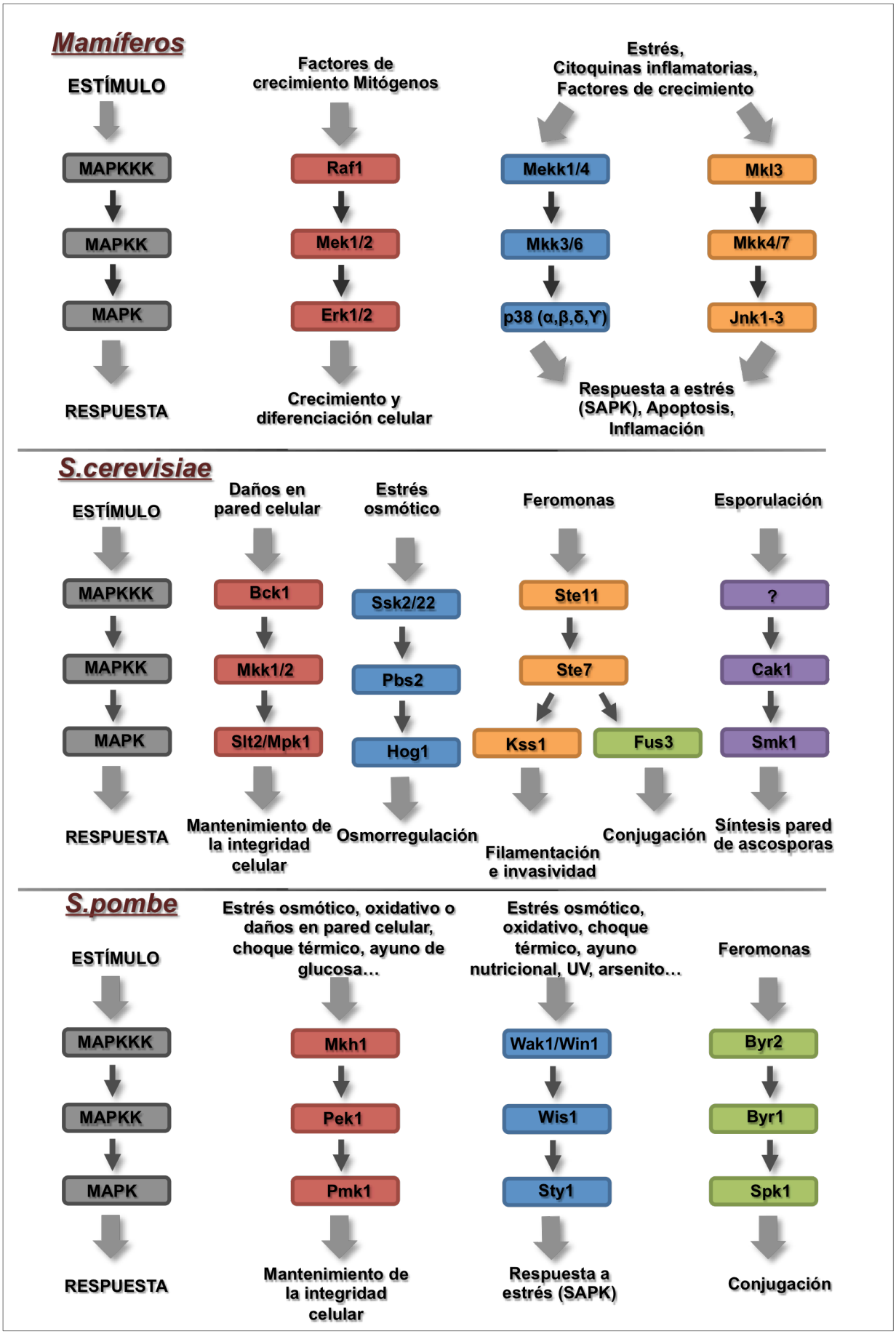


Figura 1.17 Conservación evolutiva de las rutas de MAP quinasas

1.6.3.1 Sensores

En la actualidad se desconocen los sensores implicados en la detección y señalización de la mayoría de los estreses que activan la ruta SAPK, excepto en el estrés oxidativo inducido por H_2O_2, en cuyo caso la señal es transmitida a través de una variante del sistema bacteriano de dos componentes. Se trata de un sistema fosfotransferasa compuesto por dos histidín quinasas (Mak2 y Mak3), la proteína Mpr1/Spy1 (transmisora de grupos fosfato a través de histidinas), y el regulador de respuesta Mcs4 (Shieh *et al*., 1997; Shiozaki *et al*., 1997; Quinn *et al*., 2002) (Figura 1.18). En respuesta a H_2O_2, Mak2 y Mak3 se autofosforilan, y por medio de la proteína Mpr1 se transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta Mcs4, que a su vez activa la cascada de MAPKs.

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

1.6.3.2 Regulador de respuesta Mcs4

Mcs4 está implicado en la detección de estrés oxidativo y su transmisión a través del sistema de dos componentes (Santos y Shiozaki, 2001), aunque su presencia es necesaria para la activación de Sty1 en respuesta a cualquier tipo de estrés (Soto *et al*., 2002; Buck *et al*., 2001). Mcs4 interacciona físicamente con Mpr1, Tdh1, y las MAPKKKs de la ruta SAPK Wak1 y Win1. Recientemente se ha demostrado que aunque Mcs4 es el único regulador de respuesta de la ruta SAPK, muestra una función dual en la señalización durante estrés. Por una parte recibe el estrés oxidativo originado por peróxido a través del sistema de multicomponentes Mak2/Mak3-Mpr1 para finalmente activar a Wis4 y Win1. Por otra parte, debe estabilizar el complejo heteromérico que se forma entre las MAPKKKs, cuya integridad promueve la interacción física con la MAPKK Wis1 y, con ello permitir la activación de la MAPK Sty1. Por lo tanto, el complejo Mcs4-MAPKKKs parece actuar como una plataforma estabilizadora que modula la correcta señalización a través de la ruta SAPK en respuesta a estrés (Morigasaki *et al*., 2013).

1.6.3.3 Módulo de MAP quinasas

1.6.3.3.1 MAPKK quinasa Wak1 y Win1

Wak1 (también conocida como Wis4 o Wik1) y Win1 son las dos MAPKKKs que forman parte del módulo de la ruta SAPK en *S. pombe*. En respuesta a estrés Mcs4 se une y activa a Wak1 y Win1, que a su vez fosforilan a la MAPKK Wis1, y ésta a Sty1 (Shieh *et al*., 1997; Samejima *et al*., 1997, Morigasaki *et al*., 2013) (Figura 1.18). Curiosamente, en determinadas situaciones (bajos niveles de peróxido de hidrógeno, estrés osmótico, o respuesta a bajas temperaturas) no es necesaria la participación simultánea de ambas MAPKKs para la activación de la ruta (Soto *et al*., 2002; Shiozaki *et al*., 1998, Quin *et al.*, 2002).

1.6.3.3.2 MAPK quinasa Wis1

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

1.6.3.3.3 MAP quinasa Sty1

El elemento central de la ruta SAPK es la MAPK Sty1/Spc1/Phh1 (Shiozaki y Rusell, 1995; Millar *et al*., 1995, Kato *et al*., 1996). La forma fosforilada de Wis1 se asocia y fosforila a Sty1 en sendos residuos de treonina (Thr-171) y tirosina (Tyr-173) del motivo conservado -TGY- (treonina-glicina-tirosina) en respuesta a distintas condiciones ambientales adversas, como el estrés osmótico, choque térmico, estrés oxidativo, estrés por bajas temperaturas, o limitación de glucosa y/o nitrógeno, (Shiozaki y Russell, 1995; Millar *et al*., 1995; Soto *et al*., 2002; George *et al*., 2007; Quinn *et al*., 2002; Rodríguez-Gabriel y Russell; 2005; Shiozaki y Russell, 1996; Degols *et al*., 1996; Degols y Russell, 1997; Soto *et al*., 2007) (Figura 1.18).

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

1.6.3.3.4 Efectores de la ruta SAPK

Entre los distintos efectores de la ruta SAPK y destaca el factor de transcripción Atf1. Atf1 es ortólogo a ATF-2 de células superiores, y su ausencia provoca en *S. pombe* defectos durante la diferenciación sexual y una sensibilidad moderada frente al estrés oxidativo y osmótico, de manera análoga al mutante *sty1*Δ. Una vez penetra en el núcleo, la forma activa de Sty1 se asocia y fosforila a Atf1 (Shiozaki y Russell, 1996). Una vez fosforilado, Atf1 regula la expresión de los genes necesarios para la respuesta adaptativa de *S. pombe* frente a diferentes tipos de estrés, así como la entrada en meiosis, y que constituyen la denominada "CERS" **(**"*Core Enviromental Stress Response*") (Chen *et al*., 2007). Además, se ha descrito que la fosforilación de Atf1 por Sty1 tiene como finalidad aumentar la estabilidad del factor de transcripción (Lawrence *et al*., 2007) (Figura 1.18).

Otros efectores relevantes de la ruta SAPK y de Sty1 incluyen distintas proteínas de unión a ARN (Csx1, Upf1, Cip1 y Cip2), factores reguladores de la traducción (eIF2α, eEF2, eIF3a) y proteínas quinasas (Cmk2, Srk1 y Plo1) (Cansado y Pérez, 2011) **(**Figura 1.18).

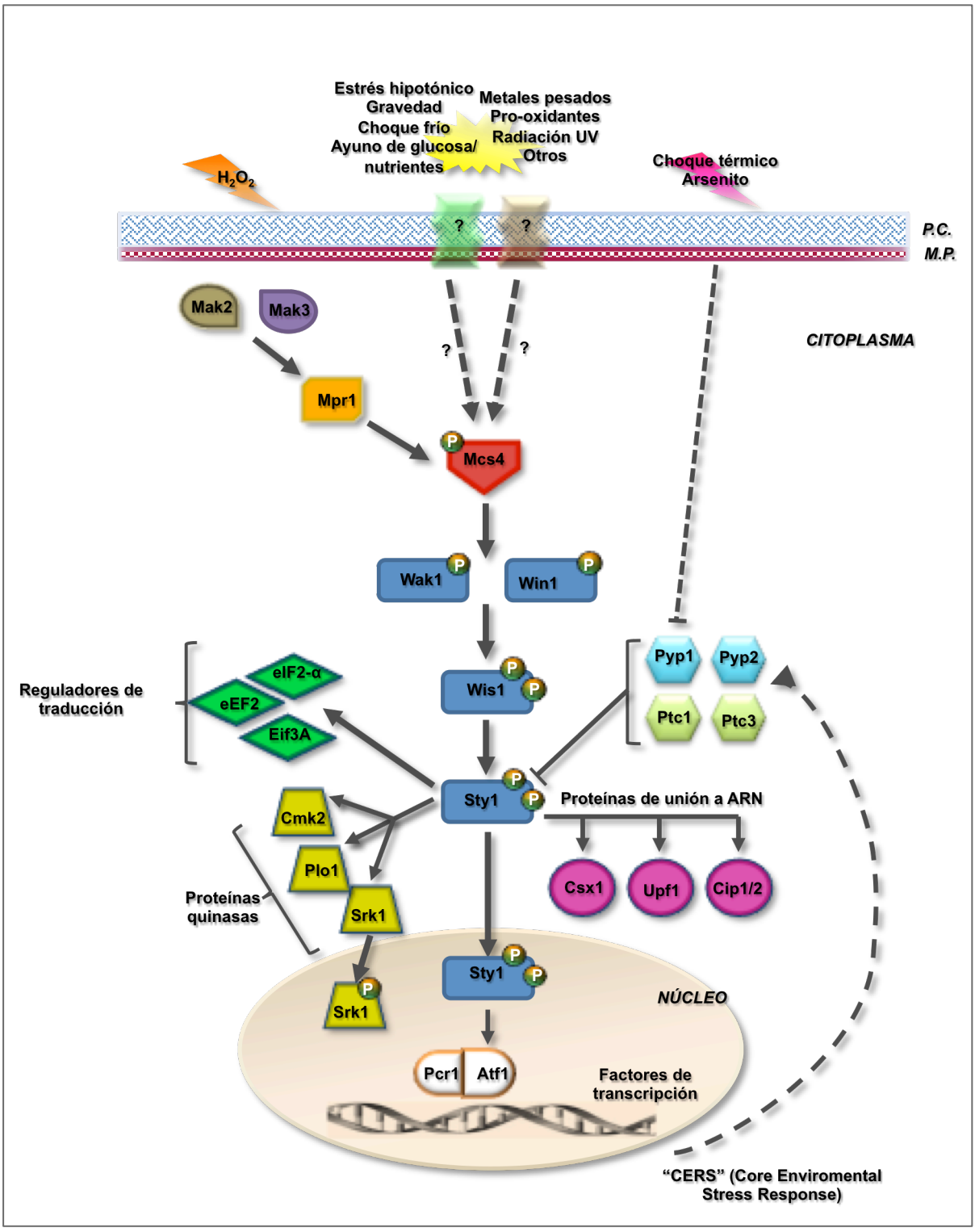


Figura 1.18 La ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*

1.6.3.4 Reguladores negativos de la ruta SAPK

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

En *S. pombe* las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2, y las fosfatasas de serina y treonina Ptc1 y Ptc3 desfosforilan a Sty1 *in vivo* (Figura 1.18). Pmp1, la única fosfatasa de especificidad dual existente en este organismo solamente regula negativamente a Pmk1, la MAPK de la ruta de integridad celular (Sugiura *et al*., Toda, 1998; Madrid *et al*., 2007). Pyp1 y Pyp2 presentan localización núcleo-citoplasmática tanto en crecimiento vegetativo como en situaciones de estrés (Gaits y Russel, 1999), y se unen y desfosforilan *in vivo* a Sty1 en el residuo de tirosina-173 (Millar *et al*., 1995; Degols y Shiozaki, 1996). Pyp1 es la principal responsable de la desactivación de Sty1 en células en crecimiento, mientras que la desforforilación en situaciones de estrés es realizada conjuntamente por Pyp1 y Pyp2 (Shiozaki y Russel, 1995; Millar *et al*., 1995). La expresión basal del gen *pyp1*+, así como la inducción por estrés de $pyp1^{+}$, $pyp2^{+}$, y $ptc1^{+}$, es regulada por Sty1-Atf1 (Figura 1.18), constituyendo un mecanismo de retroalimentación negativa (Wilkinson *et al*., 1996; Shiozaki y Russel, 1996; Degols y Shiozaki, 1996; Gaits *et al*., 1997).

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

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

Esta ruta, cuyo elemento central es la MAP quinasa Pmk1/Spm1, es esencial para el control de la integridad celular en *S. pombe*, participando en procesos como la construcción y mantenimiento de la pared celular, la citocinesis, la morfogénesis, la fusión de vacuolas durante el estrés hipotónico, y la homeostasis iónica (Toda *et al*., 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sugiura *et al*., 1999; Loewith *et al*., 2000; Madrid *et al*., 2006) (Figura 1.19). La ausencia Pmk1 o de alguno de los componentes del módulo de MAPK provoca en *S. pombe* defectos severos durante la citocinesis (multiseptación) o la fusión de vacuolas, hipersensibilidad frente al estrés osmótico, y a daños en la

pared celular (Toda *et al.*, 1996; Sengar *et al*., 1997; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sugiura *et al*., 1999; Loewith *et al*., 2000). A continuación se describen los principales componentes de esta ruta de señalización y su relevancia biológica.

1.6.4.1 Sensores

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

1.6.4.2 Reguladores aguas arriba de módulo de MAP quinasas

1.6.4.2.1 Las GTPasas Rho1 y Rho2 y los ortólogos a PKC Pck1 y Pck2

En 2006 Ma y colaboradores demostraron que Rho2 y Pck2, junto con Cpp1, actúan aguas arriba de la cascada de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe* (Ma *et al*., 2006) (Figura 1.19). Rho2 es farnesilado *in vivo* en el residuo de cisteína-197 del motivo -CAAX por la farnesiltransferasa Cpp1, permitiendo su anclaje a la membrana plasmática y la correcta activación de la ruta (Ma *et al*., 2006). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que el residuo de cisteína-196 de Rho2 se encuentra además palmitoilado *in vivo*, y que dicha modificación es esencial para ejercer sus funciones biológicas (Sánchez-Mir *et al.*, 2014a). Mediante estudios de microscopía y fraccionamiento subcelular en gradientes de densidad hemos confirmado que la localización de Rho2 en la membrana plasmática está fuertemente alterada en mutantes que expresan una versión no palmitoilable de la GTPasa, redistribuyéndose hacia estructuras endomembranosas (Golgi, endosomas, etc.). Además, los mutantes no palmitoilables de Rho2 son incapaces de regular correctamente la construcción de la pared celular y de transmitir la señal de activación hacia Pmk1 en respuesta a distintos estreses. Ello confirma la existencia de un modelo no-compartimentalizado por el que Rho2 controla ambos procesos exclusivamente desde la membrana plasmática (Sánchez-Mir *et al.*, 2014a). La letalidad asociada a la sobre-expresión de $rho2^{+}$ es consecuencia de la hiperactivación de la ruta de integridad celular, y es suprimida tras la interrupción de $pck2^{+}$ o de alguno de los componentes del módulo de MAP quinasas (Ma *et al*., 2006).

Por lo tanto, Rho2 regula positivamente la activación del módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 fundamentalmente por medio de Pck2 (Ma *et al*., 2006) (Figura 1.19).

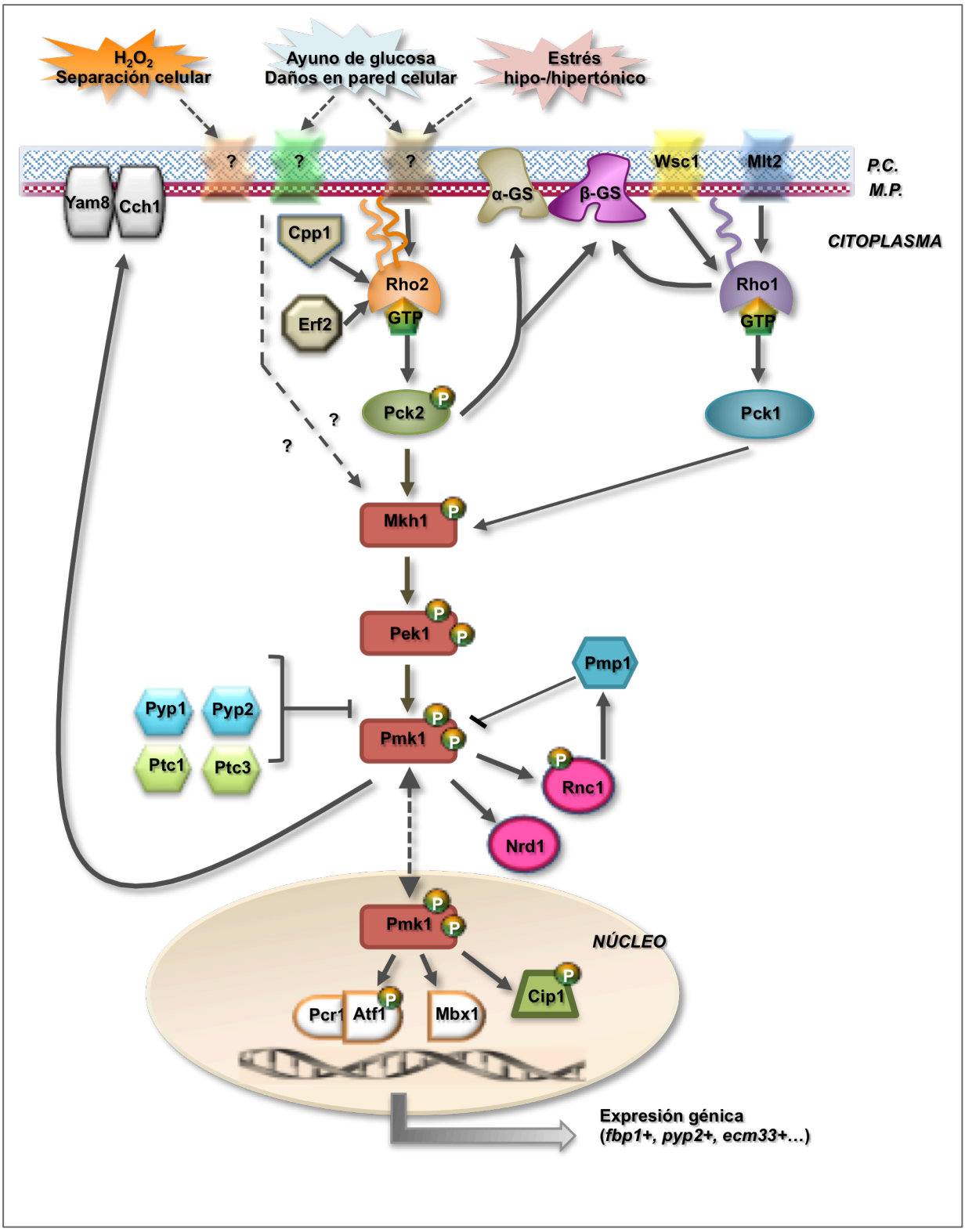


Figura 1.19 La ruta de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe*

Por otra parte, la capacidad de Rho1 de suprimir alguno de los fenotipos asociados a la falta de Rho2, y la activación residual de Pmk1 observada en ausencia de Rho2 o Pck2 (Barba *et al*., 2008), apuntaban a Rho1 como posible activador alternativo de la ruta de integridad celular. Además, se había descrito que Rgf1 (GEF de Rho1) regula la activación de Pmk1 favoreciendo la activación de la GTPasa esencial Rho1 (García *et al*., 2009). En efecto, nuestro grupo ha confirmado recientemente que Rho1 y Pck1, el segundo ortólogo a PCK, regulan la ruta de Pmk1 de forma aditiva y/o alternativa a Rho2 y Pck2. Mediante el empleo de un mutante que expresa un alelo hipomórfico de Rho1 (*Rho1-596*) hemos demostrado que Rho1 y Rho2 regulan independientemente a Pck2 para mantener la actividad basal de Pmk1 durante el crecimiento vegetativo (Viana *et al.*, 2014). En este modelo Pck1 regularía la actividad de Pmk1 asociándose con Mkh1 (la MAPKKK de la ruta), y actuando como diana específica de Rho1 únicamente en respuesta al daño en la pared celular (Viana *et al.*, 2014; Sánchez-Mir *et al.*, 2014b). Este resultado fue inesperado ya que evidencias genéticas y bioquímicas obtenidas previamente sugerían que Pck1 participaba en el control de la integridad celular en paralelo a Rho2-Pck2-Pmk1 (Ma *et al*., 2006), o como regulador negativo de dicha ruta (Barba *et al*., 2008) (Figura 1.19).

Curiosamente, la activación de la ruta de integridad celular en respuesta a la limitación de glucosa tiene lugar a través de Pck2 por medio de un mecanismo desconocido que es independiente de la actividad de Rho1 y/o Rho2 (Madrid *et al.*, 2013). Este mecanismo permite la adaptación celular frente a este estrés nutricional reforzando la actividad de la ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) (Madrid *et al.*, 2013).

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

1.6.4.3 Módulo de MAP quinasas

El módulo de MAP quinasas de la ruta de integridad celular está formado por la MAPKKK Mkh1, la MAPKK Pek1/Skh1 y la MAPK Pmk1/Spm1. En respuesta a distintos estímulos externos se produce la fosforilación secuencial de los distintos componentes del módulo (Figura 1.19).

1.6.4.3.1 MAPKK quinasa Mkh1

Mkh1 ("*Mek Kinase Homolog 1"*) fue identificada como la MAPKKK de la ruta de integridad en *S. pombe* gracias a su alto grado de identidad con la MAPKKK Bck1 de *S. cerevisiae,* y por otra parte, a que su ausencia provoca los mismos fenotipos que la falta de Pek1 o Pmk1 (Sengar *et al*., 1997; Madrid *et al*., 2006). Mkh1 es fosforilada ocasionalmente por Pck1 (daño en la pared celular), y fundamentalmente por Pck2, transmitiendo la señal de activación al resto de componentes del módulo

mediante su interacción *in vivo* con la MAPKK Pek1 y la MAPK Pmk1, formando un complejo ternario (Loewith *et al*., 2000; Madrid *et al*., 2006; Sánchez-Mir *et al.*, 2014b).

1.6.4.3.2 MAPK quinasa Pek1

El gen *pek1*$^{+}$ (*"pombe mEK 1"*), también denominado *skh1*$^{+}$, codifica en *S. pombe* la única MAPKK de la ruta de integridad celular, y muestra un 46% de identidad con Mkk1 y Mkk2, las MAPKKs de la ruta análoga en *S. cerevisiae*.

Pek1 es fosforilada y activada por Mkh1 en respuesta a los distintos estímulos activadores de la ruta (Sugiura *et al*., 1999) (Figura 1.19). Cabe destacar que en células no estresadas la forma inactiva de Pek1 se une a Pmk1, actuando como un inhibidor de la señalización. Esta función dual de Pek1 según su estado de fosforilación le permite actuar como un interruptor molecular dando lugar a una respuesta del tipo "todo o nada" (Sugiura *et al*., 1999).

1.6.4.3.3 MAP quinasa Pmk1

La MAPK Pmk1/Spm1 (*"S. pombe MAP kinase 1")* fue caracterizada como un homólogo estructural de MPK1/SLT2 de *S. cerevisiae,* y constituye el elemento central de la ruta de integridad celular en *S. pombe* (Toda *et al.*, 1996; Sengar *et al*., 1997). Pmk1 es fosforilada de manera dual por Pek1 en dos residuos conservados de treonina y tirosina en las posiciones 186 y 188 del motivo de activación –TEY- (Sugiura *et al*., 1999; Loewith *et al*., 2000; Madrid *et al*., 2006). La activación de Pmk1 es completamente dependiente de Mkh1 y Pek1, indicando que se trata de un módulo de transmisión lineal no ramificado (Figura 1.19) (Madrid *et al*., 2006).

Pmk1 es ortóloga a las MAPKs humanas ERK1 y ERK2 que forman parte de la cascada clásica de quinasas activadas por mitógenos, y que se activan en respuesta a factores de crecimiento, ésteres de forbol, y en menor medida por estrés osmótico o citoquinas (Schaeffer y Weber, 1999). Aunque inicialmente se creía que Pmk1 se activaba únicamente en respuesta a temperaturas elevadas o tras el tratamiento con cloruro sódico, nuestro grupo ha descrito que también se activa en respuesta a distintas situaciones adversas, como el estrés hiper- e hipo-osmótico, el ayuno de glucosa, el daño a la pared celular inducido con caspofungina (una equinocandina que inhibe la actividad de las β-glucan sintasas de la pared celular), y el estrés oxidativo mediado por hidroperóxidos o agentes pro-oxidantes (Figura 1.19) (Madrid *et al*., 2006; Soto *et al*., 2007; Barba *et al*., 2008). Los mutantes de *S. pombe* carentes de Pmk1 son sensibles a la mayoría de los estreses que inducen su activación, por lo que su función es necesaria para la adaptación y supervivencia celulares frente a tales condiciones.

Tal como se ha comentado anteriormente, y a diferencia del modelo de *S. cerevisiae*, los elementos que actúan aguas arriba del módulo de MAP quinasas y Pmk1 pueden actuar o no como reguladores de la ruta dependiendo del tipo de estrés (Barba *et al*., 2008; Sánchez-Mir *et al*., 2014b). Así, mientras que la activación de Pmk1 inducida por los estreses hipo- e hipertónico depende

totalmente de la señalización mediada por Rho2-Pck2 (Figura 1.19), la activación durante la separación celular o el tratamiento con peróxido de hidrógeno es completamente independiente de ambas proteínas (Figura 1.19) (Barba *et al*., 2008; Madrid *et al.,* 2013). Otros estreses, como el ayuno de glucosa o el daño de la pared celular pueden ser canalizados a través de Pck2 o por medio de rutas alternativas que implican a Rho1 y/o Pck1 (Figura 1.19) (Barba *et al*., 2008; Madrid *et al*., 2013; Sánchez-Mir *et al*., 2014b).

Mkh1 (MAPKKK) y Pek1 (MAPKK) son proteínas esencialmente citoplasmáticas, aunque también localizan en el septo durante la citocinesis. Sin embargo**,** Pmk1 (MAPK) presenta localización núcleo/citoplasmática, así como en el huso mitótico, el corpúsculo polar del huso (SPB), y el septo (Madrid *et al*., 2006). Contrariamente al modelo descrito para ERK1/2 en mamíferos, la localización de Pmk1 no se modifica en respuesta a estrés ni en ausencia de Mkh1 ni Pek1, lo que sugiere que su activación tiene lugar en el citoplasma y/o septo, y que tanto las formas activa como inactiva de la MAPK son capaces de translocarse al núcleo (Madrid *et al*., 2006). Nuestro grupo ha analizado la relevancia biológica de la localización nuclear de Pmk1 mediante la obtención de un mutante que expresa una versión de la MAP quinasa anclada a la membrana plasmática y excluida constitutivamente del núcleo. Los resultados obtenidos indicaron que la exclusión nuclear de Pmk1 no afectó significativamente a su función reguladora de la homeostasis iónica, la activación de Pmk1 inducida por estrés, la fusión de vacuolas, o citoc**i**nesis, ya que todos estos procesos se ejecutaron de forma similar tanto en células control como en aquellas que expresan la versión de la proteína anclada en la membrana plasmática (Sánchez-Mir *et al*., 2012). Por el contrario, Pmk1 presente en el núcleo regula el mantenimiento de la integridad celular en *S. pombe* fundamentalmente a nivel transcripcional. Adicionalmente, la regulación negativa de Pmk1 a nivel nuclear es realizada por fosfatasas específicas inducidas por la ruta SAPK (ver a continuación), lo que condiciona su actividad a nivel extranuclear (Sánchez-Mir *et al*., 2012). Estor resultados sugieren que el control de la actividad de Pmk1 a nivel espacial determina en gran medida sus funciones biológicas.

1.6.4.4 Efectores de la ruta de integridad celular

1.6.4.4.1 Proteínas de unión a ARN: Rnc1 y Nrd1

Rnc1 ("*RNA-binding protein that supresses calcineurin deletion 1"*), participa en la regulación de Pmp1, la fosfatasa dual específica de Pmk1, uniéndose a su mRNA y estabilizándolo (Sugiura *et al*., 2003). Pmk1 en su estado activo fosforila a Rnc1, que su vez estabiliza a Pmp1. Es decir, Rnc1 regula negativamente la actividad de Pmk1 por medio de Pmp1 (Sugiura *et al*., 1998 y 2003) (Figura 1.19).

Nrd1 regula la citocinesis mediante la unión y estabilización del mRNA del gen *cdc4*$^{+}$ (cadena ligera de la miosina II). Pmk1 en su forma activa se une y fosforila a Nrd1, impidiendo su unión al

mRNA de *cdc4*$^{+}$, lo que promueve su desestabilización (Satoh *et al*., 2009). La fosforilación de Nrd1 por Pmk1 es dependiente de la fase del ciclo celular (Satoh *et al*., 2009).

1.6.4.4.2 Factores de transcripción: Atf1 y Mbx1

Tal como se comentó anteriormente, Atf1 es un factor transcripcional clave en la respuesta a estrés de *S. pombe* cuya actividad es regulada fundamentalmente por la ruta SAPK. Sin embargo también es fosforilado por Pmk1 en ciertas condiciones, como en respuesta a daños en la pared celular (Takada *et al*., 2007) (Figura 1.19). Además, Pmk1 refuerza a la ruta SAPK en respuesta a la limitación de glucosa por medio de Atf1, activando la expresión de los genes que intervienen en la adaptación al metabolismo respiratorio como *fbp1*$^{+}$ o *pyp2*$^{+}$ (Madrid *et al*., 2013). Por tanto, Atf1 actúa como efector común y nexo de unión entre ambas rutas de MAP quinasas en contextos biológicos concretos.

Mbx1 es un factor de transcripción que en *S. pombe* regula la expresión génica durante la transición M-G1 del ciclo celular (Papadopoulou *et al*., 2008). Mbx1 participa en la ruta de integridad celular mediante la regulación de la inducción del gen *ecm33*$^{+}$, que codifica una proteína de pared celular con motivo GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (Takada *et al*., 2010). La expresión de *ecm33*$^{+}$ se induce en presencia de agentes que dañan la pared celular (Jung y Levin, 1999), y en respuesta a los mismos estreses que activan a Pmk1, siendo su inducción regulada tanto por Atf1 como por Mbx1 (Takada *et al*., 2010) (Figura 1.19).

1.6.4.4.3 Canal iónico: Cch1-Yam8

Los genes *yam8*$^{+}$ y *cch1*$^{+}$ codifican las subunidades de un canal de calcio (Ca^{2+}) presente en la membrana plasmática de *S. pombe*. En presencia de sales (NaCl, KCl, o $MgCl_2$) o de compuestos que causan daño en la pared celular se produce la activación de la ruta de integridad celular, de manera que la forma activa de Pmk1 fosforila y activa a Cch1, produciendo la apertura del canal formado por el complejo Cch1-Yam8, y permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula (Figura 1.20). El aumento de los niveles intra-citoplasmáticos de Ca^{2+} promueve a su vez la activación de la calcineurina (Ppb1), que desfosforila a Cch1 causando el cierre del canal. Por tanto, la sensibilidad salina que presentan los mutantes con niveles elevados de fosforilación de Pmk1 es debida al efecto dañino que provoca el aumento de la entrada de Ca^{2+} en la célula como consecuencia de la hiperactivación del canal Cch1-Yam8 (Ma *et al*., 2011).

La falta de Ppb1 o su inactivación farmacológica en presencia de FK506 (un inhibidor específico de la calcineurina) también provoca hipersensibilidad salina, y puede ser suprimida en ausencia de los principales elementos de la ruta (Rho2, Pck2, Mkh1, Pek1 o Pmk1), al impedir la entrada de Ca^{2+} en la célula (Ma *et al*., 2011). Este fenotipo, denominado "VIC" ("*Viable in the presence of inmunossuppresant and chloride ion"*), es un marcador característico de los mutantes que

presentan defectos en la actividad de la ruta de integridad celular y es utilizado frecuentemente para el rastreo e identificación de mutantes afectados en su función.

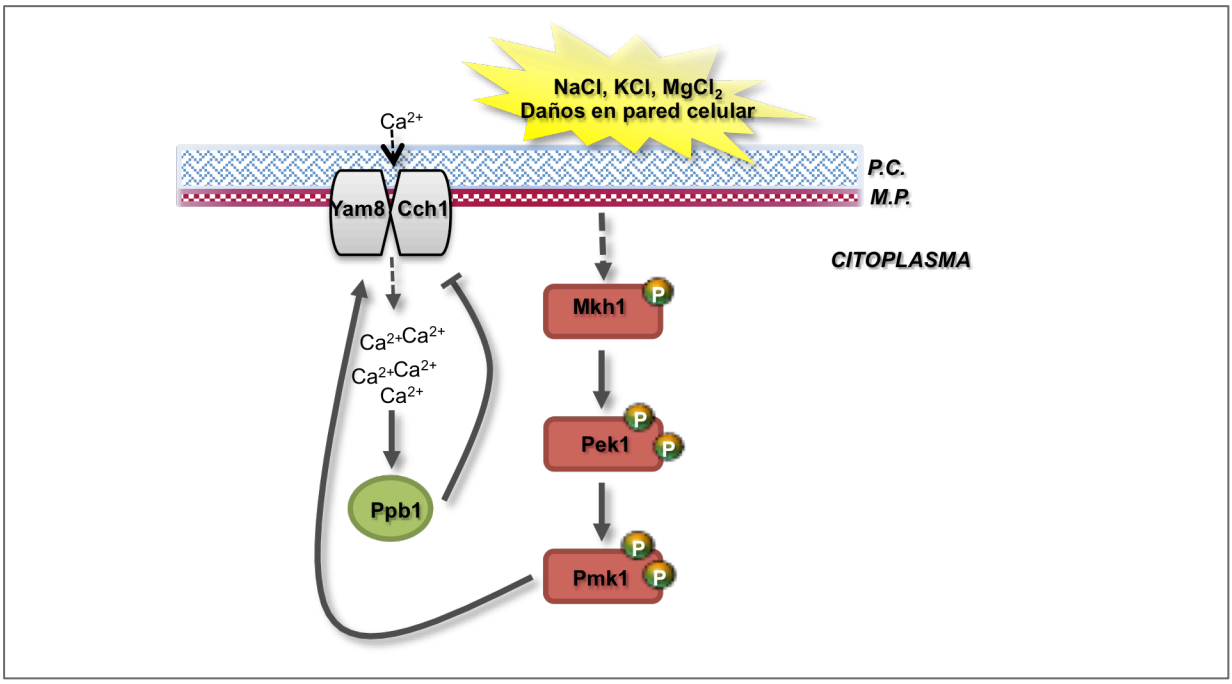


Figura 1.20 Regulación antagónica de la concentración de Ca^{2+} intracelular por parte de Pmk1 y Ppb1

1.6.4.4.4 Proteínas reguladoras de ciclo celular: Clp1

Clp1 es un ortólogo de la fosfatasa esencial Cdc14 de *S. cerevisiae*. En células vegetativas Clp1 localiza en el nucléolo, "liberándose" de este orgánulo para acceder a sus sustratos en respuesta a daños en el ADN, o durante el estrés oxidativo mediado por H_2O_2 (Díaz-Cuervo y Bueno, 2008). Recientemente se ha demostrado que Pmk1 fosforila a Clp1, y que su ausencia retrasa la liberación de Clp1 del nucléolo durante el tratamiento con H_2O_2. Por tanto, la fosforilación de Pmk1 sobre Clp1 contribuye a la regulación temporal de este proceso (Broadus y Gould, 2012).

1.6.4.5 Regulación negativa de la ruta de integridad celular

Pmp1 es el principal regulador negativo de la MAP quinasa Pmk1 (Sugiura *et al*., 1998). Se trata de una fosfatasa de especificidad dual capaz de unirse e inactivar a Pmk1 desfosforilando los residuos Thr186 y Tyr188 de la MAP quinasa. Los niveles de expresión de *pmp1*$^+$ son constantes a lo largo del ciclo celular y no varían en situaciones de estrés. Tal como se ha comentado, la estabilidad del mRNA de *pmp1*$^+$ depende de su unión a la proteína de unión a RNA Rnc1, que es fosforilada por Pmk1 (Sugiura *et al*., 2003).

Además de Pmp1, las tirosín fosfatasas Pyp1 y Pyp2, así como las serín/treonín fosfatasas Ptc1 y Ptc3 son capaces de unirse y desfosforilar a Pmk1 *in vivo* (Madrid *et al*., 2007) (Figura 1.19).

El papel de cada una de estas fosfatasas en la regulación de la actividad de Pmk1 depende del estado fisiológico de las células. Pyp1 y Ptc1 regulan el nivel de fosforilación de Pmk1 tanto en condiciones basales como en respuesta a estrés osmótico, mientras que Pmp1 sólo lo hace en crecimiento vegetativo, y Pyp2 durante el estrés osmótico (Madrid *et al*., 2007).

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

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

El primer punto de interconexión entre ambas rutas viene dado por las fosfatasas Pyp1, Pyp2, Ptc1 y Ptc3, cuya activación transcripcional es dependiente de la actividad de la ruta SAPK por medio de Sty1 y Atf1, y que además de regular negativamente a Sty1, son capaces de desfosforilar a Pmk1 (Figura 1.18 y 1.19) (Madrid *et al*., 2007). Estudios posteriores confirmaron la relevancia de la ruta SAPK en la regulación negativa de la actividad de Pmk1 mediante la caracterización de la proteína ribosómica Cpc2, ortólogo a RACK1 ("*Receptor of Activated protein C Kinase"*) en eucariotas superiores. La unión de Cpc2 a la subunidad 40S del ribosoma es esencial para la traducción, entre otros, de los mRNAs de Pyp1 y Pyp2 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés (Figura 1.21), regulando el nivel de fosforilación de Sty1 y Pmk1 (Núñez *et al*., 2009)

Por último, el factor transcripcional Atf1 define un segundo punto de interacción entre ambas rutas en condiciones de estrés por daños en la pared celular y en la adaptación celular en ausencia de glucosa (Figura 1.21). En el primer caso, Atf1 es fosforilado tanto por Sty1 como por Pmk1 (Takada *et al*., 2007). En el segundo, Pmk1 incrementa la actividad de la ruta SAPK activando a Atf1 y favoreciendo la transmisión de la señal aguas arriba de Sty1 (Madrid *et al*., 2013). Ello sugiere que la ruta de integridad celular actúa como refuerzo de la ruta SAPK en el control de la supervivencia y adaptación celular frente a ciertas condiciones de estrés (Madrid *et al*., 2013).

2. OBJETIVOS

Justificación y Objetivos

Las proteínas quinasas C (PKC) constituyen un numeroso grupo de enzimas implicadas en rutas de transducción de señales en células eucariotas, y que en organismos superiores participan en multitud de funciones fisiológicas como la proliferación y diferenciación celular, la regulación del metabolismo, la organización el citoesqueleto de actina, o la apoptosis. Su activación es dependiente de fosforilación en una serie de motivos conservados del dominio de activación situado en su extremo carboxilo terminal y que se conocen como bucle de activación, motivo de giro y motivo hidrofóbico. La quinasa dependiente de fosfoinosítidos PDK-1 es la responsable de la fosforilación *in vivo* del bucle de activación de la mayoría de las PKCs, mientras que la fosforilación del motivo de giro e hidrofóbico puede tener lugar mediante autofosforilación o es realizada por la quinasa del complejo mTOR. Sin embargo, en algunos casos la activación catalítica no depende de fosforilación en los motivos citados, lo que revela la existencia de mecanismos alternativos que regulan la fosforilación y activación de este grupo de enzimas.

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* se encuentra más próxima filogenéticamente a las células eucariotas superiores que el resto de las levaduras. Numerosos estudios han confirmado la existencia de una elevada homología funcional en las vías de señalización intracelular entre *S. pombe* y eucariotas superiores, lo que convierte a este eucariota simple en un modelo excelente para investigar distintas respuestas celulares con significación general. *S. pombe* posee dos ortólogos de PKC denominados Pck1 y Pck2 que regulan de forma coordinada la biosíntesis de α y β-glucano de la pared celular, y comparten funciones esenciales durante el crecimiento vegetativo, ya que la doble deleción de ambos genes es letal. Las rutas de señalización mediadas por MAP quinasas se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución y son esenciales durante la respuesta defensiva y/o adaptativa de las células eucariotas frente a distintos estímulos ambientales y situaciones de estrés. En *S. pombe* la ruta de integridad celular, cuyo elemento central es la MAP quinasa Pmk1, es fundamental para la regulación de la construcción de la pared celular, la citocinesis, la morfogénesis, la fusión de vacuolas, y la homeostasis iónica. Aunque Pck2 y la GTPasa Rho2 son los responsables fundamentales de la activación de Pmk1 en respuesta a estrés, la ruta se encuentra ramificada, y recientemente nuestro grupo ha demostrado que la GTPasa esencial Rho1 y Pck1 pueden activar la ruta en situaciones específicas como en respuesta al daño en la pared celular.

Los dominios de activación Pck1 y Pck2 muestran un elevado grado de conservación con los de otras PKCs de células superiores. Ksg1, el ortólogo a PDK1 en la levadura con fisión, es una quinasa esencial que fosforila el bucle de activación de varias quinasas de la familia AGC. Los mutantes que expresan alelos hipomórficos de Ksg1 muestran graves defectos morfológicos; sin embargo actualmente se desconoce su posible papel durante la activación catalítica de Pck2 y Pck1, y

su significación biológica. Al contrario que otros organismos modelo, los mutantes simples *pck1Δ* o *pck2Δ* son viables, por lo que *S. pombe* y la ruta de integridad celular constituyen un sistema biológico ideal para estudiar con precisión los mecanismos regulatorios responsables de su activación. En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el análisis exhaustivo de Pck2, dado que su papel como activador de la ruta de integridad celular es más relevante que el de Pck1.

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

1.- Estudio del papel de la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1) Ksg1 en la activación de la ruta de integridad celular en *S. pombe.*

2.- Análisis de la fosforilación de Pck2 dependiente e independiente de Ksg1, y su relevancia durante la activación de la ruta de integridad celular.

3.- Identificación de los mecanismos responsables de la regulación de los niveles de proteína de Pck2, y su significación biológica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos Utilizados

3.1.1 Cepas 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 3.1. Todas las cepas son *ade- ura4D-18 leu1-32*. Las cepas se construyeron mediante el método estándar de transformación, o por cruzamiento y posterior análisis de los segregantes, tal y como se describe en Moreno *et al*. (1991). Las interrupciones genéticas se realizaron por reemplazamiento del marco de lectura abierto (ORF, *Open Reading Frame*) de interés con el casete KanMX6 o HphMX6 mediante técnicas de recombinación homóloga, según se describe de forma general por Bähler *et al.* (1998). Las fusiones de proteínas a distintos epítopos se realizaron integrando fragmentos de DNA amplificados por PCR que codifican el epítopo y el correspondiente marcador de selección (Bähler *et al*., 1998).

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
L975	h^- protótrofa	Leupold 1950
MI200	h^+ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Madrid *et al*. (2006)
MI102	h^+ *pmk1::kanR*	Madrid *et al*. (2006)
GB3	h^+ *pck2::kanR pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Barba *et al*. (2008)
GB29	h- rho2::kanR pck2::kanR pmk1-HA6H:ura4+	Barba *et al*. (2008)
PPG7.32	h^- *ksg1-208*	Lab stock
MM667	h^- *ksg1-208 pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
JM1250	h^- *sty1-HA6H:ura4*$^+$	JBA Millar
MM677	*ksg1-208 sty1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
PPG5.16	h^- *nmt41-HA-pck1 leu1-32*	Arellano *et al*. (1999)
PPG5.23	h^- *nmt41-HA-pck2 leu1-32*	Arellano *et al*. (1999)
MM913	*h*$^+$ *pck2::kanR pck2-HA:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
MM1100	*ksg1-208 pck2::kanR pck2-HA:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
MM1130	*ksg1-208 pck2::kanR pck2.K712W-HA:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
LSM300	h^+ *rho2::kanR rho2-GFP-CCIIS:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Sánchez-Mir *et al*. (2014)
MM821	*ksg1-208 rho2::kanR rho2-GFP-CCIIS:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
MM916	h^+ *pck2::kanR pck2.T846A-HA:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
MM918	h^+ *pck2::kanR pck2.T842A-HA:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo
MM921	h^+ *pck2::kanR pck2.T842AT846A-HA:leu1*$^+$ *pmk1-HA6H:ura4*$^+$	Este trabajo

Tabla 3.1 Cepas de *Schizosaccharomyces pombe empleadas* en este trabajo

MM929	h$^+$ *pck2::kanR pck2.T842D-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM931	h$^+$ *pck2::kanR pck2.T842AT846AT984A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM982	h$^+$ *pck2::kanR pck2.K712E-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM998	h$^+$ *pck2::kanR pck2.F998AF1001A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1009	h$^+$ *pck2::kanR pck2.T984A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1011	h$^+$ *pck2::kanR pck2.S1002A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM995	h$^+$ *pck2::kanR pck2.S1002E-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM991	h$^+$ *pck2::kanR pck2.S1002D-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1022	h$^+$ *pck2::kanR pck2.K712W-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1042	h$^+$ *pck2::kanR pck2.K712W-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1076	h$^+$ *pck2::kanR pck2.T842AT984AS1002A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1123	h$^+$ *pck2::kanR pck2.T842AT984A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1162	h$^+$ *rho1-596:natR rho2::kanR pck2::hygR pck2-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1372	h$^-$ *ksg1-208 ksg1-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1389	h$^-$ *ksg1-208 ksg1.K128R-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1224	*tor2-51*	Álvarez y Moreno (2006)
MM1225	*tor2-51 pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
LSM400	h$^+$ *rho2::kanR rho2-HA-CCIIS:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Sánchez-Mir *et al*. (2014)
LSM210	h$^+$ *mkh1-12myc:kanR*	Sánchez-Mir *et al*. (2014)
MI401	h$^+$ *pek1-GFP:kanR pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Madrid *et al*. (2006)
MM1194	h$^+$ *tor1::kanR pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1205	h$^+$ *tor1::hphR pck2::kanR pck2-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1460	h$^+$ *tor1::hphR rho2::kanR rho2-HA-CCIIS:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1461	h$^+$ *tor1::hphR mkh1-12myc:kanR*	Este trabajo
MM1462	h$^+$ *tor1::hphR pek1-GFP:kanR*	Este trabajo
MM1257	h$^+$ *tor1::hphR ksg1-208 pck2::kanR pck2-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1207	h$^+$ *tor1::hphR pck2::kanR pck2.T842A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1463	h$^+$ *tor1::hphR pck2::kanR pck2.K712W-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4$^+$*	Este trabajo
MM1209	h$^+$ *tor1::hphR pck2::kanR pck2.T842AT846A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4*	Este trabajo
MM1210	h$^+$ *tor1::hphR pck2::kanR pck2.T842AT984A-HA:leu1$^+$ pmk1-HA6H:ura4*	Este trabajo

Tabla 3.1 Cepas de *S. pombe empleadas* en este trabajo (continuación)

MM1214	h^+ *sin1::ura4*$^+$	Este trabajo
MM1240	h^+ *bit6::kanR*	Este trabajo
MM1241	h^+ *pop3::kanR*	Este trabajo
MM1242	h^+ *ste20::kanR*	Este trabajo

Tabla 3.1 Cepas de *S. pombe empleadas* en este trabajo (continuación)

3.1.2 Cepas de Escherichia coli

La cepa DH5α (Hanahan, 1983) se empleó como hospedadora con el fin de mantener y amplificar los diferentes plásmidos utilizados. Su genotipo es el siguiente:
supE44 ΔlacU169 (Ø80 lacZ ΔM15) hsdR17 recΔ1 endΔ1 gyrΔ96 thi-1 relΔ1

3.2 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%.

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

- **Medio LB** (según Miller, 1972). Se utilizó para el crecimiento rutinario de *E. coli*. Su composición es: triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%.
- **Medio LBA**. Este medio se utilizó para la selección de cepas resistentes a ampicilina. Su composición es similar al medio LB más 100 μg/ml de ampicilina.
- **Medio SOB**. Su composición es triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM y $MgSO_4$ 10 mM.

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

- ***Medio YES*** *(medio rico)* (Gutz *et al.*,1974). Se utilizó 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.
- ***Medio YES 1/2***. Se utilizó en los experimentos de transformación de *S. pombe*. Su composición es: glucosa 1% 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 YES G418***. Se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* transformadas con el casete de resistencia al antibiótico G418. Su composición es la del medio YES más 200 μg/ml de G418.

- ***Medio YES HYG***. Se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* transformadas con el casete de resistencia al antibiótico higromicina. Su composición es la del medio YES más 200 μg/ml de higromicina B.
- ***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. 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 utilizó para la inducción del ayuno de glucosa en *S. pombe*. 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 de aquellas cepas que expresan genes bajo el control del promotor $nmt1^{+}$. En este último caso, el medio se suplementó con tiamina (concentración final de 10-15 μM) para reprimir la expresión génica. La composición del medio es la siguiente: ftalato monopotásico 0,3%, Na_2HPO_4 0,22%, NH_4Cl 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:

  Stock de sales (50X): $MgCl_2$ $6H_2O$ 0,26 M, $CaCl_2$ $2H_2O$ 5 mM, KCl 0,67 M, Na_2SO_4 14 mM.

  Stock de minerales (10.000X): H_3BO_3 81 mM, $MnSO_4$ 23,7 mM, $ZnSO_4$ 7 H_2O 14 mM, $FeCl_3$ 6 H_2O 7,4 mM, MoO_4 $2H_2O$ 2,5 mM, KI 6 mM, $CuSO_4$ 5 H_2O 1,6 mM, ácido cítrico 47,6 mM.

  Stock de vitaminas (1000X): ácido nicotínico 81,2 mM, inositol 55,5 mM, biotina 40,8 mM, ácido pantoténico 4,2 mM.

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

- ***Medio SPA***. Se utilizó para inducir la conjugación y esporulación en *S. pombe*. Su composición es: glucosa 1%, K_2HPO_4 0,1%, $CaCl_2$ 0,074% y agar 3%. El medio se suplementa con vitaminas (igual que en el medio EMM2) y leucina, histidina, adenina y uracilo (100 mg/ml) en aquellos casos en los que la cepa lo requiera.

Cuando fue necesario, los medios empleados para el crecimiento de *S. pombe* se suplementaron con diversos compuestos. El sorbitol, utilizado como estabilizador osmótico, se añadió a la concentración de 1M previamente a la esterilización del medio de cultivo. Los compuestos indicados

se añadieron al medio esterilizado hasta conseguir la concentración final deseada: blanco de calcoflúor, caspofungina, cloruro potásico, cloruro sódico, cloruro magnésico y FK506.

3.3 Condiciones de Cultivo de los Microorganismos, Estimación del Crecimiento y Recuento Celular

3.3.1 Condiciones de cultivo para el crecimiento de *E. coli*

Las células de *E. coli* se incubaron en medio líquido LB más requerimientos, con agitación orbital (250 r.p.m) a una temperatura de 37ºC. Para el crecimiento en medios sólidos las células se incubaron en estufas a 37ºC.

3.3.2 Condiciones de cultivo para el crecimiento de *S. pombe*

En general, el crecimiento de las células de levadura en cultivo líquido se llevó a cabo en el medio indicado (generalmente YES o EMM2) a 28ºC en incubadores con agitación orbital (180 r.p.m). Los cultivos se incubaron en matraces Erlenmeyer, siendo la relación entre el volumen del medio y su capacidad total de 1/3. Para el cultivo en medios sólidos se incubaron las células de levadura en estufas a la temperatura deseada en cada caso, que osciló entre 25 y 37ºC. En los experimentos realizados con células en fase exponencial de crecimiento se usaron cultivos con valores de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) comprendidos entre 0,5 y 1,0.

Los experimentos de sobre-expresión de genes bajo el control de diferentes versiones del promotor *nmt1* se llevaron a cabo creciendo 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 a la densidad óptica adecuada para obtener aproximadamente 2-4 x 10^6 células/ml tras las horas necesarias de desrepresión (18-24 horas) (Maundrell, 1990; Maundrell, 1993).

En los experimentos con el mutante termosensible *ksg1-208*, las células se cultivaron en medio YES hasta una DO_{600} próxima a 0,5 a 25ºC (temperatura permisiva). A continuación, se incubaron a 34,5ºC o 36ºC durante el tiempo indicado en los diferentes experimentos.

3.3.3 Estimación del crecimiento y recuento celular

El seguimiento del crecimiento de los microorganismos en medio líquido se realizó por turbidimetría, midiendo la densidad óptica de los cultivos a 600 nm (DO_{600}). 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 x 10^5 x M x 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.

3.3.4 Ensayos de crecimiento en gota

La viabilidad de las cepas mutantes frente a distintos agentes estresantes (FK506 + $MgCl_2$ y 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 (DO_{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 µl de cada dilución sobre placas Petri con los medios adecuados (por duplicado). Los resultados se registraron tras la incubación a 28ºC durante 3 días, salvo que se especifique lo contrario.

3.4 Tratamientos de Estrés

Las cepas se cultivaron en medio YES o EMM2 hasta fase exponencial temprana (DO_{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 28ºC se transfirieron a 36ºC, incubándose a esta temperatura durante la duración del tratamiento.

- **Estrés nutricional**

  En el caso del ayuno de glucosa, las células se cultivaron en medio YES 7% glucosa hasta fase exponencial temprana (DO_{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.

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

3.5 Métodos Genéticos

3.5.1 Conjugación

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe* se usaron estirpes heterotálicas de tipo sexual opuesto (h^+ o h^-) incubadas durante 24 horas en placas de medio YES. Se recogió aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa y se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (25 µl). A continuación, se depositó la suspensión de células en una placa de medio SPA. Los zigotos se originan después de 12-20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 1-2 días de incubación a 25ºC.

3.5.2 Aislamiento de Ascosporas al Azar

Para obtener esporas, se resuspendió la mezcla de conjugación (SPA, 25ºC, 1-2 días) en agua estéril, y se trató con 2050 unidades de glusulasa (Sigma) durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Este tratamiento destruye las paredes celulares de las células vegetativas sin afectar a la pared de las ascosporas ni a su capacidad germinativa (Kelly *et al.,* 1993). Se recogieron las esporas por centrifugación a 3.000 r.p.m durante 1 minuto. La mezcla de esporas fue lavada 4 veces con agua estéril y con la ayuda de una cámara Thoma, se estimó el número de esporas por mililitro. Se realizaron diluciones apropiadas para obtener entre 100 y 1.000 esporas por placa, y se extendieron en placas de YES. Se incubaron las placas durante 4 días a 25ºC- 28ºC. Las cepas con el genotipo deseado se seleccionaron mediante la réplica en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas.

3.6 Procedimientos Generales de Biología Molecular

3.6.1 Vectores utilizados y obtención de las construcciones plasmídicas empleadas

3.6.1.1 Vectores de Escherichia coli

- **pGEX-KG (Guan y Dixon, 1991)**

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

En este trabajo, este vector se utilizó para la construcción del plásmido pGEX-KG-Pck2 que permite expresar en *E. coli* la proteína Pck2 fusionada al epítopo GST. Para ello, la secuencia codificante de *pck2* se amplificó mediante PCR utilizando como molde cDNA de una cepa silvestre de *S. pombe*, y los oligonucleótidos Pck2pKG-F (contiene un sitio de corte *Sma*I) y Pck2pKG-R (contiene un sitio de corte *Xba*I). El producto obtenido se digirió con las enzimas indicadas y se clonó en el vector pGEX-KG. Las construcciones que expresan las distintas versiones mutantes de Pck2

fusionadas a GST se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida por PCR (Apartado 3.6.2.7) usando como DNA molde el plásmido pGEX-KG-Pck2 y las correspondientes parejas de oligonucleótidos mutagénicos (Tabla 3.3).

El vector pGEX-KG también se empleó para la construcción del plásmido pGEX-KG-Ksg1. Para su construcción se amplificó por PCR el fragmento de DNA correspondiente a la ORF de *ksg1* utilizando los oligonucleótidos Ksg1pKG-F (con sitio de corte *Sma*I) y Ksg1pKG-R (con sitio de corte *Nco*I). El fragmento obtenido fue digerido con las enzimas de restricción indicadas y se clonó en el vector pGEX-KG. La versión catalíticamente inactiva de Ksg1 se generó mediante mutagénesis dirigida por PCR utilizando el plásmido pGEX-KG-Ksg1 como DNA molde y los oligonucleótidos mutagénicos Ksg1K128R-F y Ksg1K128R-R (Tabla 3.3). El producto obtenido se comprobó mediante secuenciación, se digirió con *Sma*I y *Nco*I y se subclonó en el vector pGEX-KG.

3.6.1.2 Vectores de Schizosaccharomyces pombe

- **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*).

Este plásmido se empleó para clonar $pck2^{+}$, obteniendo así el plásmido pREP-Pck2. Se construyó amplificando la secuencia codificante de Pck2 mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Pck2OE-F (contiene un sitio *Xho*I) y Pck2OE-R (contiene un sitio *Sma*I) (ver Tabla 3.3), y clonando en el vector pREP3X el producto digerido con las endonucleasas indicadas. El plásmido obtenido se utilizó como DNA molde para generar las distintas versiones mutantes de Pck2 (Apartado 3.6.2.7), que fueron transformadas en una cepa Δ*pck2 pmk1-HA6H*, seleccionando aquellas colonias capaces de crecer en EMM2 sin leucina. Las condiciones empleadas para la sobre-expresión se describen en el Apartado 3.2.

- **pJK148**

Es un vector de 5,3 Kb que lleva el gen $leu1^{+}$ de *S. pombe* como marcador de selección y carece de secuencias ars1, por lo que no se replica de manera autónoma. Se utiliza para la integración de secuencias de DNA en el genoma de *S. pombe*. Para que la integración tenga lugar es necesario

digerir el plásmido con la enzima de restricción *Nru*I localizada en el gen *leu1*$^+$. El plásmido linearizado se introduce en una cepa *leu1-32*, de modo que tras la recombinación, se reconstituyen dos copias del gen *leu1*, una mutada y otra silvestre, recuperándose la capacidad de crecer en un medio sin leucina (Keeney y Boeke, 1994). Este plásmido posee además: un fragmento de DNA que incluye sitios de reconocimiento para 19 enzimas de restricción; el gen de resistencia a ampicilina; un fragmento del fago f1 que codifica las funciones requeridas para la obtención de DNA monocatenario; un origen de replicación para *E. coli*; y el gen lacZ de la β-galactosidasa para la selección de clones por su color blanco o azul.

Este plásmido se empleó para la construcción del plásmido integrativo PJK148-Pck2:HA que permite la inserción en el locus *leu1-32* de una versión de *pck2*$^+$ bajo el control de su propio promotor y fusionada en su extremo carboxilo a un epítopo de hemaglutinina (HA). Para su construcción se amplificó mediante PCR un fragmento de DNA correspondiente a la ORF de *pck2*$^+$ y su promotor, utilizando como molde de la reacción DNA genómico procedente de la cepa silvestre L972 (ver Tabla 3.1). Se emplearon los oligonucleótidos Pck2XbaI-F2 (que hibrida desde la posición -724 a la -703, aguas arriba del codón de iniciación de *pck2*$^+$, y que contiene un sitio de corte *Xba*I) y Pck2HASmaI-R (que hibrida en el extremo 3' de *pck2*$^+$ y que incorpora una secuencia de 64 nucleótidos que codifica un epítopo de HA -secuencia GYPYDVPDYA-, y un sitio *Sma*I). El fragmento obtenido (5 Kb) fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sma*I y se clonó en el vector integrativo pJK148 tras ser digerido previamente con las mismas endonucleasas, generando el plásmido pJK148-Pck2:HA. La secuencia codificante de *pck2*$^+$ contiene un sitio *Nru*I que fue eliminado mediante mutagénesis dirigida utilizando los oligonucleótidos Pck2NruIX-F y Pck2NruIX-R usando el plásmido pJK148-Pck2:HA como DNA molde. El fragmento de *pck2* con la mutación incorporada fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sma*I y subclonado para generar el plásmido pJK148-Pck2NruIΔ:HA.

Los plásmidos integrativos empleados para expresar las distintas versiones mutantes de Pck2 fusionadas al epítopo HA se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida por PCR utilizando como DNA molde el plásmido pJK148-Pck2NruIΔ:HA. Los oligonucleótidos empleados para insertar los cambios dirigidos se describen en la Tabla 3.3 del Apartado 3.6.2.7. Las mutaciones de interés fueron confirmadas por secuenciación y los correspondientes fragmentos de *pck2* subclonados en el plásmido pJK148. Los plásmidos integrativos obtenidos fueron digeridos con el enzima *Nru*I que corta en un sitio único en *leu1*$^+$, y transformados en la cepa *pck2Δ* (GB3). Los transformantes obtenidos fueron verificados mediante PCR y *Western* blot.

3.6.2 Obtención y manipulación de muestras de DNA

3.6.2.1 Aislamiento de DNA 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*.

3.6.2.2 Aislamiento de DNA 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^{o}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 $T_{50}E_5$ (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^{o}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 15.000 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^{o}C). Los ácidos nucleicos totales se lavaron con etanol al 70% y se resuspendieron en 3 ml de tampón $T_{50}E_5$ suplementado con 20 µg/ml de RNAasa. Esta mezcla se incubó durante dos horas a 37^{o}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^{o}C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M. El precipitado de DNA 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^{o}C hasta su utilización.

3.6.2.3 Determinación de la concentración de DNA total

Las soluciones de DNA 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 DNA. 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 DNA puro).

3.6.2.4 Digestión del DNA con enzimas de restricción

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

3.6.2.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa y purificación de DNA a partir de geles

La separación de los fragmentos de DNA 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 GFXTM 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.

3.6.2.6 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 16ºC 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.

3.6.2.7 Reacción de amplificación de DNA (PCR) y mutagénesis dirigida por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA 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 *PfuUltra II Fusion* o *Pfu Turbo DNA Polymerase* (Agilent Technologies) y $MgCl_2$ 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 (Tm) de los oligonucleótidos. El primer paso fue una desnaturalización a 95ºC durante 2 minutos, seguido de un número variable de ciclos (25 a 35), cada uno de ellos con un paso de desnaturalización (95ºC, 1 minuto), hibridación (50-58ºC, 30-90 segundos) y polimerización (72ºC, 1-3 minutos). Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron, en caso necesario, a partir de geles de agarosa.

Para mutar los fragmentos de DNA correspondientes a la proteína de interés, se utilizó un protocolo de mutagénesis de dirigida proporcionado por *Stratagene* (*Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit*). Se utilizó como molde la forma no mutada y se sometió a una PCR donde se utilizaron las parejas de oligonucleótidos indicadas para tal fin en la Tabla 3.3. Como resultado de su síntesis *in vitro*, las cadenas de DNA recién sintetizadas se diferencian del DNA parental por la presencia de una mella en la conexión de sus extremos 5' y 3' y por la ausencia de metilación. Seguidamente, el producto fue digerido con la enzima *Dpn*I, que actúa sobre los lugares de metilación

de las cadenas de DNA digiriendo específicamente el DNA molde (parental). Finalmente, se transformó el DNA mutante en células competentes de *E. coli* que se sembraron en placas de medio LBA, y que se incubaron a 37ºC durante 18 h. Se seleccionaron 5 colonias al azar que fueron inoculadas en medio LBA líquido, y tras el crecimiento celular se aisló el DNA correspondiente a cada colonia. Una vez aislado y purificado el DNA, la presencia de los cambios deseados y la ausencia de mutaciones adicionales que pudieran haberse incorporado durante la amplificación se verificaron mediante secuenciación.

Los plásmidos utilizados como molde de DNA a lo largo del trabajo se indican en la Tabla 3.2. Los oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones de amplificación junto con su finalidad se muestran en la Tabla 3.3.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	ORIGEN
pFA6a-KanMX6	Amplificación del casete de disrupción con el marcador de resistencia a Kanamicina	J. Bähler, 1998
pFA6a-hphMX6	Amplificación del casete de disrupción con el marcador de resistencia a Higromicina B	J. Bähler, 1998
pGEX-KG-Ksg1	Generación de las versiones mutantes de Ksg1 fusionadas a GST	Este trabajo
pREP3x-Pck2	Generación de las versiones mutantes de Pck2 en el plásmido pREP3X	Este trabajo
pJK148-Pck2:HA	Generación de las versiones mutantes de Pck2 fusionadas a HA y bajo la regulación de su promotor endógeno	Este trabajo

Tabla 3.2 Plásmidos empleados como molde de DNA en las reacciones de PCR

NOMBRE	SECUENCIA[a] 5'-3'	UTILIDAD
Pck2XbaI-F2	*TATAT**TCTAGA**TCCTGTGTCGTTTTCCATCAG*	Construcción Pck2-HA
Pck2HASmaI-R	*TATAT**CCCGGG**CTATGCATAGTCCGGGACGTCAT AGGGATAGCCAGCATTATCGGTAGTCGAGG*	Construcción Pck2-HA
Pck2NruIX-F	*AACTTTTGACT**AGA**GATCCTAAAAA*	Mutagénesis sitio NruI
Pck2NruIX-R	*TTTTTAGGATC**TCT**AGTCAAAAGTT*	Mutagénesis sitio NruI
Pck2pKG-F	*TATAT**CCCGGG**AATGGATATGATTGATGAGG*	Construcción Pck2-GST
Pck2pKG-R	*TATAT**TCTAGA**CTAAGCATTATCGGTAGTC*	Construcción Pck2-GST
Ksg1pKG-F	*TATAT**CCCGGG**AATGCGAAATACGCACAAT*	Construcción Ksg1-GST
Ksg1pKG-R	*TATAT**CCATGG**TTAGACAGCACTTCTAGC*	Construcción Ksg1-GST
Ksg1K128R-F	*AATATGCTATTA**G**GGTGTTGGATAA*	Mutagénesis de Ksg1 en K128
KsgK128R-R	*TTATCCAACACC**C**TAATAGCATATT*	Mutagénesis de Ksg1 en K128
Ksg1K128E-F	*GAATATGCTATT**G**AGGTGTTGGATA*	Mutagénesis de Ksg1 en K128
Ksg1K128E-R	*TATCCAACACCTCAATAGCATATTC*	Mutagénesis de Ksg1 en K128
Pck2OE-F	*TATAT**CTCGAG**ATGGATATGATTGATGAGGC*	Sobre-expresión de Pck2
Pck2OE-R	*TATAT**CCCGGG**CTAAGCATTATCGGTAGTCG*	Sobre-expresión de Pck2
Pck2T842A-F	*ACACTACTGCC**G**CGTTTTGCGGTAC*	Mutagénesis de Pck2 en T842 a A
Pck2T842A-R	*GTACCGCAAAACG**C**GGCAGTAGTGT*	Mutagénesis de Pck2 en T842 a A
Pck2T846A-F	*ACGTTTTGCGGT**G**CTCCTGAATTTA*	Mutagénesis de Pck2 en T846 a A
Pck2T846-R	*TAAATTCAGGAG**C**ACCGCAAAACGT*	Mutagénesis de Pck2 en T846 a A

Pck2FFtoA-F	*ACGAAAGAGATGCAGCAACAT**GC**TGAAGGT**GC**TT CTTATTCATGCGAGGATGAT*	Mutagénesis de Pck2 en los residuos de F998 y F1001 a A
Pck2FFtoA-R	*ATCATCCTCGCATGAATAAGAA**GC**ACCTTCA**GC**AT GTTGCTGCATCTCTTTCGT*	Mutagénesis de Pck2 en los residuos de F998 y F1001 a A
Pck2T984A-F	*CTCCCAGTTCTT**G**CTCCTGTTAATT*	Mutagénesis de Pck2 en T984 a A
Pck2T984A-R	*AATTAACAGGAG**C**AAGAACTGGGAG*	Mutagénesis de Pck2 en T984 a A
Pck2S1002A-F	*TTGAAGGTTTT**G**CTTATTCATGCGA*	Mutagénesis de Pck2 en S1002 a A
Pck2S1002A-R	*TCGCATGAATAAG**C**AAAACCTTCAA*	Mutagénesis de Pck2 en S1002 a A
Pck2S1002E-F	*TTGAAGGTTTT**GAG**TATTCATGCGA*	Mutagénesis de Pck2 en S1002 a E
Pck2S1002E-R	*TCGCATGAATA**CTC**AAAACCTTCAA*	Mutagénesis de Pck2 en S1002 a E
Pck2S1002D-F	*TTGAAGGTTTT**GA**TTATTCATGCGA*	Mutagénesis de Pck2 en S1002 a D
Pck2S1002D-R	*TCGCATGAATAA**TC**AAAACCTTCAA*	Mutagénesis de Pck2 en S1002 a D
Pck2T842D-F	*ACACTACTGCC**GAT**TTTTGCGGTAC*	Mutagénesis de Pck2 en T842 a D
Pck2T842D-R	*GTACCGCAAAA**ATC**GGCAGTAGTGT*	Mutagénesis de Pck2 en T842 a D
Pck2K712E-F	*TGTATGCTATT**G**AAGTTTTGAAAAA*	Mutagénesis de Pck2 en K712 a E
Pck2K712E-R	*TTTTTCAAAACTT**C**AATAGCATACA*	Mutagénesis de Pck2 en K712 a E
Pck2K712W-F	*TGTATGCTATT**TGG**GTTTTGAAAAA*	Mutagénesis de Pck2 en K712 a W
Pck2K712W-R	*TTTTTCAAAAC**CCA**AATAGCATACA*	Mutagénesis de Pck2 en K712 a W
Tor1-Del-F	*TTGTGATGAATGCCTAAGTGGAAGAATTGAACACC GCGACTATTAGAAAGTCTATCGTTTCACTCGCTCT CTTTGATTCCGGATCCCCGGGTTAATTAA*	Interrupción de *tor1*$^+$
Tor1-Del-F	*CAGAAACGAGCGAATTTATAGACATAAATTAATAA CAACACGAAAAAAATTATCATAATCTCAAAAAACAG AAAACATCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC*	Interrupción de *tor1*$^+$
Tor1-com-R	*ACCGGAGCTACTAGCACTGT*	Comprobación de la interrupción
Hyg-com-F	*ACATCTTCTTCTGGAGGCCG*	Comprobación de la interrupción

a Los sitios de corte se indican en cursiva; los residuos mutados en negrita; el subrayado indica la secuencia codificante de hemaglutinina

Tabla 3.3 Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo

3.6.2.8 Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA 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.

3.6.3 Técnicas de transformación

3.6.3.1 Transformación de E. coli

Las cepas 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^{o}C. Posteriormente se recogieron por centrifugación y se sembraron en placas de LBA (medio LB más ampicilina).

3.6.3.2 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 28ºC hasta alcanzar valores de DO_{600} comprendidos entre 0,8 y 1,2. Las células se recogieron por centrifugación a 1.800 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 30ºC. Después de este tiempo, se añadieron 43 µl de DMSO y las alícuotas se transfirieron a un baño a 42ºC, 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 28ºC.

3.7 Marcaje y Fraccionamiento de los Polímeros de la Pared Celular

Se utilizó el método descrito por Arellano *et al*. (1996). Las células se incubaron en medio rico antes de añadir el precursor radiactivo. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600}= 0,5-0,8 se llevó a cabo el marcaje de los mismos durante un periodo de 6 horas a 28ºC y con 0,5 µCi/ml de ^{14}C-glucosa. Se tomaron dos muestras de 50 µl al comenzar y dos al terminar la incubación para calcular la incorporación total de glucosa radiactiva en las células. El resto de cultivo se recogió, se lavó tres veces con EDTA 1mM y se sometió a rotura mecánica mediante agitación con bolas de vidrio en una *Fast-Prep FP120* (*Bio 101 Savant*). La rotura se comprobó por observación al microscopio de contraste de fases. El extracto obtenido se diluyó hasta 1 ml con EDTA 1 mM, se decantaron las bolas de vidrio y se centrifugó a 1.000 xg para recoger las paredes. Estas se lavaron tres veces con NaCl 2 M y otras dos veces con EDTA 1 mM y se tomaron alícuotas de 20 µl para determinar la incorporación total de ^{14}C-glucosa en las paredes. Después, las paredes se hirvieron 5 minutos para inactivar las posibles glucanasas incluidas en la pared y se resuspendieron en 500 µl de EDTA 1 mM. Se hicieron alícuotas de 100 µl, de las cuales una se incubó con 100 µl de tampón citrato-fosfato 50 mM pH 5,6; dos alícuotas se incubaron en el mismo tampón en presencia de 10 µg de Zymoliasa 100T (Seikagaku

Kogio) y otras dos se incubaron en 100 µl del tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con 100 unidades de Quantazima (Quantum, Biotechnologies ING), que es una endo-β-glucanasa recombinante.

Todas las muestras se incubaron a 28ºC durante 36 horas, tras lo cual se centrifugaron a 12.000 r.p.m durante 5 minutos y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y precipitados. Todas las alícuotas (excepto los sobrenadantes que se valoraron directamente) se diluyeron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10%, manteniéndose a 4ºC hasta ser filtradas sobre papel Whatman GF/C. Estos filtros se lavaron 3 veces con 1 ml de TCA y 2 veces con 3 ml de etanol. Después se secaron y se determinó su radiactividad en un contador de centelleo *Wallac 1409*, añadiendo líquido de centelleo *Optiphase "Hisafe"* (Hartmann-Petersen *et al*., 2004). El precipitado de la incubación con Zimoliasa 100T corresponde al α-glucano presente en la pared mientras que el sobrenadante de la incubación con Quantazima corresponde al β-(1,3)-glucano. La diferencia entre los precipitados de Quantazima y Zimoliasa 100T corresponde a galactomanano y β-(1,6)-glucano.

3.8 Análisis de Proteínas

3.8.1 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 (4.000 r.p.m) a 4^{o}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 para el análisis de Pmk1 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 fosfatasas. 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 13.000 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 µl de tampón de carga para geles de poliacrilamida-SDS (Sambrook *et al*., 1998).

Para la obtención de extractos con el objetivo de analizar la fosforilación y niveles de Pck2, las células se procesaron de manera similar empleando el tampón de lisis T100 (Triton X-100 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 5mM pH 8.0, NaCl 150 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 1mM, inhibidores de proteasas y fosfatasas). La clarificación de los lisados se llevó a cabo mediante centrifugación durante 8 minutos a 5.000 r.p.m.

3.8.2 Purificación de proteínas fusionadas a HA6H

En aquellos experimentos donde se emplean cepas con la proteína de interés fusionada al epítopo HA seguido de 6 histidinas consecutivas (HA6H), la fusión se purificó como se describe a continuación. Se incubaron cantidades equivalentes de extractos clarificados con 50 µl de matriz de Ni^{2+}- NTA-agarosa (*Qiagen*) en una plataforma giratoria durante 2 horas a 4ºC. 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). Finalmente, la matriz se resuspendió en 20 µl de tampón de carga para geles de poliacrilamida-SDS (Sambrook *et al*., 1998).

3.8.3 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST en *E. coli*

Utilizamos un sistema de expresión heteróloga en *E. coli* con el fin de purificar Ksg1, Ksg1.K128R, Pck2 y sus correspondientes versiones mutantes (Pck2.T842A, Pck2.T846A, Pck2.T984A, Pck2.S1002A, Pck2.F998F1001A, Pck2.T842AT846A, Pck2.K712W). Estas proteínas se emplearon para llevar a cabo los ensayos de interacción *in vitro* y los distintos ensayos quinasa desarrollados en el trabajo.

Para la expresión de cada una de las proteínas de fusión se procedió de la siguiente manera. Se realizó un cultivo iniciador en 10 ml de medio LBA que se incubó a una temperatura de 37ºC durante toda la noche. Posteriormente se inocularon 5 ml de dicho cultivo en un matraz con 500 ml de LBA y se creció a 37ºC hasta una densidad óptica de 0,4. En este momento se adicionó IPTG hasta una concentración final de 0,4 mM, manteniendo el proceso de inducción durante 4 horas a 25ºC. Se recogieron las células mediante centrifugación a 1.000 xg durante 10 minutos a 4ºC, y se lavaron con un tampón salino frío (NaCl 0,9%). Posteriormente se concentraron de nuevo por centrifugación, y se resuspendieron en 1 ml de tampón de resuspensión (sacarosa 2,4 M, Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8, inhibidores de proteasas). Las muestras se incubaron durante 15 minutos en hielo y, a continuación, se lisaron mediante su incubación en hielo con 4 ml de tampón de lisis (deoxicolato sódico 0,1%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, lisozima 0,125 mg/ml, inhibidores de proteasas a una concentración estándar, pH 8) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra se sonicó mediante 6 pulsos de 15 segundos cada uno hasta conseguir clarificar la suspensión celular. Una vez obtenido el sobrenadante del lisado correspondiente, la proteína fusionada a GST se purificó por cromatografía de afinidad incubando la muestra toda la noche con 0,5 ml de matriz glutatión Sefarosa 4B (*GE Healthcare)*. Las proteínas unidas a la matriz se lavaron 3 veces con el tampón de lavado (glicerol 10%, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $ZnCl_2$ 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, NP40 0,1%, DTT 2mM, HEPES 10 mM, inhibidores de proteasas, pH 8), y se eluyeron mediante incubación durante 60 minutos a 4ºC en 0,4 ml de tampón de elución (glicerol 10%, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $ZnCl_2$ 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, NP40 0,1%, DTT 2 mM, HEPES 10 mM, glutatión reducido 10 mM, pH 9). La concentración de las distintas proteínas de fusión se determinó mediante su comparación

con un patrón conocido de albúmina de suero bovino (BSA) en geles de poliacrilamida tras su tinción con azul de Coomassie.

3.8.4 Experimentos de interacción *in vitro*

Los ensayos de interacción *in vitro* entre HA-Pck1 o HA-Pck2 con GST-Ksg1 se realizaron según se indican en Nguyen y Shiozaki (1999), aunque con ligeras modificaciones. En primer lugar se cultivaron las cepas PPG5.16 (*HA-Pck1*) y PPG5.23 (*HA-Pck2*) en medio mínimo sin tiamina durante 24 horas. Se recogieron las células por centrifugación a 4ºC y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se lisaron las células como se ha descrito anteriormente en tampón de lisis IP (Tris-HCl pH 7,2, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, β- mercaptoetanol 1 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 0,5%, más inhibidores de proteasas a la concentración estándar), y los extractos se clarificaron mediante centrifugación durante 8 minutos. Por otra parte, las proteínas GST, GST-Ksg1 y GST-Ksg.K128R(KD) se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con glutatión Sefarosa 4B (*GE Healthcare*). Los extractos celulares con HA-Pck1 y HA-Pck2 se incubaron con las distintas fusiones a GST durante 60 minutos a 4ºC en agitación continua. Posteriormente se procedió a lavar la matriz 4 veces con tampón de lisis más Tritón X-100 1%. A continuación, se procedió a la elución de las proteínas unidas a la matriz mediante la adición del buffer de elución (glutatión reducido 20mM) y la incubación durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se desnaturalizaron mediante la adición de tampón de carga y su incubación a 100ºC durante 5 minutos. Finalmente, las proteínas unidas a la matriz se analizaron mediante inmunodetección con los anticuerpos anti- GST y anti-HA como se describe en el Apartado 3.8.7.2.

3.8.5 Ensayos quinasa *in vitro*

Para realizar estos ensayos las versiones silvestre y catalíticamente inactiva de Ksg1 se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante inmunoprecipitación con una matriz de glutatión sefarosa. Como sustratos se emplearon las formas silvestre y mutantes de Pck2 fusionadas a GST (Pck2.T842A, Pck2.T846A, Pck2.T984A, Pck2.S1002A, Pck2.F998F1001A, Pck2.T842AT846A, Pck2.K712W), expresadas y purificadas de cepas de *Escherichia coli*. En los ensayos quinasa no radiactivos las reacciones se realizaron incubando las quinasas purificadas con 5 µg de sustrato (GST-Pck2 y las correspondientes versiones mutantes) en tampón quinasa (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, $MgCl_2$ 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, ATP 50 µM frío) durante 30 minutos a 30ºC. Finalmente, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. Los niveles de proteína total y fosforilada en T842 se detectaron empleando anticuerpos anti-GST y anti-fosfo-T842, y se revelaron mediante quimioluminiscencia. En los ensayos quinasa radiactivos se empleó el mismo tampón quinasa al que se añadió 0.1 µCi/µl [γ-^{32}P] ATP. Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 30ºC. Las proteínas marcadas se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante autorradiografía.

3.8.6 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 poliacrilamieda 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 *Criterion*, ambos proporcionados por *Bio-Rad*.

Las muestras, con el tampón de carga añadido, se incubaron a 100^{o}C durante 5-8 minutos antes de cargar los geles. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante que varió según el sistema utilizado entre 90-120 V (Mini Protean) y 120 V (Criterion). 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).

3.8.7 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (*Western blot*)

3.8.7.1 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 *Trans-blot Turbo Transfer System* (*Biorad*), 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 300 mA durante 50 minutos.

3.8.7.2 Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa

Se utilizaron distintos tampones, concentraciones y anticuerpos secundarios (Tabla 3.4), 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^{o}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.

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 *Hyperfilm ECL* (*GE Healthcare*) durante tiempos variables (1 a 20 minutos) en casetes de autorradiografía.

Anticuerpo Primario (Organismo, Tipo, Casa comercial)	**Solución de bloqueo**	**Condiciones de uso**	**Anticuerpo secundario** (Organismo,Tipo, Casa comercial)	**Condiciones de uso**
Anti-fosfo-T842 (Conejo, Policlonal, Genscript)	TBST 0.1% + leche desnatada 5%	1:1000 en TBST 0,1% y BSA 5%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlonal, GE Healthcare)	1:1000 en TBST 0,1% + leche desnatada 5%
Anti-fosfo-PKC α/β II (Conejo, Policlonal, Cell Signalling)	TBST 0.1% + leche desnatada 5%	1:1000 en TBST 0,1% y BSA 5%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlonal, GE Healthcare)	1:1000 en TBST 0,1% + leche desnatada 5%
Anti-fosfo-p44/42 (Conejo, Policlonal, Cell Signalling)	TBST 0.1% + leche desnatada 5%	1:1000 en TBST 0,1% y BSA 5%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlonal, GE Healthcare)	1:1000 en TBST 0,1% + leche desnatada 5%
Anti-fosfo-p38 (Conejo, Monoclonal, Cell Signalling)	PBST 0.01% + leche desnatada 1%	1:1000 en PBST 0,01% y BSA 1%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlonal, GE Healthcare)	1:2000 en PBST 0,01% + leche desnatada 1%
Anti-HA (12CA5) (Ratón, Monoclonal, Roche)	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1:1000 en PBST 0,05% y leche 5%	Anti-IgG ratón-HRP (Cabra, Policlonal, Sigma)	1:2000 en PBST 0,05% + leche desnatada 5%
Anti-HA-HRP (3F10) (Rata, Monoclonal, Roche)	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1:5000 en PBST 0,05% y leche desnatada 5%	Ninguno	Ninguna
Anti-cdc2 (Conejo, Policlonal, Upstate)	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1:1000 en PBST 0,05%	Anti-IgG conejo-HRP (Cabra, Policlonal, GE Healthcare)	1:2000 en PBST 0,05%
Anti-c-myc (9E10) (Ratón, Monoclonal, Roche)	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1:1000 en PBST 0,05% y leche 5%	Anti-IgG ratón-HRP (Cabra, Policlonal, Sigma)	1:2000 en PBST 0,05% + leche desnatada 5%
Anti-GFP (Ratón, Monoclonal, Roche)	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1:1000 en PBST 0,05% y leche 5%	Anti-IgG ratón-HRP (Cabra, Policlonal, Sigma)	1:2000 en PBST 0,05% + leche desnatada 5%
Anti-GST-HRP (Conejo, Policlonal, GE Healthcare)	PBST 0.05% + leche desnatada 5%	1:5000 en PBST 0,05% y leche desnatada 5%	Ninguno	Ninguna

Tabla 3.4 Anticuerpos y condiciones de uso empleadas en este trabajo

3.8.7.3 Análisis densitométrico

La cuantificación de la señal obtenida tras la inmunodetección se realizó mediante el programa *ImageJ* (Schneider *et al.,* 2012). 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 fosforilación (Pmk1 o Pck2) a los tiempos indicados frente a los niveles medidos a tiempo 0 en el control (células sin tratar). Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a los valores correspondientes a la proteína total (control de carga). Los datos numéricos obtenidos corresponden a los niveles relativos de Pmk1 o Pck2 fosforilado en las distintas muestras.

3.9 Técnicas Microscópicas

3.9.1 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.

3.9.2 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*).

3.9.3 Tinción de calcoflúor

Para el estudio morfológico de la pared y los septos celulares tras la sobre-expresión de Pck2 y las correspondientes versiones mutantes se empleó la tinción de blanco de calcoflúor. El calcoflúor es un fluorocromo que tiñe las zonas de pared celular ricas en quitina en *S. cerevisiae*, pero que en *S. pombe* se une fundamentalmente al β-(1-3)-glucano lineal del septo y de los polos en crecimiento (Cortes *et al.*, 2007) ya que *S. pombe* carece de quitina. El calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul. El calcoflúor (*Blankophor BBH*, *Bayer Corporation*) se preparó en agua a una concentración de 1 mg/ml. Para conseguir la completa disolución, se añadieron gotas de KOH 10 N. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

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

3.10 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://www.pombase.org/.

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 y 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/ y 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/.

4. RESULTADOS

4. 1 Ksg1 es un regulador positivo de la ruta MAPK de integridad celular en *Schizosaccharomyces pombe*

La proteína Ksg1, ortóloga a PDK1 en células eucariotas superiores, es esencial para el crecimiento vegetativo de *S. pombe* (Niederberger y Schweingruber, 1999). Estudios previos han sugerido un posible papel de Ksg1 como un regulador de la integridad de la pared celular (Graub *et al*., 2003). La ruta de integridad celular, cuyo elemento central es la MAPK Pmk1, desempeña en *S. pombe* una función crítica en la regulación de los procesos de construcción y mantenimiento de la pared celular (Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). Por todo ello nos preguntamos si la función de Ksg1 ejercía algún impacto en el estado de la activación de Pmk1, y por tanto, si se trataba de un nuevo elemento regulador de la transmisión de señales por dicha ruta.

Para explorar esta posibilidad, y dado que Ksg1 es una proteína esencial, empleamos un mutante que expresa un alelo termosensible de Ksg1 (*ksg1-208*) que presenta una mutación puntual que provoca la sustitución de un residuo de glicina en la posición 159 dentro del dominio de unión a ATP por otro de ácido glutámico (Niederberger y Schweingruber, 1999). Las cepas portadoras de este alelo muestran graves defectos morfológicos y una fuerte sensibilidad frente a la estaurosporina, un potente inhibidor de PKCs (Graub *et al*., 2003).

Con el fin de averiguar si la pérdida de actividad de Ksg1 alteraba los niveles basales de activación de Pmk1, se construyeron las cepas MI200 (Pmk1-HA6H*,* control) y MM667 (Pmk1-HA6H*, ksg1-208*), que expresan una versión silvestre del gen *pmk1*$^{+}$ bajo el control de su propio promotor, y fusionada en su extremo C-terminal a la secuencia codificante de dos epítopos de hemaglutinina y seis histidinas consecutivas (HA6H) (Madrid *et al*., 2006). Ambas cepas se cultivaron en medio YES a 25ºC (temperatura permisiva) hasta fase exponencial temprana, y seguidamente se transfirieron a un incubador a 34,5ºC (temperatura restrictiva para el mutante *ksg1-208*) (Graub *et al*., 2003). Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados, y se obtuvieron los correspondientes extractos celulares según se indica en el Apartado 3.8.1 de Materiales y Métodos. La proteína de fusión Pmk1-HA6H se purificó a partir de los extractos obtenidos mediante cromatografía de afinidad con una matriz de Ni^{++}-NTA-agarosa, se resolvió en geles SDS-PAGE, y se detectó su estado de activación mediante *Western Blotting* empleando un anticuerpo policlonal anti-fosfo-p44/42 (Apartado 3.8.2 de Materiales y Métodos). Dicho anticuerpo reconoce específicamente la fosforilación dual de Pmk1en los residuos Thr^{186} y Tyr^{188} del bucle de activación (Madrid *et al*., 2006). Paralelamente la cantidad total de la fusión se detectó empleando un anticuerpo monoclonal anti-HA. Finalmente, las señales obtenidas tras la hibridación con ambos anticuerpos se cuantificaron densitométricamente mediante el programa Image J (Abramoff *et al*., 2004) y se expresaron para cada muestra como unidades relativas de activación (U.R.): ratio entre las señales obtenidas con el anticuerpo p44/42 (fosforilación) frente a anti-HA (proteína total).

Como se observa en la Figura 4.1, el mutante *ksg1-208* presentó un nivel basal de fosforilación de Pmk1 reproduciblemente menor al de la cepa control, tanto a temperatura permisiva (25ºC) como restrictiva (34,5ºC). Por otro lado, los niveles totales de la MAPK permanecieron relativamente constantes en ambas cepas independientemente de la temperatura de incubación. Estos resultados indican que la disminución de la actividad de Ksg1 reduce significativamente el nivel de fosforilación basal de Pmk1, lo que sugiere que en *S. pombe* Ksg1 podría ser un regulador positivo específico de la ruta de integridad celular durante el crecimiento vegetativo.

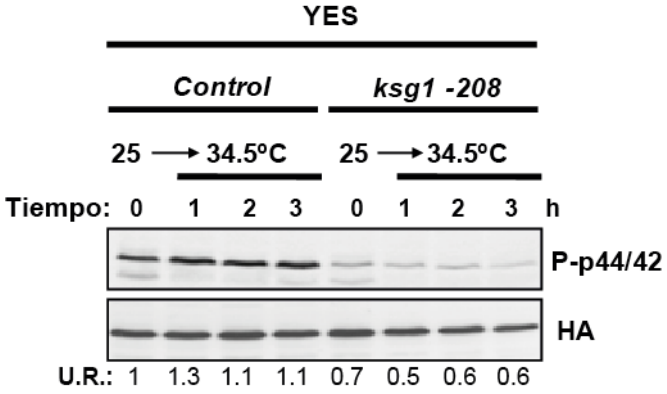


Figura 4.1 Ksg1 es un regulador positivo de la ruta MAPK de integridad celular en *S. pombe*. Las cepas MI200 (Pmk1-HA6H; control) y MM667 (Pmk1-HA6H*, ksg1-208*) se cultivaron a 25ºC en medio YES hasta fase exponencial temprana, y se transfirieron a 34,5ºC durante los tiempos indicados. La proteína de fusión Pmk1-HA6H se purificó mediante cromatografía de afinidad, y los niveles totales y de activación de la quinasa se detectaron mediante inmunodetección con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-P44/42, respectivamente. U.R., unidades relativas.

4.2 Ksg1 es un regulador positivo de la ruta de integridad celular en condiciones de estrés

En *S. pombe* la ruta de señalización mediada por la MAPK Pmk1 regula la integridad celular y morfogénesis, particularmente en condiciones de estrés (Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). Aunque inicialmente se creía que Pmk1 se activaba únicamente en respuesta a incrementos de temperatura o tras el estrés salino (Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997), nuestro grupo ha descrito que también lo hace en respuesta a otras situaciones adversas, como el estrés hiper- e hipo-osmótico, el ayuno de glucosa, el daño a la pared celular, y el estrés oxidativo mediado por hidroperóxidos o agentes pro-oxidantes (Barba *et al*., 2008; Madrid *et al*., 2006; Soto *et al*., 2007). De hecho, 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 su función es necesaria para la adaptación y supervivencia celular frente a tales condiciones (Madrid *et al*., 2006). En el apartado anterior se puso de manifiesto el papel de Ksg1 como posible

regulador positivo de la ruta de integridad celular durante el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Dado que dicha ruta es activada en múltiples situaciones de estrés, nos preguntamos si Ksg1 regulaba la transmisión de señales hacia Pmk1 en dichas circunstancias.

Para explorar esta posibilidad se cultivaron las cepas MI200 (Pmk1-HA6H, control) y MM667 (Pmk1-HA6H*, ksg1-208*) en medio YES hasta fase exponencial temprana a 25ºC, momento en el que los cultivos se incubaron a 32 o 34,5ºC. A continuación los cultivos se sometieron a distintos tipos de estrés que activan la ruta de integridad celular, como el estrés hiperosmótico en presencia de KCl, el ayuno de glucosa, y el daño en pared celular inducido por caspofungina (una equinocandina que inhibe la actividad de las β-glucan sintasas de la pared celular) o calcoflúor (la unión de este fluorocromo a los polisacáridos altera la estructura de la pared celular). Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, y se procesaron como se indicó en el apartado anterior. Tal como muestra la Figura 4.2A, el grado de activación de Pmk1 en el mutante *ksg1-208* tras un tratamiento con 0,6M KCl fue claramente menor que en la cepa control cuando los cultivos fueron incubados a temperatura semipermisiva (32°C) o restrictiva (34,5°C). Sin embargo, dicha reducción no se observó en cultivos de ambas cepas sometidos a estrés salino e incubados a temperatura permisiva (25ºC) (Figura 4.2A). Estos resultados sugieren que Ksg1 participa en la transmisión de la señal activadora de la ruta de integridad celular en condiciones de estrés hiperosmótico. De manera similar, la activación de Pmk1 disminuyó considerablemente en la cepa *ksg1-208* respecto al control cuando los cultivos se sometieron a un ayuno de glucosa a 34,5ºC (Figura 4.2B). Por lo tanto, Ksg1 también estaría implicado en la activación de la ruta de integridad celular durante la ausencia de esta fuente de carbono esencial.

A continuación, analizamos la dinámica de fosforilación de Pmk1 en la cepa control y el mutante *ksg1-208* tras someter los cultivos correspondientes a un estrés de pared celular empleando caspofungina o calcoflúor. De nuevo, y tal como indica en la Figura 4.2C, los niveles de activación de Pmk1 en ambas condiciones fueron claramente menores en el mutante *ksg1-208* respecto al control incluso a la temperatura permisiva, lo que confirma el papel de Ksg1 como activador de la ruta de integridad en estas condiciones. Finalmente, para confirmar que el defecto en la señalización hacia la ruta de integridad celular mostrado por el mutante *ksg1-208* era debido a un déficit en la actividad quinasa de Ksg1, se expresaron las versiones silvestre y catalíticamente inactiva de Ksg1 (KD, mutante *K128R*) en un fondo genético *ksg1-208 pmk1:HA6H*. Los cultivos se incubaron a 25ºC hasta fase exponencial temprana, transfiriéndose a 34,5ºC durante 1 hora, y se trataron con 1µg/ml de caspofungina (Figura 4.2D). La inmunodetección con el anticuerpo anti-fosfo-p44/42 reveló una recuperación de la activación de Pmk1 en la cepa que portaba la versión silvestre de Ksg1, pero no en el mutante que expresaba la versión de Ksg1 catalíticamente inactiva. En conjunto, todos estos resulta-

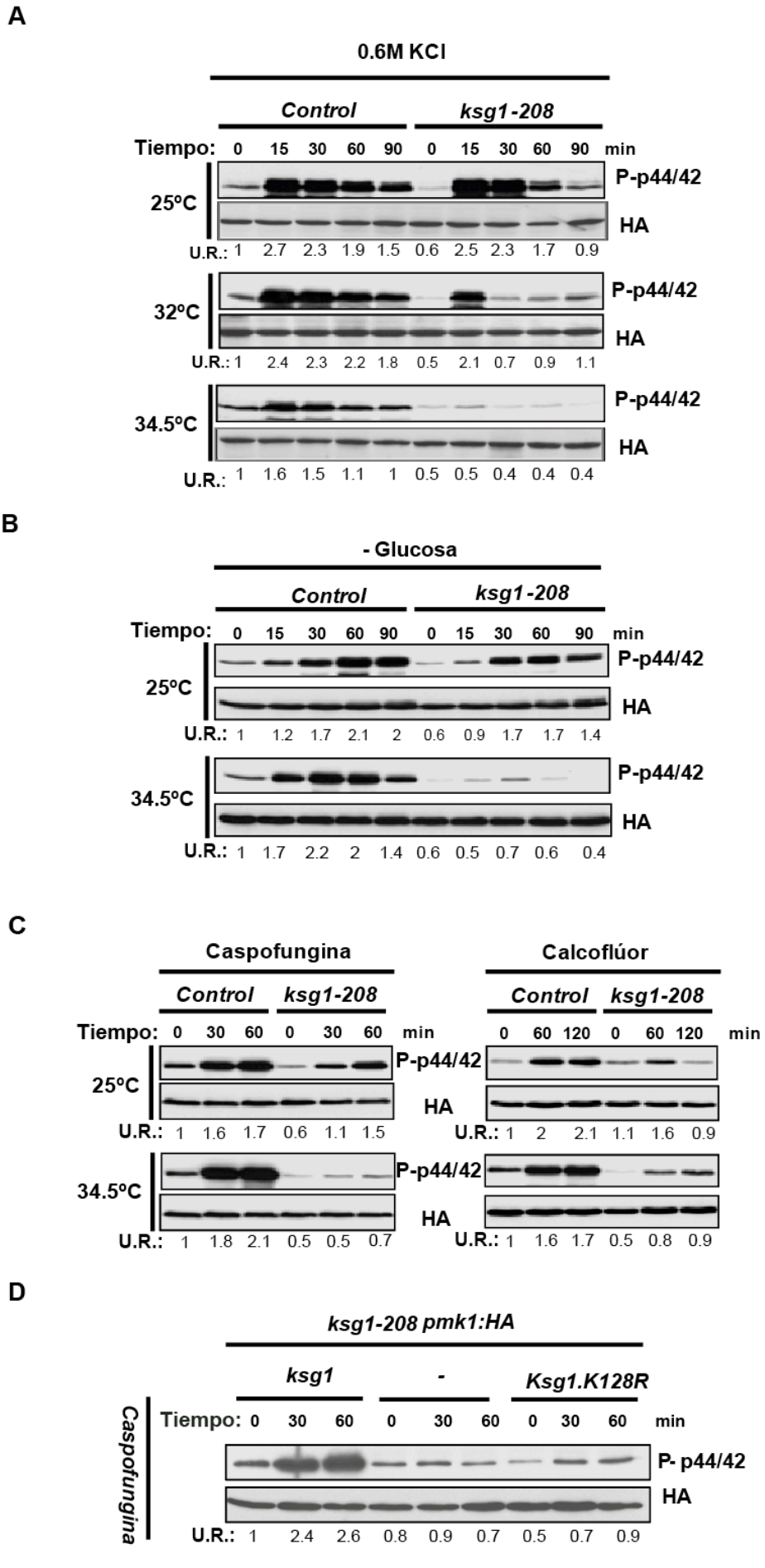

A
0.6M KCl
Control
ksg1-208
Tiempo: 0 15 30 60 90 0 15 30 60 90 min
25ºC
P-p44/42
HA
U.R.: 1 2.7 2.3 1.9 1.5 0.6 2.5 2.3 1.7 0.9
32ºC
P-p44/42
HA
U.R.: 1 2.4 2.3 2.2 1.8 0.5 2.1 0.7 0.9 1.1
34.5ºC
P-p44/42
HA
U.R.: 1 1.6 1.5 1.1 1 0.5 0.5 0.4 0.4 0.4
B
- Glucosa
Control
ksg1-208
Tiempo: 0 15 30 60 90 0 15 30 60 90 min
25ºC
P-p44/42
HA
U.R.: 1 1.2 1.7 2.1 2 0.6 0.9 1.7 1.7 1.4
34.5ºC
P-p44/42
HA
U.R.: 1 1.7 2.2 2 1.4 0.6 0.5 0.7 0.6 0.4
C
Caspofungina
Calcoflúor
Control
ksg1-208
Control
ksg1-208
Tiempo: 0 30 60 0 30 60 min
0 60 120 0 60 120 min
25ºC
P-p44/42
HA
U.R.: 1 1.6 1.7 0.6 1.1 1.5
U.R.: 1 2 2.1 1.1 1.6 0.9
34.5ºC
P-p44/42
HA
U.R.: 1 1.8 2.1 0.5 0.5 0.7
U.R.: 1 1.6 1.7 0.5 0.8 0.9
D
ksg1-208 pmk1:HA
ksg1
-
Ksg1.K128R
Caspofungina
Tiempo: 0 30 60 0 30 60 0 30 60 min
P- p44/42
HA
U.R.: 1 2.4 2.6 0.8 0.9 0.7 0.5 0.7 0.9

Figura 4.2 Ksg1 es un regulador positivo de la ruta de integridad celular de *S. pombe* en respuesta a estrés. (A) Las cepas MI200 (Pmk1-HA6H; control) y MM667 (Pmk1-HA6H, *ksg1-208*) se cultivaron a 25ºC en medio YES hasta fase exponencial temprana, se transfirieron a 32 o 34,5ºC durante 1 hora, y se trataron con KCl 0,6M. **(B)** Las cepas descritas en (A) se cultivaron a 25ºC en medio YES con 7% glucosa, se incubaron a 34,5ºC durante 1h, y se transfirieron al mismo medio en presencia de 3% glicerol. **(C)** Las cepas descritas en (A) se cultivaron a 25ºC en medio YES, se transfirieron a 34,5ºC durante 1 hora, y se trataron con 1µg/ml de caspofungina o 1mg/ml de blanco de calcoflúor. **(D)** Las cepas MM667 (Pmk1-HA6H, *ksg1-208*), MM1372 (Ksg1-HA, *ksg1-208*) y MM1389 (Ksg1.K128R-HA, *ksg1-208*) se cultivaron a 25ºC en medio YES, se incubaron a 34,5ºC durante 1 hora, y se trataron con 1µg/ml de caspofungina. En todos los casos la fusión Pmk1-HA6H fue purificada por cromatografía de afinidad, y los niveles totales y activos de la quinasa se detectaron mediante inmunodetección con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-P-p44/42, respectivamente. U.R., unidades relativas.

dos sugieren que Ksg1 actúa como un regulador positivo de la ruta de integridad celular durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés.

4.3 Ksg1 no participa en la regulación de la ruta SAPK de *S. pombe*

Como se ha comentado previamente, *S. pombe* posee tres rutas de MAP quinasas, la ruta de respuesta a estrés (SAPK), la ruta activada por feromonas, y la ruta de integridad celular. La ruta SAPK fue la primera ruta de MAP quinasas identificada en *S. pombe* debido a su papel esencial durante el control del ciclo celular y en la supervivencia celular en condiciones de estrés. Con estos precedentes nos propusimos averiguar si Ksg1 presentaba algún tipo de interacción funcional con dicha ruta empleando a su elemento central, la MAPK Sty1, como chivato biológico. Se construyeron cepas que expresan los alelos silvestre (JM1250, control) y mutante (MM677, *ksg1-208*) de Ksg1 en un fondo genético con una versión genómica de $sty1^{+}$ fusionada en su extremo C-terminal a dos epítopos de hemaglutinina y seis histidinas consecutivas (Sty1-HA6H). Ambas cepas se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial temprana a 25ºC, se transfirieron a 34,5ºC durante una hora, y a continuación se sometieron bien a un estrés hiperosmótico con KCl, o a un estrés por ayuno de glucosa. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados, y se obtuvieron los correspondientes extractos celulares según se indica en el Apartado 3.8.1 de Materiales y Métodos. El estado de activación de Sty1 se determinó mediante *Western blotting* usando un anticuerpo anti-fosfo-p38 humano gracias a la fuerte homología existente entre las MAPKs Sty1 y p38 de mamíferos (Wilkinson *et al*., 1996). La cantidad de Sty1 total se detectó tras la hibridación con un anticuerpo anti-HA.

Tal como muestra la Figura 4.3, y a diferencia de lo que ocurría con Pmk1, la activación de Sty1 en respuesta a ambos estreses no se vio alterada significativamente en el mutante *ksg1-208* con respecto a la cepa control en cultivos incubados a 25ºC o a la temperatura restrictiva (34.5ºC). Por lo tanto, estos resultados sugieren que a diferencia de lo que ocurre con la ruta de integridad celular, Ksg1 no participa en la activación de la ruta SAPK inducida por estrés en *S. pombe*.

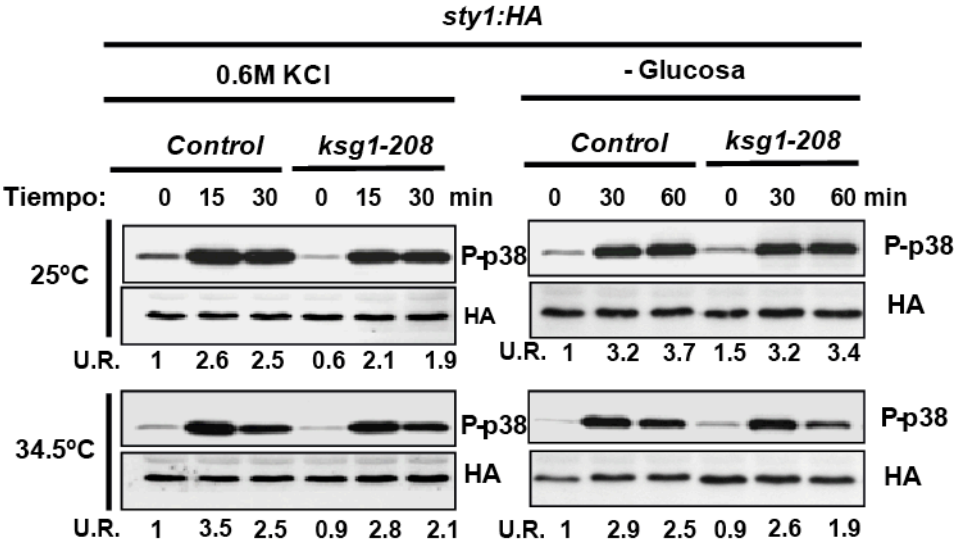


Figura 4.3 Ksg1 no participa en la activación de la ruta SAPK en respuesta a estrés. Las cepas JM1250 (Sty1-HA6H; control) y MM677 (Sty1-HA6H, *ksg1-208*) se cultivaron a 25ºC en medio YES (panel izquierdo), o medio YES con 7% glucosa (panel derecho), se incubaron a 34,5ºC durante 1 hora, y se trataron con 0,6M KCl o fueron transferidas al mismo medio con 3% glicerol (- glucosa). Los niveles activados y totales de Sty1 fueron determinados mediante inmunodetección utilizando anticuerpos anti-fosfo-p38 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas.

4.4 Ksg1 es necesario para la transmisión de la señal de activación de Pmk1 dependiente de Rho2-Pck2

Una vez confirmada la existencia de una interconexión entre Ksg1 y la ruta de integridad celular, nos planteamos averiguar la posición que ocupa Ksg1 en relación a los principales elementos activadores de dicha ruta. Ma *et al*. (2006) demostraron que la pequeña GTPasa Rho2 actúa aguas arriba de Pck2, que a su vez es responsable de la activación del módulo Mkh1-Pek1-Pmk1. Posteriormente, nuestro laboratorio confirmó que la activación de Pmk1 inducida por los estreses hipo- e hipertónico depende totalmente de la señalización mediada por Rho2-Pck2 (Barba *et al*., 2008). Recientemente nuestro grupo ha descrito que tanto Pck1 (el segundo ortólogo a PKC en *S. pombe*) como la GTPasa esencial Rho1 regulan la actividad de Pmk1 de forma aditiva y/o alternativa a Rho2 y Pck2 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta al daño en la pared celular (Sanchez-Mir *et al*., 2014b). Dado que Pck2 y la GTPasa Rho2 son los responsables fundamentales de la activación de Pmk1, decidimos averiguar la posición de Ksg1 respecto a estos dos reguladores dentro de la ruta de señalización.

Las cepas MI200 (Pmk1-HA6H, control) y MM667 (Pmk1-HA6H, *ksg1-208*) se transformaron con el plásmido pREP3X-*rho2*$^{+}$, que expresa el alelo silvestre de *rho2*$^{+}$ bajo el control de una versión "fuerte" (3X) del promotor regulado por tiamina (*nmt1*) (ver Apartados 3.3.2 y 3.6.1.2 de Materiales y Métodos). Una vez obtenidos los transformantes correspondientes, se cultivaron en medio mínimo EMM2 con o sin tiamina, para reprimir o favorecer, respectivamente, la expresión de

rho2^{+} . Tal como se observa en la Figura 4.4A, el incremento en el grado de fosforilación de Pmk1 que se observa en células control tras la sobreexpresión de *rho2*$^{+}$ se atenuó totalmente en el mutante *ksg1-208* tanto a temperatura permisiva (25ºC) como restrictiva (34,5ºC).

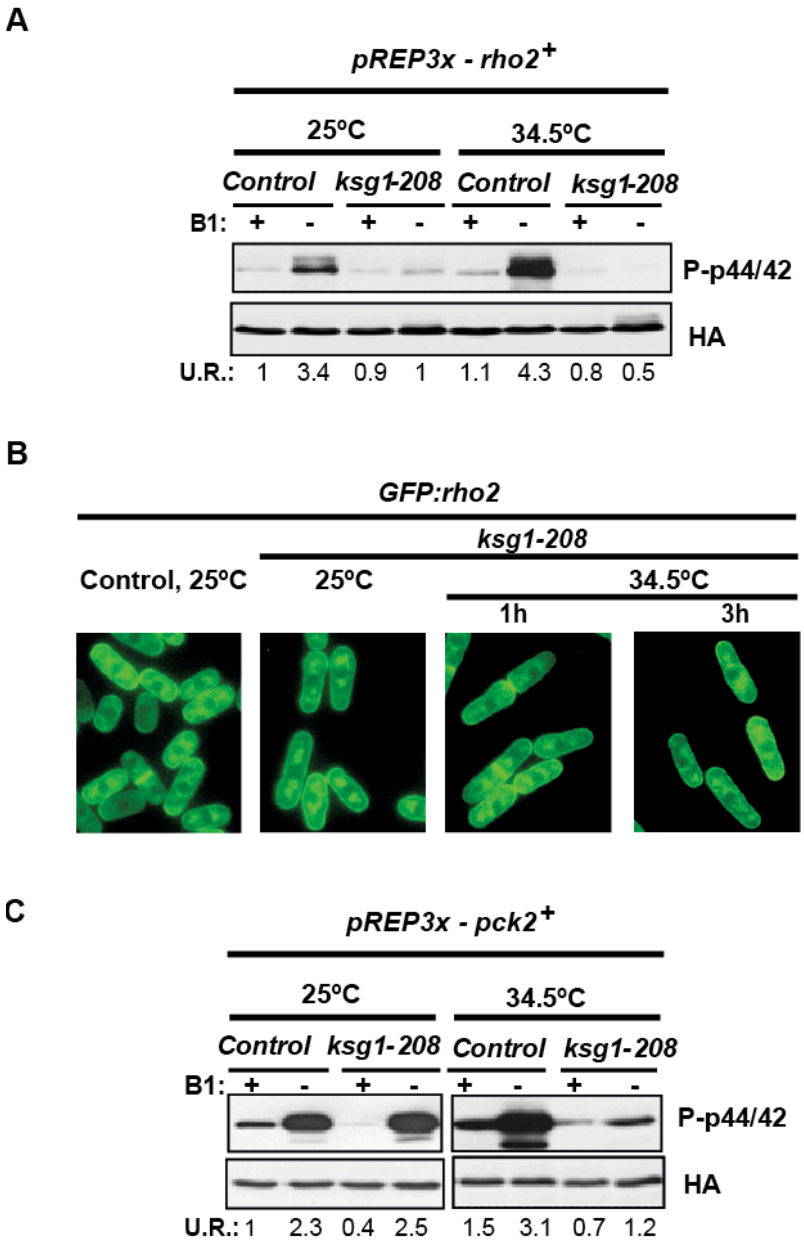


Figura 4.4 La función de Ksg1 es necesaria para la activación de Pmk1 dependiente del módulo Rho-Pck2. (A, C) Las cepas MI200 (Pmk1-HA6H; control) y MM667 (Pmk1-HA6H, *ksg1-208*) fueron transformadas por separado con los plásmidos pREP3X-*rho2*$^{+}$ (A), y pREP3X-*pck2*$^{+}$ (C), y se cultivaron a 25ºC o 34,5ºC durante 18h en presencia o ausencia de tiamina (B1). **(B)** Las cepas LSM300 (Rho2-GFP) y MM822 (Rho2-GFP, *ksg1*-208) se cultivaron a 25ºC hasta fase exponencial temprana, y se incubaron seguidamente a 34,5ºC durante los tiempos indicados. La localización subcelular de la proteína de fusión GFP-Rho2 se determinó mediante microscopía de fluorescencia.

Por otra parte, la localización de Rho2 en la membrana plasmática es crítica para su correcta activación y señalización hacia la ruta de integridad celular (Sanchez-Mir *et al*., 2014a). Por ello nos preguntamos si la falta de actividad de Ksg1 influye negativamente en la localización de Rho2. Para averiguarlo construimos las cepas LSM300 (Rho2-GFP) y MM822 (Rho2-GFP, *ksg1-208*), que expresan una versión del gen *rho2*$^{+}$ bajo el control de su propio promotor y fusionada en su extremo N-terminal a la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP). La Figura 4.4B muestra como la localización de Rho2 en la membrana plasmática no se vio afectada en el mutante *ksg1-208* a ninguna de las temperaturas ensayadas respecto a la cepa silvestre. En conjunto, estos resultados sugieren que Rho2 actúa aguas arriba de Ksg1 durante la regulación de la ruta de integridad celular.

De manera análoga a *rho2*$^{+}$, llevamos a cabo la sobreexpresión de *pck2*$^{+}$ a partir del plásmido pREP3X-*pck2*$^{+}$ en una cepa control y en el mutante *ksg1-208*. Tal como cabría esperar, la sobreexpresión de *pck2*$^{+}$ en la cepa control provocó un aumento notable en la activación de Pmk1 tanto a temperatura permisiva como restrictiva (Figura 4.4C). Pmk1 se hiperactivó de forma similar en el mutante *ksg1-208* a temperatura permisiva, mientras que a temperatura restrictiva la supresión de la activación fue parcial (Figura 4.4C). Este resultado favorece la posibilidad de que Pck2 actúe aguas abajo de Ksg1 durante la activación de la ruta de integridad celular. Por tanto, nuestras observaciones sugieren que Ksg1 regula la actividad de la ruta de integridad celular a través del módulo Rho2-Pck2.

4.5 La actividad de Ksg1 es necesaria para la síntesis de glucano mediada por Pck2

Los resultados obtenidos hasta el momento apuntaban a que Ksg1 podría estar regulando la ruta de integridad celular a través de Pck2. Además de jugar un papel crítico en la regulación de la activación de la ruta de integridad celular, Pck2 regula la biosíntesis de (1,3) β-glucano y α-glucano, los dos principales polisacáridos presentes en la pared celular de *S. pombe*, mediante su interacción con Rho1 y Rho2, respectivamente (Arellano *et al*., 1999; Calonge *et al*., 2000). Con el fin de examinar si la pérdida de actividad de Ksg1 afecta negativamente a la biosíntesis de la pared celular, analizamos comparativamente la composición de la pared celular en las cepas MI200 (Pmk1-HA6H, control), MM667 (Pmk1-HA6H, *ksg1-208*) y GB3 (Pmk1-HA6H, *pck2Δ*). Estos experimentos se realizaron en colaboración con el laborarorio de la Profesora Pilar Pérez en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC/Universidad de Salamanca). Para ello las cepas se cultivaron en medio YES a 25ºC o 34,5ºC hasta fase exponencial temprana, se suplementaron con glucosa marcada con carbono 14 (Glucosa C^{14}), y se incubaron durante 6 horas adicionales antes de la toma de muestras. Las distintas alícuotas se procesaron tal y como se describe en el Apartado 3.7 de Materiales y Métodos.

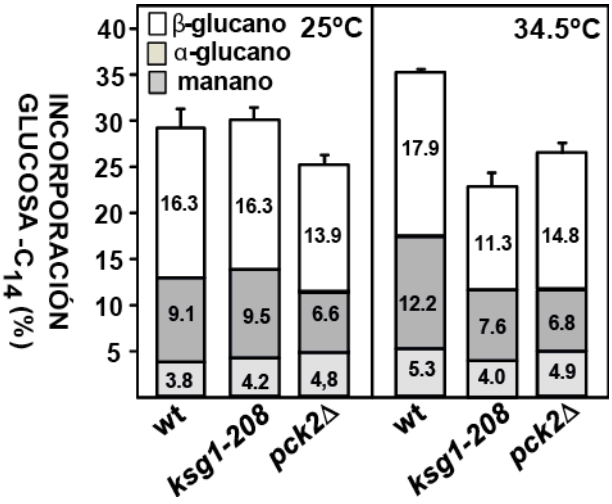


Figura 4.5 Ksg1 regula la biosíntesis de pared celular en *S. pombe.* Las cepas MI200 (Pmk1-HA6H, WT), MM667 (Pmk1-HA6H*, ksg1-208*) y GB3 (Pmk1-HA6H, *pck2Δ*) se cultivaron en medio YES a 25 o 34,5ºC. A continuación se añadió a los cultivos ^{14}C-glucosa, y se incubaron durante 6h adicionales antes de recoger las células. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los valores de carbohidrato total en cada caso.

Como se observa en la Figura 4.5, en contraste con la cepa control, la incubación de la cepa *ksg1-208* a 34,5°C provocó un claro descenso en la cantidad de glucosa incorporada en la pared celular (~30%), además de una notable caída en el contenido de α- y β-glucanos, cuya síntesis depende de la actividad de Pck2 (α-glucano) y de Pck1 y Pck2 (β-glucano) (Calonge *et al*., 2000). Además, a diferencia del β-glucano, el descenso en el contenido de α-glucano fue similar en los mutantes *ksg1-208* y *pck2Δ* incubados a 34.5°C. Por tanto, estos resultados apuntan a que Pck1 y Pck2 son dianas de Ksg1 durante la síntesis de α- y β-glucanos de la pared celular.

4.6 Ksg1 interacciona con Pck1 y Pck2 *in vivo*

Estudios previos mediante ensayos de dos híbridos indicaron que Ksg1 interacciona con Pck1 y Pck2 (Graub *et al*., 2003). Sin embargo, empleando ensayos de coinmunoprecipitación estos autores confirmaron la interacción *in vivo* de Ksg1 con Pck1, pero no con Pck2 (Graub *et al*., 2003). Para analizar la interacción de Ksg1 con Pck1 y/o Pck2 empleamos las cepas PPG5.16 y PPG5.23, que expresan versiones genómicas de *pck1*$^+$ y *pck2*$^+$ fusionadas al epítopo HA en el extremo amino-terminal, respectivamente, y bajo el control de una versión atenuada (41X) del promotor regulado por tiamina. Tras 24h de crecimiento en medio mínimo sin tiamina, los extractos obtenidos fueron incubados con versiones silvestre y catalíticamente inactiva (KD) de Ksg1 fusionadas al epítopo GST (**G**lutatión **S**-**T**ransferasa) en su extremo amino-terminal. Dichas fusiones se obtuvieron tras su expresión en *E. coli*, tal y como se describe en el Apartado 3.8.3 de Materiales y Métodos. Una vez

incubadas, las fusiones a GST se purificaron mediante cromatografía de afinidad con una matriz de glutatión sefarosa, y las proteínas unidas a la matriz se analizaron por *Western Blotting* empleando anticuerpos anti-HA o anti-GST. En la Figura 4.6 se observa que tanto HA-Pck1 como HA-Pck2 co-purificaron de manera específica con las versiones silvestre y catalíticamente inactiva de Ksg1 fusionadas a GST. Por el contrario apenas se observó señal con el anticuerpo anti-HA tras la purificación del epítopo GST no fusionado (Figura 4.6). Estos resultados confirman que tanto Pck1 como Pck2 interaccionan físicamente con Ksg1 *in vivo* e independientemente de su estado catalítico.

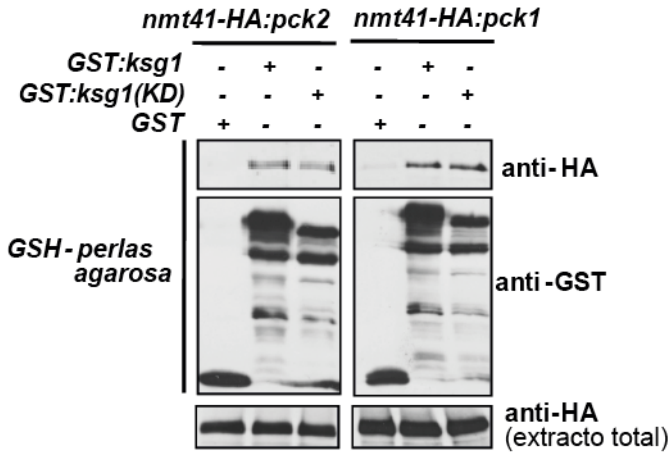


Figura 4.6 Ksg1 interacciona físicamente con Pck1 y Pck2. Las cepas PPG5.23 (*nmt:HA-Pck2*) y PPG5.16 (*nmt41:HA-Pck1*) se cultivaron en medio EMM2 sin tiamina durante 24h. Los extractos celulares correspondientes se incubaron con GST, y las fusiones GST:Ksg1-K128R (KD, catalíticamente inactiva), y GST:Ksg1 (control) purificadas a partir de cultivos de *E. coli*. Finalmente las distintas fusiones a GST se purificaron con glutatión sefarosa 4B, se resolvieron mediante SDS-PAGE, y se detectaron tras la incubación con anticuerpos anti-HA y anti-GST.

4.7 Ksg1 fosforila *in vitro* a Pck2 en el residuo T842 del bucle de activación

Al igual que el resto de PKCs, Pck2 contiene en el dominio quinasa tres sitios de fosforilación críticos para su actividad catalítica, conocidos como bucle de activación, motivo de giro y motivo hidrofóbico (Freeley *et al*., 2011; Newton, 2010). Para identificar con exactitud los residuos fosforilables conservados dentro de estos motivos, llevamos a cabo un análisis de la secuencia de aminoácidos de Pck2 y un alineamiento de la misma con distintas PKCs de humanos y otras AGC quinasas reguladas por PDK1/Ksg1 (Figura 4.7A). Ello nos permitió identificar los posibles residuos fosforilables por Ksg1 presentes en el bucle de activación (treonina 842), y en los motivos de giro (treonina 984), e hidrofóbico (serina 1002). También identificamos dos residuos de fenilalanina conservados en posiciones 998 y 1001 dentro del motivo hidrofóbico que previamente habían sido

descritos en las PKC atípicas PKCζ y PRK2 de humanos como un sitio de acoplamiento de PDK1 que media la posterior fosforilación del bucle de activación (Balendran *et al*., 2000) (Figura 4.7A).

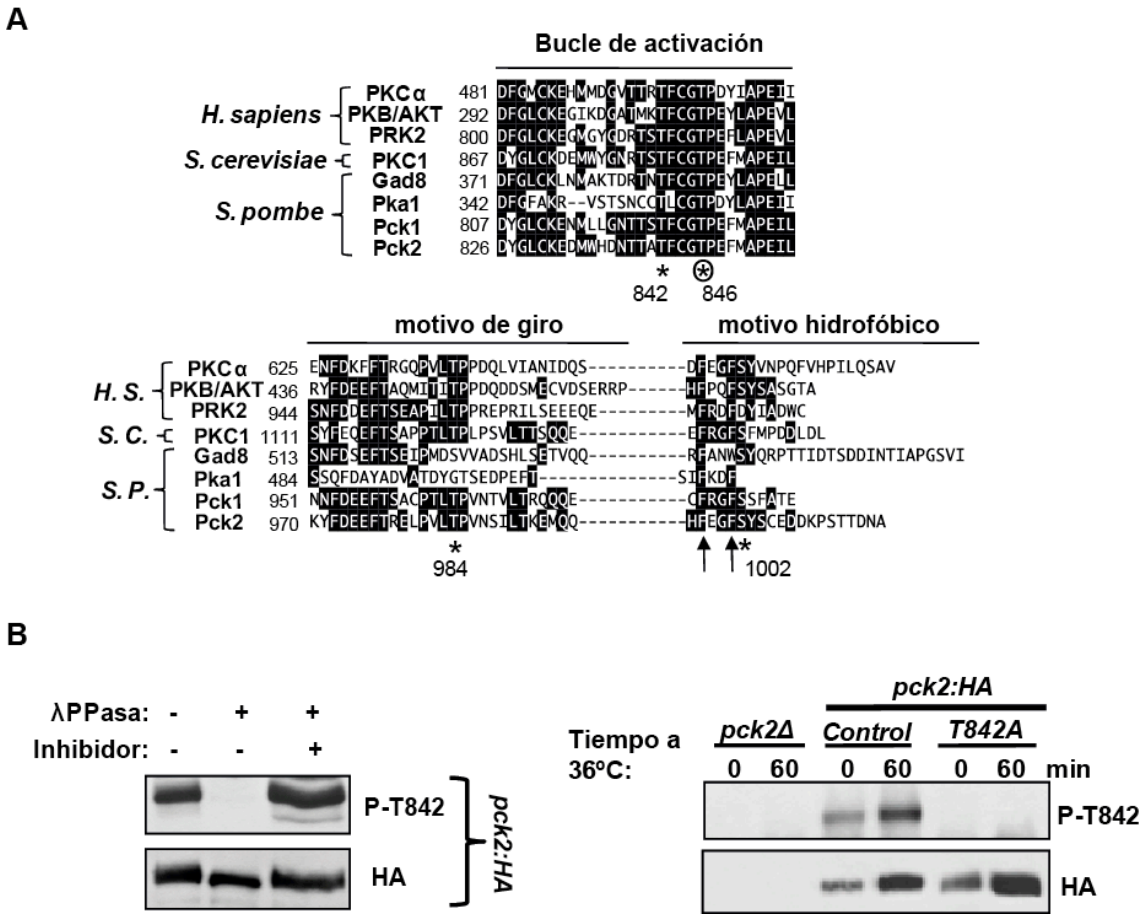


Figura 4.7 (A) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los dominios de activación de distintas quinasas de la familia AGC presentes en seres humanos y en levaduras. *H.S., Homo sapiens; S.C., Saccharomyces cerevisiae; S.P., Schizosaccharomyces pombe*. Los residuos fosforilables canónicos conservados dentro del bucle de activación, motivo de giro y motivo hidrofóbico se indican con asteriscos. El asterisco rodeado de un círculo indica el residuo fosforilable putativo alternativo presente en el bucle de activación. Las flechas indican los residuos de fenilalanina conservados que definen el sitio hipotético de anclaje para la PDK. **(B)** Validación del fosfo-anticuerpo específico para el residuo conservado T842 del bucle de activación de Pck2. **Panel izquierdo**. La cepa MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA6H) se cultivó a 28ºC en medio YES hasta fase exponencial temprana. Los extractos celulares se dejaron sin tratar (calle 1), se incubaron con fosfatasa lambda durante 30 minutos (calle 2), o con fosfatasa lambda en presencia de ortovanadato sódico, un inhibidor específico de la actividad fosfatasa (calle 3). La detección de Pck2 total y fosforilado en T842 se realizó tras la incubación con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-T842 (P-T842), respectivamente. **Panel derecho**. Las cepas GB3 (*pck2Δ*), MM913 (Pck2-HA; control) y MM918 (Pck2.*T842A*-HA) se cultivaron a 28ºC en medio YES (tiempo 0), y se incubaron a 36ºC durante 1 hora. Una vez resueltos por SDS-PAGE, los extractos celulares correspondientes se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-fosfo-T842 y anti-HA.

Con el objeto de analizar el estado de fosforilación de Pck2 en el bucle de activación (T842), obtuvimos un anticuerpo policlonal en conejo que denominamos anti-fosfo-T842, el cual debería ser capaz de detectar de manera específica la fosforilación en dicho residuo. Con el fin de confirmar la especificidad del anticuerpo para detectar fosforilación, se llevó a cabo un experimento de desfosforilación *in vitro* de Pck2. La cepa MM913 (Pck2-HA) se cultivó en medio rico YES hasta mitad de fase exponencial a 28ºC. Tras la obtención de los extractos celulares, se dejaron sin tratar o se incubaron con fosfatasa lambda en presencia o ausencia de ortovanadato sódico (inhibidor de la actividad fosfatasa). A continuación, se resolvieron en geles desnaturalizantes de acrilamida, y las membranas se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-fosfo-T842 y anti-HA (control de carga). Como muestra la Figura 4.7B (panel izquierdo), se observó una clara señal de fosforilación de Pck2 en la muestras correspondientes al extracto no tratado (calle 1), o incubado con fosfatasa lambda en presencia de ortovanadato sódico (calle 3). Por el contrario, la banda de fosforilación de Pck2 desapareció tras el tratamiento con fosfatasa lambda (calle 2). Este resultado indica que el fosfo-anticuerpo es capaz de detectar una forma fosforilada de Pck2. Para confirmar que el fosfo-anticuerpo detecta específicamente la fosforilación de Pck2 en el residuo T842 del bucle de activación, se realizó un experimento tipo Western como el descrito anteriormente empleando extractos procedentes de las cepas GB3 (*pck2Δ*), MM913 (Pck2-HA; control), y MM918 (Pck2.T842A-HA) creciendo vegetativamente a 28ºC, y tras una incubación a 36ºC durante 1 hora. Esta última cepa expresa una versión de Pck2 en la que la treonina en posición 842 ha sido sustituida por alanina. Como muestra la Figura 4.7B (panel derecho), a diferencia de la cepa control, el fosfo-anticuerpo no detectó señal alguna en los extractos procedentes de los mutantes *pck2Δ* y Pck2.T842A. Este resultado confirma que el anticuerpo detecta específicamente la fosforilación *in vivo* de Pck2 en T842. Al mismo tiempo, este experimento puso de manifiesto que el estrés térmico induce un aumento claro en los niveles totales de Pck2 y en la fosforilación del bucle de activación (Figura 4.7B, panel derecho).

Para profundizar en el estudio de la relación funcional entre Ksg1 y Pck2, comenzamos preguntándonos si Ksg1 es responsable de la fosforilación de Pck2 en el sitio conservado (T842) del bucle de activación. Para ello realizamos ensayos quinasa *in vitro* utilizando distintas versiones de Ksg1 y Pck2 fusionadas a GST en su extremo amino terminal que se expresaron en *E.coli* y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con glutatión Sefarosa 4B. Las fusiones GST:Ksg1 y GST:Ksg1-K128E (KD, catalíticamente inactiva), se incubaron con GST:Pck2 (WT, versión silvestre), GST:Pck2-T842A, y GST:Pck2-K712W (KW, versión catalíticamente inactiva de Pck2) durante 1h a 30ºC en presencia de ATP. Como controles negativos, se incubaron por separado las fusiones GST:Pck2 y GST:Ksg1 en ausencia de ATP. Finalmente, las proteínas se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida-SDS y se analizaron mediante *Western Blotting* empleando los anticuerpos anti-fosfo-T842 (P-T842) y anti-GST(control de carga). Tal como indica la Figura 4.8A (calle 5), se observó una fuerte señal de fosforilación de Pck2 en T842 en el ensayo quinasa realizado

con las versiones silvestres de Ksg1 y Pck2, siendo dicha fosforilación totalmente dependiente de la presencia de ATP en el ensayo (calle 9). Por el contrario, no se detectó fosforilación en T842 en presencia de una versión catalíticamente inactiva de Ksg1 (calle 6), o en el mutante *T842A* de Pck2 (calle 7). Además, la fosforilación en T842 no se vio afectada por la presencia de una versión catalíticamente inactiva de Pck2 (KW; Figura 4.8A, calle 10), lo que confirma que la fosforilación en dicho residuo no es debida a una posible autofosforilación de Pck2. Estos resultados confirman que Ksg1 fosforila a Pck2 en el residuo T842 del bucle de activación *in vitro*.

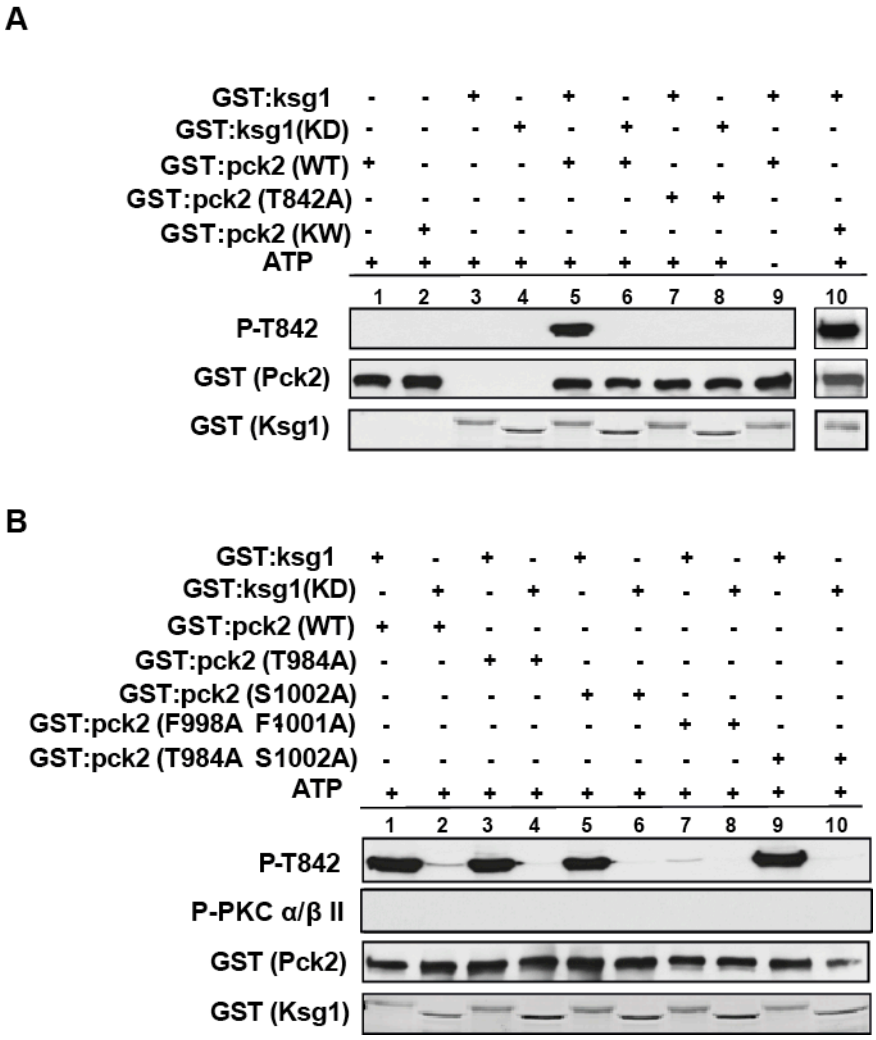


Figura 4.8 Ksg1 fosforila a Pck2 en T842 *in vitro*. (A) Las fusiones GST:Pck2 (silvestre; WT), GST:Pck2.*T842A* y GST:Pck2.K712W (catalíticamente inactiva; KD) se incubaron a 30ºC durante 1 hora con las quinasas GST:Ksg1.K128R (versión catalíticamente inactiva; KD) o GST:Ksg1 en presencia o ausencia de ATP. Las distintas mezclas de reacción se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-fosfo-T842 o anti-GST. **(B)** Se realizó un ensayo idéntico al descrito en el apartado (A), utilizando en esta caso como sustratos las fusiones GST:Pck2 (silvestre; WT), GST:Pck2.T984A, GST:Pck2.S1002A, GST:Pck2.F998AF1001A y GST:Pck2.T984AS1002A. Las mezclas de reacción se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-fosfo-T842, anti-fosfo-PKCα/βII y anti-GST.

Con el fin de determinar si las mutaciones de Ksg1 en los residuos conservados T984 (motivo de giro), S1002 (motivo hidrofóbico), y F998 y F1001 (sitio de anclaje; ver Figura 4.7 en Resultados) comprometían de alguna manera la fosforilación de Pck2 en T842 dependiente de Ksg1, realizamos ensayos quinasa *in vitro* similares al anterior, incluyendo en este caso las fusiones GST:Pck2.T984A, GST:Pck2.S1002A, GST:Pck2.F998A F1001A y GST:Pck2.T984A S1002A. La incubación con el anticuerpo anti-fosfo-T842 puso de manifiesto que la sustitución de los residuos T984 y S1002 por alanina no afectó a la fosforilación de Pck2 en T842, incluso en un mutante doble en ambos residuos (Figura 4.8B; calles 3, 5 y 9). Por el contrario, la sustitución de los dos residuos aromáticos de fenilalanina del dominio hidrofóbico por alanina (mutante *F998A F1001A*) redujo drásticamente la fosforilación *in vitro* de Pck2 en T842 (Figura 4.8B; calle 7). Este resultado sugiere que el dominio hidrofóbico de Pck2 podría definir un sitio de acoplamiento para Ksg1 previo a la posterior fosforilación en T842 del bucle de activación.

4.8 Ksg1 fosforila *in vivo* a Pck2 en el residuo conservado de treonina-842 del bucle de activación

Como hemos visto en el apartado anterior, Ksg1 fosforila *in vitro* a Pck2 en T842. Sin embargo, quedaba por demostrar que dicha fosforilación también tiene lugar *in vivo*. Para ello construimos las cepas MM913 (Pck2-HA; control), y MM1100 (Pck2-HA, *ksg1-208*), que expresan una versión genómica de Pck2 fusionada a la secuencia codificante del epítopo HA en su extremo carboxilo terminal en un fondo genético silvestre y *ksg1-208*, respectivamente. Ambas cepas se cultivaron a temperatura permisiva (25ºC) hasta mitad de fase exponencial, y posteriormente se incubaron durante 4 horas a temperatura restrictiva (36ºC), tomando muestras a diferentes tiempos. Posteriormente, se determinó la fosforilación de Pck2 en T842 mediante *Western* utilizando el anticuerpo anti-fosfo-T842 (P-T842). La cantidad total de Pck2 se detectó con el anticuerpo anti-HA, mientras que como control interno de carga se empleó un anticuerpo anti-cdc2

La incubación de la cepa control a 36ºC provocó un aumento en el nivel total de Pck2 (anti-HA), aunque dicho incremento fue mucho más evidente en la fosforilación en T842 (anti-P-T842) (Figura 4.9A), tal como se observa tras cuantificar la relación de señal anti-P-T842/anti-HA. Aunque en menor medida que en la cepa control, los niveles totales de Pck2 también aumentaron en el mutante *ksg1-208* tras su incubación a 36ºC. Por el contrario, en las mismas condiciones la fosforilación de Pck2 en T842 fue apenas perceptible. Estos resultados evidencian que Ksg1 fosforila a Pck2 *in vivo* en la posición T842 del bucle de activación, y que dicha fosforilación aumenta notablemente junto con los niveles totales de proteína durante el estrés térmico. Por otro lado, el déficit en los niveles de Pck2 que muestra el mutante *ksg1-208* a temperatura restrictiva sugiere que Ksg1 podría regular además la síntesis y/o estabilización de Pck2.

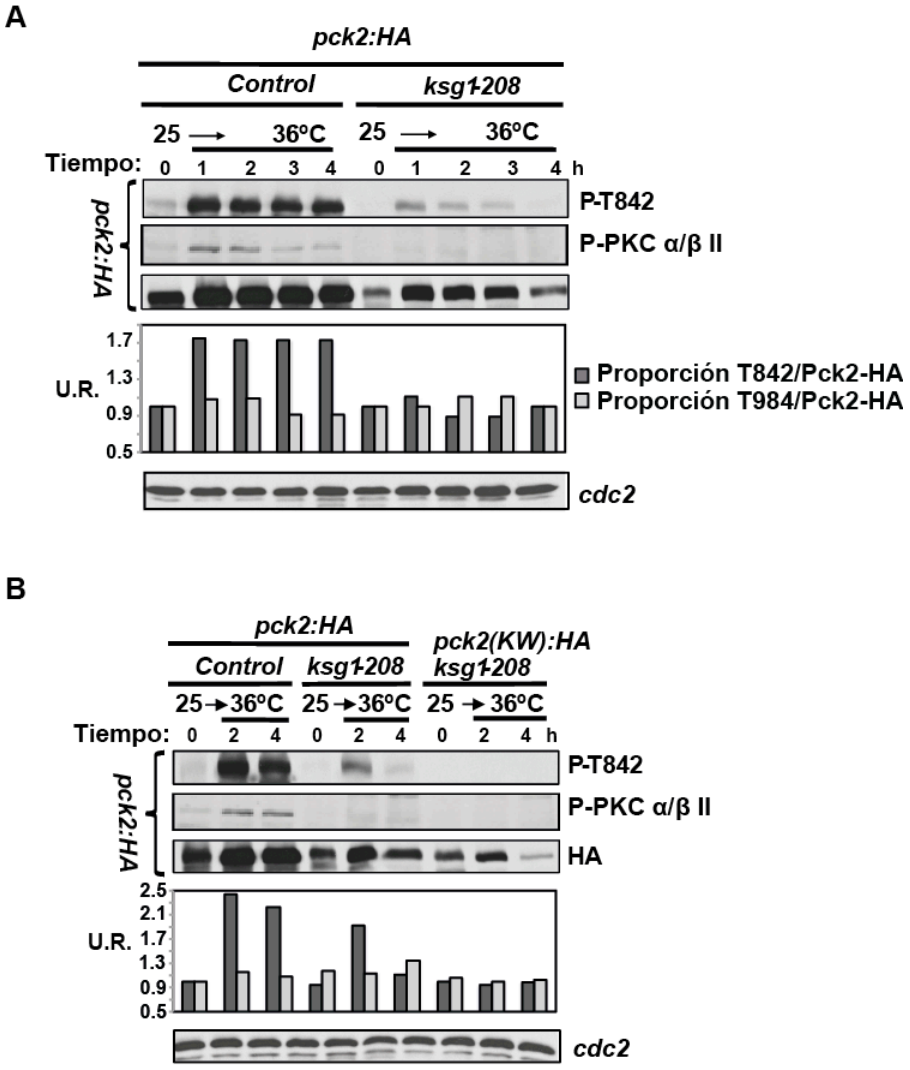


Figura 4.9 Ksg1 fosforila *in vivo* a Pck2 en el residuo T842. Las cepas MM913 (Pck2-HA; control) y MM1100 (Pck2-HA, *ksg1-208*) **(A)**, MM913, MM1100, y MM1130 (Pck2.K712W-HA, *ksg1-208*) **(B)** se cultivaron en medio YES a 25ºC y posteriormente se incubaron a 36ºC durante los tiempos indicados. En ambos casos los extractos celulares correspondientes se resolvieron mediante SDS-PAGE y se incubaron con los anticuerpos anti-fosfo-T842 (fosforilación de Pck2 en T842) y anti-fosfo-PKCα/βII (fosforilación de Pck2 en T984). Como control interno de carga se determinó la cantidad de Cdc2 empleando un anticuerpo anti-cdc2.

Si Ksg1 es el único responsable de la fosforilación en el bucle de activación de Pck2, no debería detectarse fosforilación en T842 tras la incubación del mutante *ksg1-208* a la temperatura restrictiva. Sin embargo, la existencia de un cierto nivel de fosforilación en dicho mutante durante la incubación a 36ºC (Figura 4.9A) nos indujo a plantear que podrían existir otros mecanismos responsables de la fosforilación *in vivo* del bucle de activación de Pck2. Para confirmar esta posibilidad, repetimos el experimento descrito anteriormente incluyendo el mutante MM1130 (Pck2.K712W-HA, *ksg1-208*), que expresa una forma catalíticamente inactiva de Pck2 en un fondo genético *ksg1-208*. La ausencia de actividad catalítica de Pck2 en este mutante provocó una reducción

adicional en los niveles totales de Pck2 además de una ausencia total de fosforilación en T842 (Figura 4.9B). Estas observaciones sugieren que la fosforilación *in vivo* del bucle de activación de Pck2 en la posición T842 es mediada por Ksg1 y un mecanismo de autofosforilación.

4.9 Fosforilación *in vivo* del motivo de giro de Pck2

Según el modelo basado en estudios realizados con PKCs clásicas, su mecanismo de activación sigue un modelo secuencial que implica la fosforilación inicial por la PDK en el bucle de activación, lo que promueve la fosforilación de los motivos de giro e hidrofóbico mediante autofosforilación o por medio de quinasas del complejo TOR (Freeley *et al*., 2011; Newton, 2010). Con el fin de analizar la fosforilación de Pck2 en el residuo conservado del motivo de giro (T984), utilizamos un anticuerpo comercial anti-fosfo-PKCα/βII (P- PKCα/βII; Cell Signaling), que había sido empleado previamente con éxito para la detección de la fosforilación del residuo equivalente del motivo de giro presente en PKC1 de *S. cerevisiae* (Facchinetti *et al*., 2008).

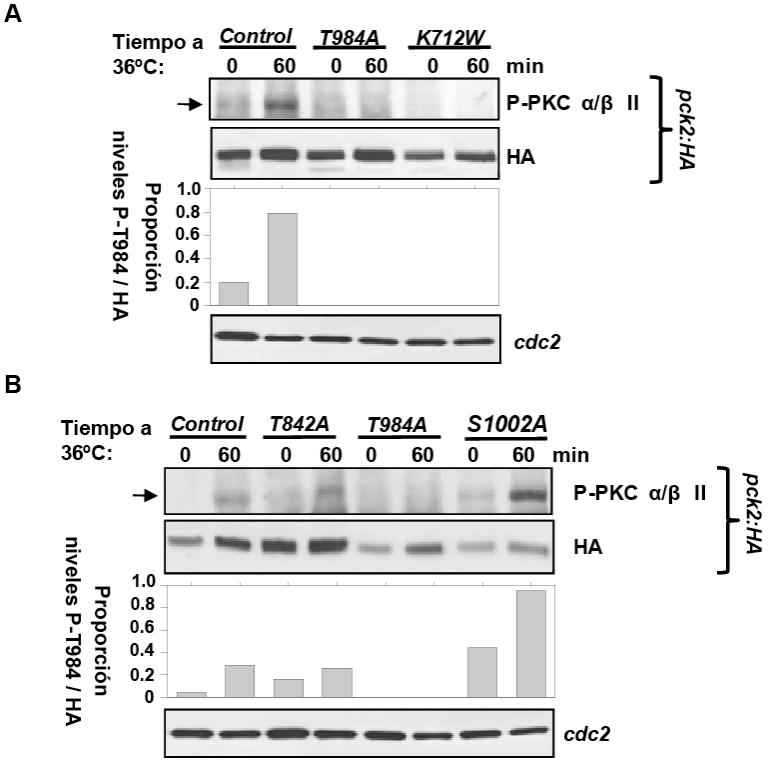


Figura 4.10 (A) Validación del fosfo-anticuerpo específico para el residuo conservado T984 del motivo de giro de Pck2. Las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM1009 (Pck2.T984A-HA) y MM1022 (Pck2.K712W-HA), que expresan una versión genómica Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES a 28ºC (tiempo 0), y se incubaron a 36ºC durante una hora. La detección de Pck2 total y fosforilado en T984 se llevó a cabo tras la incubación con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-PKCα/βII, respectivamente. **(B)** Se obtuvieron extractos celulares de las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM918 (Pck2.T842A-HA), MM1009 (Pck2.T984A-HA) y MM1011 (Pck2.S1002A-HA), y se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-fosfo-PKCα/βII y anti-HA. En ambos experimentos se determinó la cantidad de Cdc2 empleando un anticuerpo anti-cdc2 como control interno de carga.

Para confirmar que el anticuerpo anti-fosfo-PKCα/βII detectaba de forma específica la fosforilación en el residuo T984 de Pck2, se cultivaron las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM1009 (Pck2.T984A-HA), MM1022 (Pck2.K712W-HA) MM918 (Pck2.T842A-HA), MM1009 (Pck2.T984A-HA) y MM1011 (Pck2.S1002A-HA) a la temperatura permisiva (25ºC) hasta la mitad de la fase exponencial, y posteriormente se incubaron durante 1 hora a la temperatura restrictiva (36ºC). Posteriormente, se determinó la activación de Pck2 en T984 mediante *Western* utilizando el anticuerpo anti-fosfo-PKCα/βII. La cantidad total de Pck2 se detectó con el anticuerpo anti-HA, mientras que como control de carga se empleó un anticuerpo anti-cdc2.

Como muestra la Figura 4.10A, el anticuerpo anti-fosfo-PKCα/βII detectó una señal específica de fosforilación en extractos de la cepa control, pero no en los pertenecientes a la cepa que expresa la versión mutante Pck2.T984A, lo que confirma que este anticuerpo detecta específicamente la fosforilación de Pck2 en el residuo T984.

La fosforilación *in vivo* de Pck2 en T984 aumentó en la cepa control durante la incubación a 36ºC (Figuras 4.9A y 4.9B). Sin embargo este aumento fue indetectable en el mutante *ksg1-208* que expresa las versiones silvestre o catalíticamente inactiva de Pck2 (Figuras 4.9A y 4.9B). Inicialmente este resultado podría sugerir que Ksg1 es responsable de la fosforilación del motivo de giro en Pck2. Sin embargo, Ksg1 no fosforiló *in vitro* a Pck2 en T984 (Figura 4.8B). Esta observación, unida al hecho de que T984 no se fosforila *in vivo* en un mutante que expresa una versión catalíticamente inactiva de Pck2 (mutante K712W) (Figura 4.10A), pero si en el mutante carente del sitio conservado del bucle de activación (T842A) (Figura 4.10B), sugiere que la fosforilación *in vivo* de Pck2 en el residuo T984 del motivo hidrofóbico tiene lugar mediante un mecanismo de autofosforilación.

4.10 Significación funcional de la fosforilación del dominio de activación de Pck2 por Ksg1

Evidencias obtenidas con isoformas de PKC en distintos organismos (Freeley *et al*., 2011) apoyan la hipótesis de que la fosforilación en el residuo T842 del bucle de activación de Pck2 mediada por Ksg1 debería ser esencial para regular su actividad biológica. Por tanto, decidimos estudiar el papel de los distintos sitios de fosforilación conservados del dominio de activación de Pck2 sobre su actividad reguladora de la morfogénesis y la ruta de integridad celular. Para ello transformamos separadamente la cepa MI200 (Pmk1-HA6H) con los plásmidos de expresión pREP3X-Pck2 (Control), pREP3X-Pck2.T842A, pREP3X-Pck2.T984A, pREP3X-Pck2.S1002A, o pREP3X-Pck2.T846A. Una vez seleccionados los transformantes, se cultivaron en medio mínimo EMM2 en presencia o ausencia de tiamina durante 18h, se recogieron alícuotas de cada cultivo, y se procedió al análisis de la activación de Pmk1 utilizando el anticuerpo anti-fosfo-p44/42. Los niveles totales de Pmk1 y Pck2 fueron detectados con el anticuerpo anti-HA. Además, se visualizaron los septos y la pared celular de los distintos transformantes creciendo en ausencia de tiamina tras la tinción con

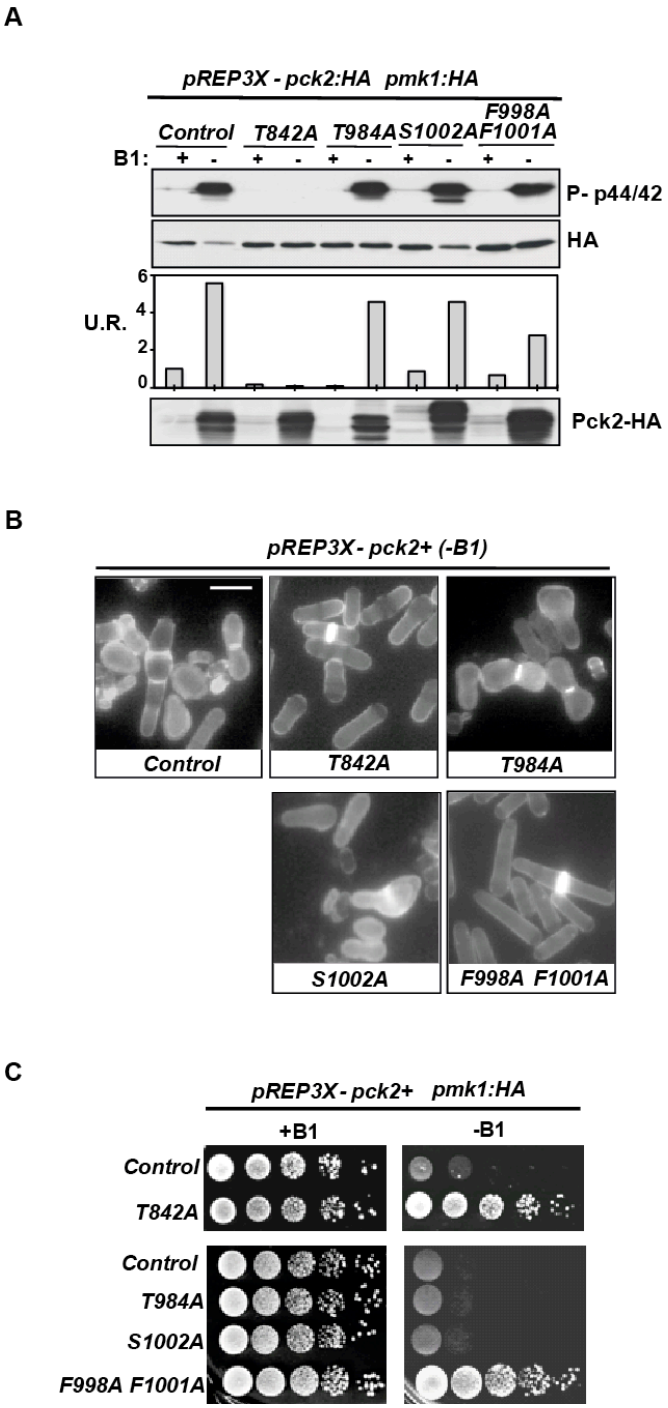


Figura 4.11 Significación funcional de la fosforilación en el bucle de activación de Pck2. (A) La cepa MI200 (Pmk1-HA6H) se transformó por separado con los plásmidos de expresión pREP3X-Pck2-HA (Control), pREP3X-Pck2.T842A-HA, pREP3X-Pck2.T984A-HA, pREP3X-Pck2.S1002A-HA, y pREP3X-Pck2.F998A F1001A-HA, y los transformantes correspondientes se cultivaron durante 18h en medio mínimo EMM2 en presencia (+) o ausencia (-) de tiamina (B1). La forma fosforilada de Pmk1 se determinó por inmunodetección con el anticuerpo anti-fosfo-p44/42, mientras que Pmk1 y Pck2 totales se detectaron empleando un anticuerpo anti-HA. U.R., unidades relativas. **(B)** Análisis mediante microscopía de fluorescencia de los transformantes descritos en (A). Tras cultivar las células en ausencia de tiamina, se tiñeron con el fluoróforo blanco de calcoflúor. **(C)** Diluciones seriadas de las cepas descritas en (A) se sembraron en placas con medio mínimo EMM2 en presencia o ausencia de tiamina, y se incubaron a 28ºC durante 4 días.

el fluoróforo blanco de calcoflúor. Por último se tomaron alícuotas de cada cultivo, se ajustó la concentración celular a $1x10^7$ células/mililitro, y se sembraron diluciones seriadas sobre placas Petri con medio mínimo EMM2 en ausencia y en presencia de tiamina 5mM (B1), incubándose a 28ºC durante 4 días.

Como se muestra en las Figuras 4.11A, 4.11B y 4.11C, la sobreexpresión ectópica del gen *pck2*$^+$ (control) indujo un notable aumento en la fosforilación de Pmk1 que se vio acompañado de alteraciones morfológicas severas que provocan la muerte celular (Arellano *et al*., 1999; Ma *et al*., 2006; Sanchez-Mir *et al*., 2014b). Sin embargo, la sobreexpresión de la versión mutante Pck2.T842A no incrementó el nivel de fosforilación de Pmk1 (Figura 4.11A), no provocó cambios morfogenéticos (Figura 4.11B), ni alteraciones en el crecimiento celular (Figura 4.11C). Por el contrario, la sobreexpresión de los mutantes en el motivo de giro (T984A) o hidrofóbico (S1002A) provocó los mismos fenotipos que la versión control de Pck2 (Figuras 4.10A-C). Sorprendentemente, aunque la sobreexpresión de la versión mutante Pck2.F998AF1001A incrementó notablemente el grado de fosforilación de Pmk1, no afectó negativamente a la morfología y la viabilidad celulares (Figuras 4.11A-C), lo que confirma la relevancia funcional del motivo hidrofóbico para la funcionalidad de Pck2 *in vivo*. En conjunto, estos resultados sugieren que, al contrario que el motivo de giro y motivo hidrofóbico, la fosforilación *in vivo* de Pck2 por Ksg1 en el residuo conservado T842 del bucle de activación es esencial para regular su actividad biológica.

4.11 La fosforilación del bucle de activación de Pck2 no es necesaria para el mantenimiento de los niveles basales de Pmk1 activo

Con el fin de disponer de una visión más precisa del impacto de la fosforilación de Pck2 en su actividad biológica, nos planeamos estudiar la capacidad del alelo silvestre y distintos mutantes de Pck2 controlados por su propio promotor para suprimir el defecto de activación de la ruta de integridad celular del mutante nulo *pck2Δ* (Ma *et al*., 2006; Barba *et al*., 2008).

Las cepas GB3 (*pck2Δ*), MM913 (Pck2-HA; control), y los mutantes que expresan versiones mutadas de Pck2-HA en los sitios de fosforilación conservados descritos en el Apartado 4.6 se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial temprana. Tras recoger las distintas alícuotas, los niveles basales de fosforilación de Pmk1 se analizaron utilizando el anticuerpo anti-fosfo-p44/42, mientras que la proteína total se determinó con un anticuerpo anti-HA.

Sorprendentemente, el nivel basal de fosforilación de Pmk1 del mutante que expresa la versión genómica Pck2.T842A (Figura 4.12, calle 5) fue muy similar al de la cepa control (calle 2). De forma análoga, los niveles basales de fosforilación de Pmk1 en los mutantes Pck2.T984A (calle 8), Pck2.T984A S1002A (calle 10), y Pck2.F998A F1001A (calle 7) fueron muy similares a los obtenidos en la cepa que expresa la versión silvestre de Pck2 (Figura 4.12, calle 2).

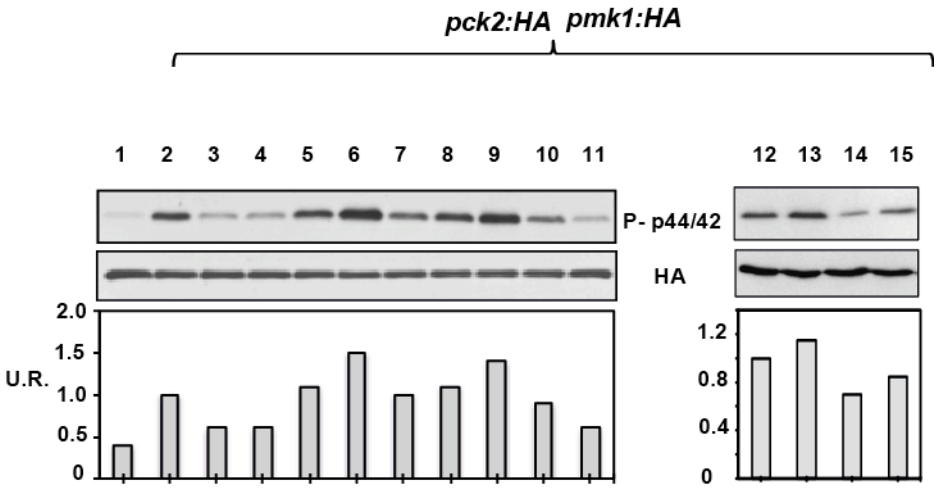


Figura 4.12 Niveles basales de actividad de Pmk1 en distintos mutantes de Pck2 en el dominio de activación. Las cepas GB3 (*pck2Δ*), MM913 (Pck2-HA; control), MM1022 (Pck2.K712W-HA), MM982 (Pck2.K712E-HA), MM918 (Pck2.T842A-HA), MM929 (Pck2.T842D-HA), MM998 (Pck2.F998A F1001A-HA), MM1009 (Pck2.T984A-HA), MM1011 (Pck2.S1002A-HA), MM1042 (Pck2.T984A S1002A-HA), MM1123 (Pck2.T842A T984A-HA), MM995 (Pck2.S1002E-HA), MM991 (Pck2.S1002D-HA) , que expresan una versión genómica de la proteína de fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES a 28ºC hasta mitad de fase exponencial. La forma activa y total de Pmk1 se detectó tras la incubación con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas.

Por otro lado, las cepas que expresan una forma fosfomimética del residuo T842 (alelo T842D), así como el mutante en el dominio hidrofóbico (S1002A) mostraron un incremento en la fosforilación basal de Pmk1 (Figura 4.12, panel izquierdo, calles 6 y 9). En el caso del residuo S1002, su sustitución por aminoácidos fosfomiméticos (S1002E, S1002D) provocó una clara disminución en el nivel basal de activación de Pmk1 (Figura 4.12, panel derecho). Estos resultados sugieren que mientras que la fosforilación *in vivo* de Pck2 en T842 no es necesaria para la regulación la actividad basal de la ruta de integridad celular, la posible fosforilación del motivo hidrofóbico en S1002 parece hacerlo de forma negativa.

Por último, la actividad basal de Pmk1 en la cepa portadora de una versión de Pck2 con una doble mutación en el bucle de activación y el motivo de giro (T842A T984A) fue menor que en la cepa control, muy similar a la de los mutantes que expresan versiones catalíticamente inactivas de Pck2 (mutantes K712W y K712E; Figura 4.12, panel izquierdo, calles 3 y 4), y algo superior a la exhibida por el mutante nulo *pck2Δ*. Este resultado sugiere que la fosforilación conjunta del bucle de activación y del motivo de giro es fundamental para la actividad catalítica de Pck2.

4.12 Efecto de la fosforilación de Pck2 sobre la actividad basal de Pmk1 y la viabilidad celular en respuesta al daño en pared celular

Con el fin de caracterizar con mayor profundidad el comportamiento de los distintos alelos mutantes de Pck2 descritos en el apartado anterior, estudiamos la viabilidad celular en situaciones que dependen de la actividad basal de Pmk1. En primer lugar analizamos el fenotipo VIC ("viable en presencia del inmunosupresor FK506 e iones cloruro") (ver Apartado 1.6.4.4.3 de Introducción) de los distintos mutantes, y lo comparamos con el de una cepa control y el mutante nulo *pck2Δ*. Para ello las cepas se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial temprana, se realizaron diluciones seriadas, y se inocularon en placas con medio YES suplementado con FK506 y distintas concentraciones de $MgCl_2$. El fenotipo VIC permite determinar de forma muy sensible la actividad de basal de Pmk1 *in vivo* (Ma *et al*., 2006; Sanchez-Mir *et al*., 2014b), de modo que disminuciones de los niveles de Pmk1 activo se traducen en un fenotipo VIC más agresivo.

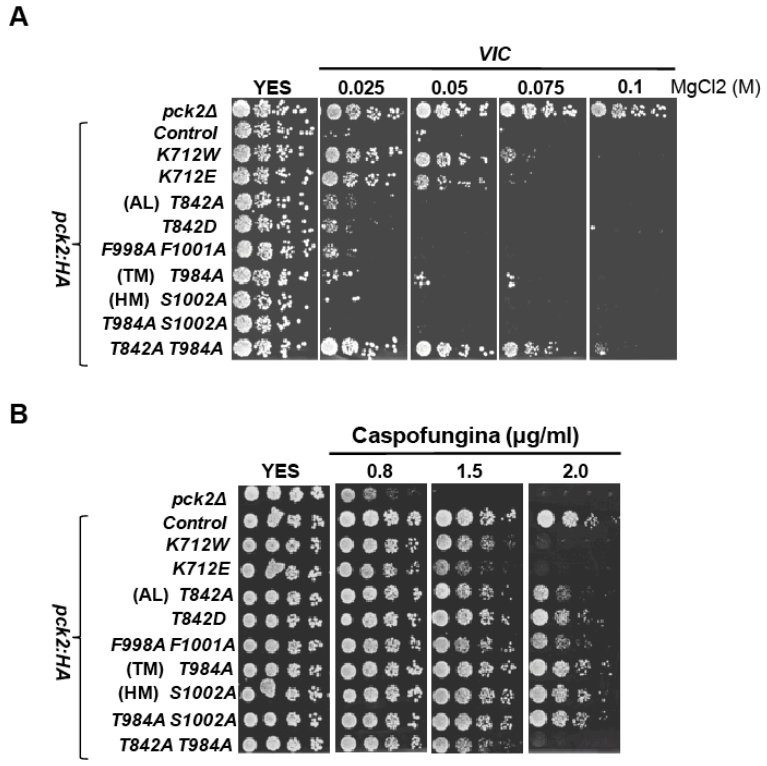


Figura 4.13 Papel del dominio de activación de Pck2 sobre la actividad basal de Pmk1 y la viabilidad celular en respuesta al daño en pared celular. Las cepas GB3 (*pck2Δ*), MM913 (Pck2-HA; control), MM1022 (Pck2.K712W-HA), MM982 (Pck2.K712E-HA), MM918 (Pck2.T842A-HA), MM929 (Pck2.T842D-HA), MM998 (Pck2.F998A F1001A-HA), MM1009 (Pck2.T984A-HA), MM1011 (Pck2.S1002A-HA), MM1042 (Pck2.T984A S1002A-HA) y MM1123 (Pck2.T842A T984A-HA), que expresan una versión genómica de la proteína de fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES a 28ºC hasta mitad de fase exponencial. Diluciones seriadas decimales de los distintos cultivos se inocularon en placas con medio YES suplementadas con 0,025-0,1M $MgCl_2$ junto a 1µg/ml de FK506 **(A),** o 0,8-2,0 µg/ml de caspofungina **(B)**, y se incubaron durante 3 días a 28ºC. AL, bucle de activación; TM, motivo de giro; HM, motivo hidrofóbico.

Tal como se observa en la Figura 4.13A, las cepas que expresan tanto las versiones catalíticamente inactivas de Pck2 como la doble mutación T842A T984A manifestaron fenotipo VIC, aunque este fue claramente menor que el del mutante nulo *pck2Δ*. Por el contrario, el resto de mutantes analizados presentaron un fenotipo VIC negativo similar al de la cepa control (Figura 4.13A). Las cepas T842D y S1002A, que mostraban un aumento en los niveles de fosforilación de Pmk1 algo superior al control (Figura 4.12), no manifestaron ningún cambio en el fenotipo VIC respecto a la cepa control. Estos resultados sugieren que las fosforilación *in vivo* de los residuos T842 y T984 de Pck2 es importante para mantener la actividad basal de la ruta de integridad celular en *S. pombe.*

Estudios previos habían demostrado que el mutante *pck2Δ* es muy sensible al crecimiento en presencia de caspofungina (>0,8 µg/ml) (Sanchez-Mir *et al*., 2014b). Por tanto, decidimos realizar un análisis comparativo de la sensibilidad frente a este compuesto de los distintos mutantes de Pck2 descritos anteriormente. Como se observa en la Figura 4.13B, el fenotipo sensible frente a caspofungina del mutante *pck2Δ* fue suprimido en presencia de una versión silvestre de Pck2 (cepa control) o de los mutantes Pck2.T842A, T984A, S1002A y T984A S1002A. Por el contrario, tanto el doble mutante Pck2.T842A T984A o las versiones catalíticamente inactivas de Pck2 (K712W; K712E) suprimieron de una manera mucho menos efectiva la sensibilidad a caspofungina del mutante *pck2Δ* (Figura 4.13B). Estos resultados apoyan que la idea de que la fosforilación *in vivo* de Pck2 en el bucle de activación y en el motivo de giro son importantes para una correcta regulación de la homeostasis de la pared celular. Sin embargo, el hecho de que el fenotipo de sensibilidad frente a caspofungina del mutante *pck2Δ* sea más agresivo que el de los mutantes catalíticamente inactivos y el mutante doble T984A S1002A, también sugiere que Pck2 podría regular en parte la organización de la pared celular mediante mecanismos independientes a su actividad catalítica.

4.13 La fosforilación de Pck2 en el residuo T842 del bucle de activación no es necesaria para la activación de Pmk1 en respuesta a estrés

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indicaban que la actividad basal de Pck2, medida en cuanto a su capacidad de mantener un nivel basal de actividad de Pmk1, no se vio afectada por la falta de fosforilación en el bucle de activación en T842. Por ello nos interesó averiguar si dicho residuo era también prescindible para la activación de la ruta de integridad celular en respuesta a aquellos estímulos que activan la ruta mediante mecanismos dependientes de Pck2, como son los estreses hiper- e hipotónico y el daño en pared celular (Barba *et al*., 2008). Decidimos, por tanto, realizar un estudio comparativo utilizando la fosforilación de Pmk1 como "chivato biológico" para medir la actividad de Pck2 en las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM918 (Pck2.T842A-HA), MM1022 (Pck2.K712W-HA) y GB3 (*pck2Δ*), tras someterlas a un estrés hipertónico salino (KCl), no salino (sorbitol), hipotónico, y de daño en pared (caspofungina). Para ello se cultivaron las cepas a 28ºC en medio YES hasta mitad de fase exponencial, y se trataron con los distintos agentes

estresantes. En el caso del estrés hipotónico, las cepas se cultivaron en medio YES a 28ºC suplementado con 0,8M sorbitol, se filtraron y se transfirieron a medio YES sin sorbitol.

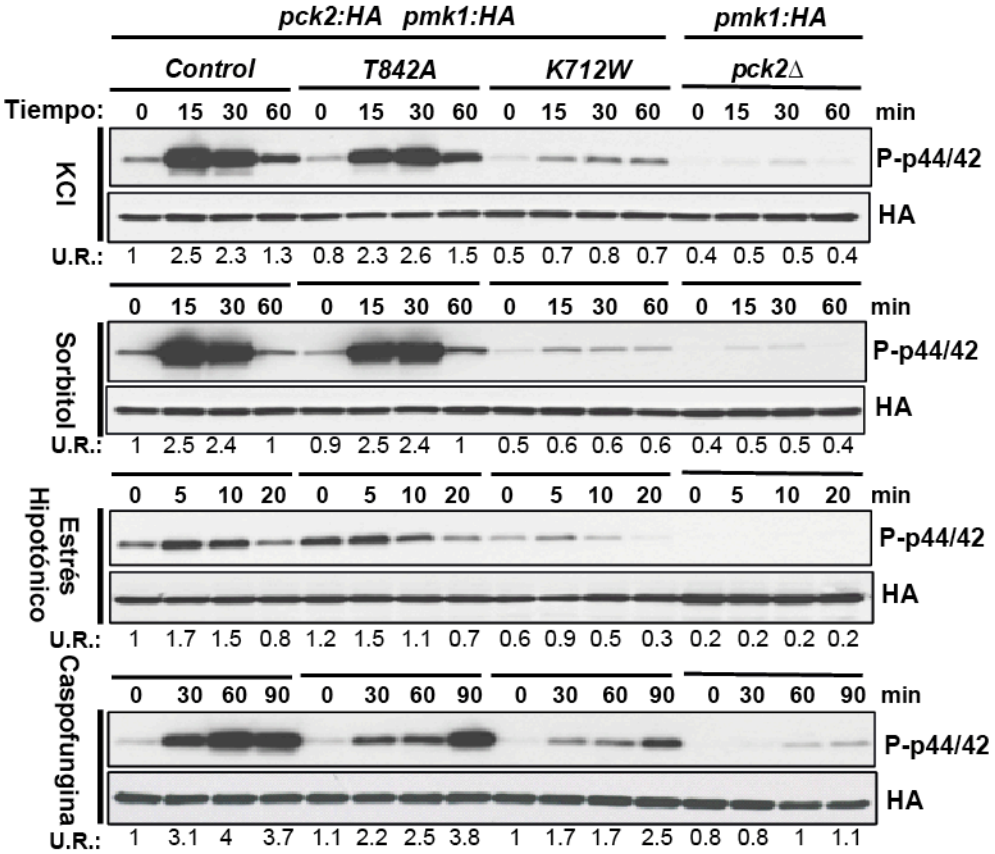


Figura 4.14 La fosforilación de Pck2 en T842 no es necesaria para la activación de la ruta de integridad en respuesta a estrés. Las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM918 (Pck2.T842A-HA), MM1022 (Pck2.K712W-HA) y GB3 (*pck2Δ*), que expresan una versión genómica de la proteína de fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES hasta mitad de fase exponencial, y se trataron con 0,6M KCl, 1M sorbitol o 1µg/ml caspofungina. Para someterlas a estrés hipotónico, las cepas se cultivaron en medio YES suplementado con 0,8M sorbitol a 28ºC hasta mitad de fase exponencial, y a continuación se transfirieron a medio YES sin sorbitol. En todos los casos se recogieron alícuotas a los tiempos indicados, y los niveles total y activo de Pmk1 se detectaron tras la incubación con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-p44/42, respectivamente. U.R., unidades relativas.

Como se puede observar en la Figura 4.14, la cinética y grado de fosforilación de Pmk1 fueron muy similares en la cepa control y en el mutante Pck2.T842A tras someterlos a estrés hipertónico (salino o no salino) e hipotónico. La activación de la MAPK fue, sin embargo, menor en el mutante Pck2.T842A tras el tratamiento con caspofungina (Figura 4.14). Por otro lado, la cepa portadora del alelo catalíticamente inactivo de Pck2 (K712W) mostró unos niveles muy bajos de fosforilación de Pmk1 respecto a la cepa control en todas las condiciones analizadas (Figura 4.14). Cabe destacar que el defecto de activación de Pmk1 es aún más notable en el mutante *pck2Δ* (Figura 4.14), lo que podría

indicar que la regulación que ejerce Pck2 sobre la ruta de integridad celular es ejercida en parte de forma independiente a su actividad catalítica.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que en *S. pombe* la fosforilación en el bucle de activación en el residuo conservado T842 de Pck2 es prescindible para la transmisión de la señal hacia la ruta de integridad celular, y que además Pck2 podría regular la activación de Pmk1 independientemente de su actividad catalítica.

4.14 La fosforilación simultánea de T842 y T984 en el dominio de activación de Pck2 es necesaria para la correcta activación de la ruta de integridad celular en respuesta a estrés

A continuación nos planteamos estudiar el posible papel de la fosforilación de los motivos de giro (T984) e hidrofóbico (S1002) de Pck2 durante la transmisión de la señal de activación hacia Pmk1 en respuesta a estrés. Siguiendo la misma metodología descrita en el epígrafe anterior, realizamos un estudio comparativo de la activación de Pmk1 en respuesta a estrés hipertónico, hipotónico, y por daño en pared celular en la cepa MM913 (Pck2-HA; control), y en los mutantes MM1009 (Pck2.T984A-HA), MM1011 (Pck2.S1002A-HA), MM998 (Pck2.F998A F1001A), MM918 (Pck2.T842A-HA), MM1042 (Pck2. T984A S1002A-HA), y MM1123 (Pck2.T842A T984A-HA).

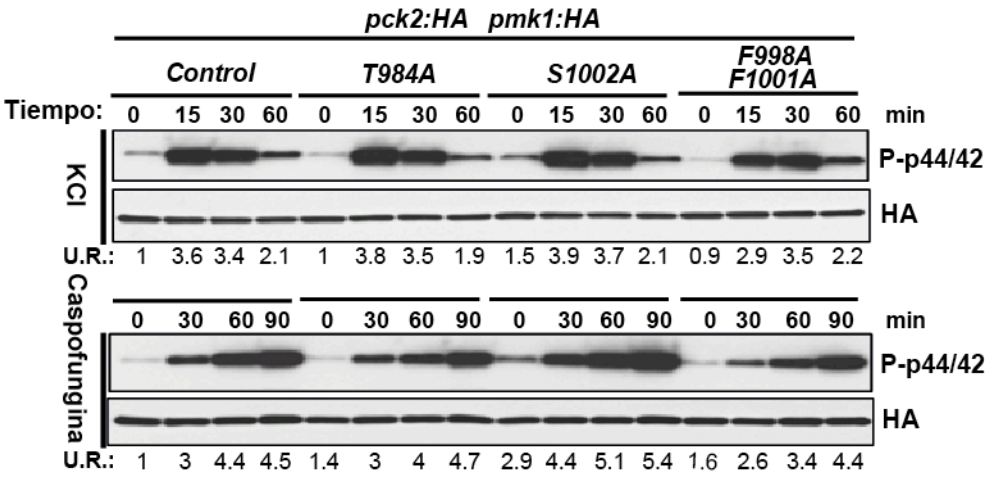


Figura 4.15 Papel de la fosforilación de Pck2 en T984 y S1002 sobre la activación de la ruta de integridad en respuesta a estrés. Las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM1009 (Pck2.T984A-HA), MM1011 (Pck2.S1002A-HA), MM998 (Pck2.F998A F1001A-HA), que expresan una versión genómica de la proteína de fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES hasta mitad de fase exponencial, y se trataron con 0,6M KCl, o 1µg/ml caspofungina. En ambos casos se recogieron alícuotas a los tiempos indicados, y los niveles total y activo de Pmk1 se detectaron tras la incubación con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-p44/42, respectivamente. U.R., unidades relativas.

De manera similar a lo que ocurría en el mutante T842A (Figura 4.14), la mutación en el residuo conservado del motivo de giro (Pck2.T984A) no afectó a la activación de Pmk1 en respuesta a estrés salino, aunque provocó una ligera disminución en la activación en presencia de caspofungina (Figura 4.15). Sin embargo, la mutación de Pck2 en el motivo hidrofóbico (S1002A) provocó un incremento general en el nivel basal de actividad de Pmk1 y de activación en respuesta a ambos estreses (Figura 4.15), lo que sugiere que la fosforilación en este residuo podría regular negativamente la actividad de Pck2 en estas condiciones. Por último, la mutación en los residuos conservados del sitio hipotético de anclaje para Ksg1 (mutante Pck2.F998A F1001A) causó una ligera disminución de la activación por estrés de Pmk1, que se observó de forma más acusada durante el daño a la pared celular (Figura 4.15).

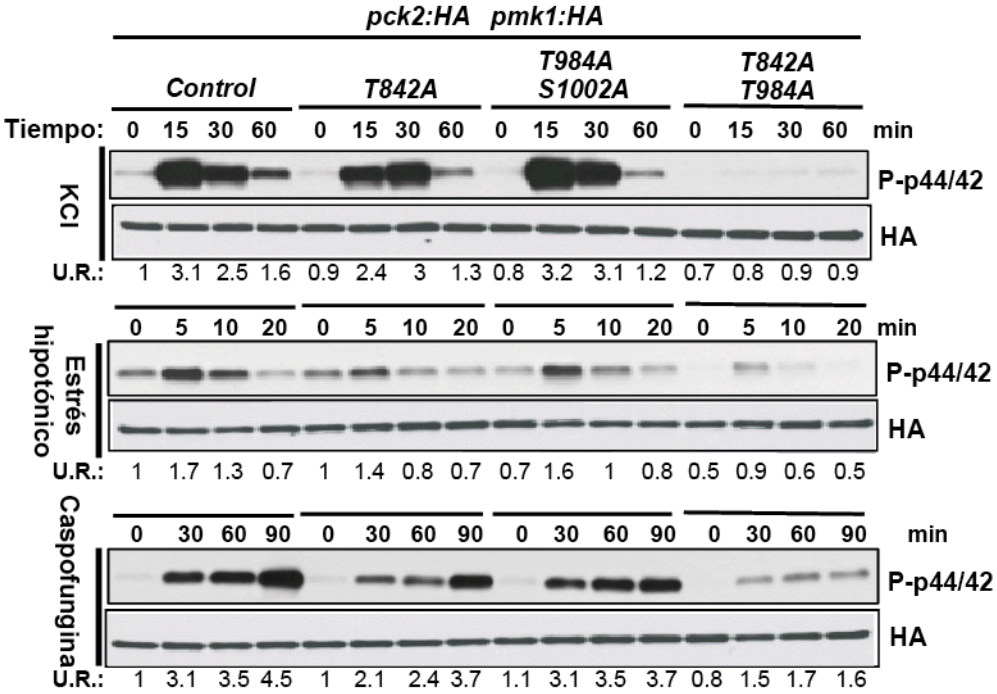


Figura 4.16 La fosforilación simultánea de T842 y T984 dentro del dominio de activación de Pck2 es necesaria para la activación de Pmk1 en respuesta a estrés. Las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM918 (Pck2.T842A-HA), MM1042 (Pck2.T984A S1002A-HA) y MM1123 (Pck2.T842A T984A-HA), que expresan una versión genómica de la proteína de fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES hasta mitad de fase exponencial, y se trataron con 0,6M KCl, 1M sorbitol o 1µg/ml caspofungina. Para someterlas a estrés hipotónico, las cepas se cultivaron en medio YES suplementado con 0,8M sorbitol a 28ºC hasta mitad de fase exponencial, y a continuación se transfirieron a medio YES sin sorbitol. En todos los casos se recogieron alícuotas a los tiempos indicados, y los niveles total y activo de Pmk1 se detectaron tras la incubación con anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-p44/42, respectivamente. U.R., unidades relativas.

Dado que el mutante doble en el bucle de activación y en motivo de giro (Pck2.T842A T984A) mostraba un fenotipo VIC parcial y cierta sensibilidad frente a la caspofungina en comparación con la cepa control, nos planteamos la posibilidad de que fuese defectivo en la transmisión de la señal de activación hacia Pmk1 en respuesta a estrés. En efecto, en comparación con la cepa control y los mutantes Pck2.T842A y Pck2.T984A S1002A, el mutante Pck2.T842A T984A presentó una drástica reducción en la fosforilación de Pmk1 en todas las condiciones de estrés analizadas (Figura 4.16). Dicha reducción fue muy similar a la observada en cultivos que expresaban versiones catalíticamente inactivas de Pck2 (K712E; K712W), o en el triple mutante T842A T984A S1002A (datos no mostrados). Estas observaciones confirman que tanto el residuo T842 del bucle de activación como el residuo T984 del motivo de giro son fundamentales para regular la actividad de Pck2, y la consecuente señalización hacia la ruta de integridad celular durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés.

4.15 Los residuos T842 y T846 del bucle de activación de Pck2 son necesarios para su correcta activación y señalización hacia la ruta de integridad celular

Previamente hemos mostrado que Ksg1 fosforila *in vivo* a Pck2 en el residuo T842, y que la activación por estrés de Pmk1 es muy limitada cuando la actividad de Ksg1 se encuentra comprometida (alelo *ksg1-208*) (Apartado 4.1 de Resultados). Sin embargo, los resultados descritos en la Figura 4.14 mostraban que la fosforilación de Pck2 en T842 es prescindible durante la activación de la ruta de integridad celular. Una posible explicación para esta aparente discrepancia sería la existencia de un sitio alternativo a T842 en el bucle de activación que también se fosforila *in vivo* y contribuye a la activación catalítica de Pck2 y su papel señalizador hacia la ruta de integridad celular.

Mediante el estudio detallado en diversas bases de datos que incluyen estudios masivos del fosfoproteoma (Uniprot, PhosphoSitePlus), hemos encontrado un residuo conservado de treonina situado en posición +4 en relación a la treonina canónica del bucle de activación, y que se encontraría fosforilada *in vivo* en distintas isoformas de PKC humanas (Oppermann *et al*., 2009; Phanstiel *et al*., 2011; Wissing *et al*., 2007). El residuo equivalente conservado en Pck2 corresponde a una treonina en posición 846 (Figura 4.7A).

Con el fin de averiguar si el residuo T846 es importante para mantener la correcta conformación del bucle de activación y estudiar su significación funcional, construimos el mutante MM916 (Pck2.T846A-HA), donde el posible sitio de fosforilación en la posición 846 ha sido sustituido por alanina. Las cepas MM913 (control) y MM916 se cultivaron en medio YES hasta fase exponencial temprana y se transfirieron a 36ºC. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se determinó la cantidad total de Pck2 y el nivel de fosforilación en T842 tal como se ha descrito previamente.

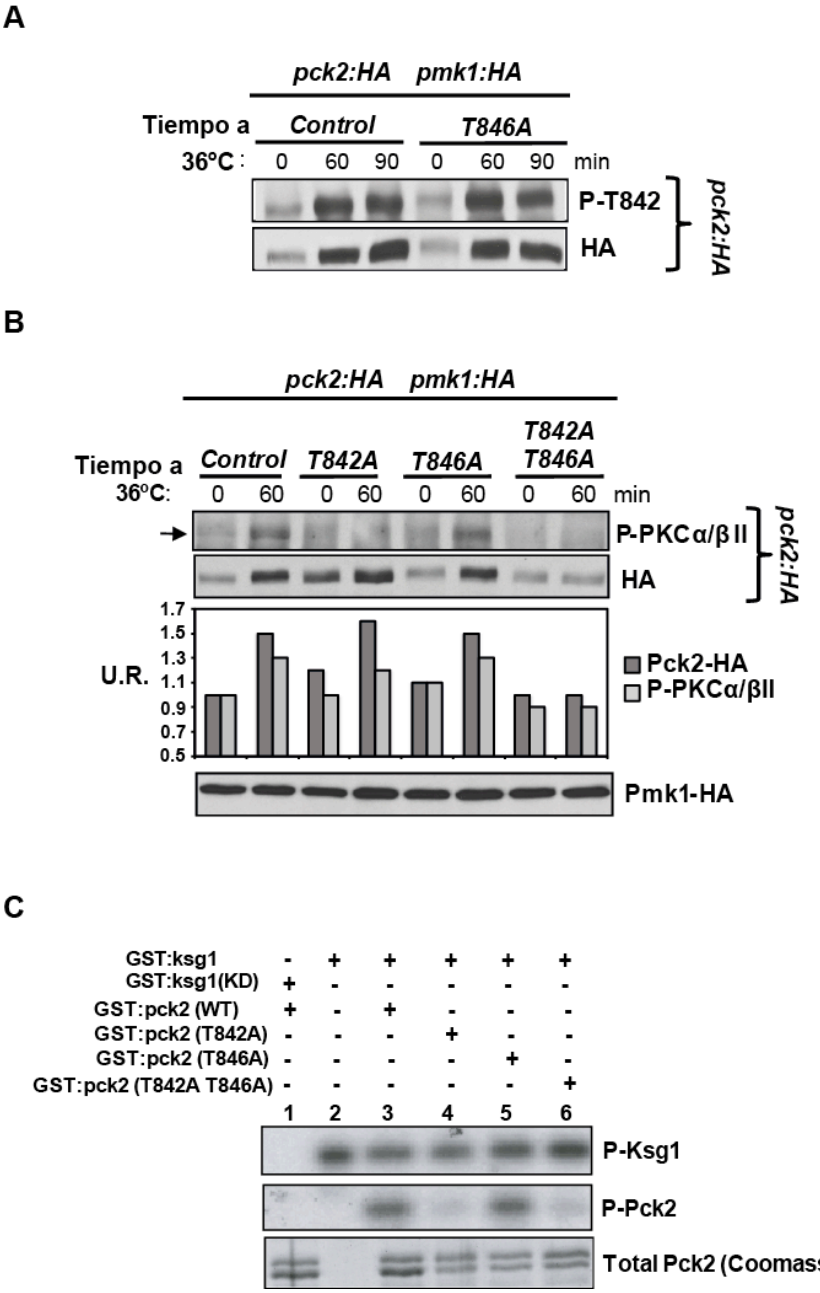


Figura 4.17 Papel de T846 en la activación catalítica de Pck2. (A) Las cepas MM913 (Pck2-HA; control) y MM916 (Pck2.T846A-HA) que expresan una versión genómica de la proteína de fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES a 28ºC (tiempo 0) hasta fase exponencial temprana, y se incubaron posteriormente a 36ºC, tomando alícuotas a los tiempos indicados. Los extractos celulares correspondientes se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con anticuerpos anti-fosfo-T842 (fosforilación de Pck2 en T842) y anti-HA (Pck2 total). **(B)** Las cepas MM913 (Pck2-HA; control) MM918 (Pck2.T842A-HA), MM916 (Pck2.T846A-HA) y MM921 (Pck2.T842A T846A-HA), que expresan una versión genómica de Pmk1-HA6H, se procesaron tal como se describe en (A). Los extractos celulares correspondientes se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con anticuerpos anti-fosfo-PKCα/βII (fosforilacion de Pck2 en T984) y anti HA (Pck2 total). Como control de carga, se detectó Pmk1-HA6H utilizando un anticuerpo anti-HA. U.R., unidades relativas. **(C)** Las proteínas de fusión GST:Pck2 (silvestre; WT), GST:Pck2-T842A, GST:Pck2-T846A y GST:Pck2 T842A T846A se incubaron a 30ºC durante 1h con las proteínas de fusión GST:Ksg1 (catalíticamente inactiva; KD) o GST:Ksg1 en presencia de γ^{32}P-ATP.

Los resultados de la Figura 4.17A muestran que los niveles de Pck2 y la fosforilación en T842 incrementaron de manera similar en la cepa control y en el mutante que expresa la versión Pck2.T846A. Ello sugiere que la mutación en dicho residuo no altera la conformación del bucle de activación, lo que permite que la fosforilación en T842 tenga lugar de manera adecuada.

Como la ausencia de fosforilación de Pck2 en T842 no compromete la fosforilación *in vivo* del motivo de giro (T984) (Figura 4.10B), nos pareció interesante estudiar si sucedía lo mismo con el mutante T846A. Para ello realizamos un ensayo similar al anterior que incluye los mutantes MM918 (Pck2.T842A-HA) y MM921 (Pck2.T842A T846A-HA), y empleando el anticuerpo específico del motivo de giro anti-fosfo-PKCα/βII (P- PKCα/βII). Como muestra la Figura 4.17B, las mutaciones por separado en los residuos T842 y T846 del bucle de activación de Pck2 no provocaron cambios significativos en la fosforilación del motivo de giro respecto a la cepa control. Sin embargo, la mutación simultánea de ambos residuos bloqueó el incremento en los niveles de Pck2 y la fosforilación en T984 durante el estrés térmico. Este resultado sugiere que la fosforilación de T842 y T846 del bucle de activación es necesaria para la posterior fosforilación de Pck2 en el motivo de giro, y que la fosforilación en T846 juega un papel aditivo o sustitutivo a la fosforilación en T842.

Los ensayos realizados hasta el momento apoyaban la idea de que el residuo T846 de Pck2 se encuentra fosforilado *in vivo*. Por ello nos preguntamos si dicha fosforilación era llevada a cabo por Ksg1, tal como ocurre en el residuo T842. Para confirmar esta posibilidad realizamos un ensayo quinasa *in vitro* en presencia de γ^{32}P-ATP (ver Apartado 3.8.5 de Materiales y Métodos). Utilizamos las proteínas de fusión GST:Ksg1 o GST:Ksg1KD (catalíticamente inactiva) como quinasas, y se incubaron durante 1h a 30ºC en presencia de ATP marcado en presencia de las siguientes versiones de Pck2 fusionadas a GST: GST:Pck2 (silvestre; WT), GST:Pck2-T842A, GST:Pck2-T846A y GST:Pck2 T842A T846A. Mientras que la presencia de la mutación T842A redujo significativamente la fosforilación de Pck2 dependiente de Ksg1 en comparación con el control, dicha fosforilación no se vio afectada significativamente en el mutante T846A o en el doble mutante T842A T846A con respecto a la versión control y el mutante T842A, respectivamente (Figura 4.17C). Esto resultados apuntan a que la fosforilación de Pck2 en T846 por parte de Ksg1 podría tener lugar únicamente en condiciones fisiológicas, o bien que otra quinasa distinta de Ksg1 es responsable de dicho proceso. En conjunto, estos resultados sugieren que, además del residuo T842, la fosforilación *in vivo* de T846 dentro del bucle de activación de Pck2 podría jugar un papel relevante en la activación catalítica de Pck2.

4.16 Significación biológica de la fosforilación *in vivo* de Pck2 en T846

A fin de determinar si la posible fosforilación del bucle de activación de Pck2 en el residuo T846 afectaba en la señalización hacia la ruta de integridad celular, llevamos a cabo el análisis del

fenotipo VIC de las cepas descritas en el apartado anterior e incluyendo además los mutantes GB3 (*pck2Δ*), MM1123 (Pck2.T842A T984A-HA), y MM931 (Pck2.T842A T846A T984A-HA).

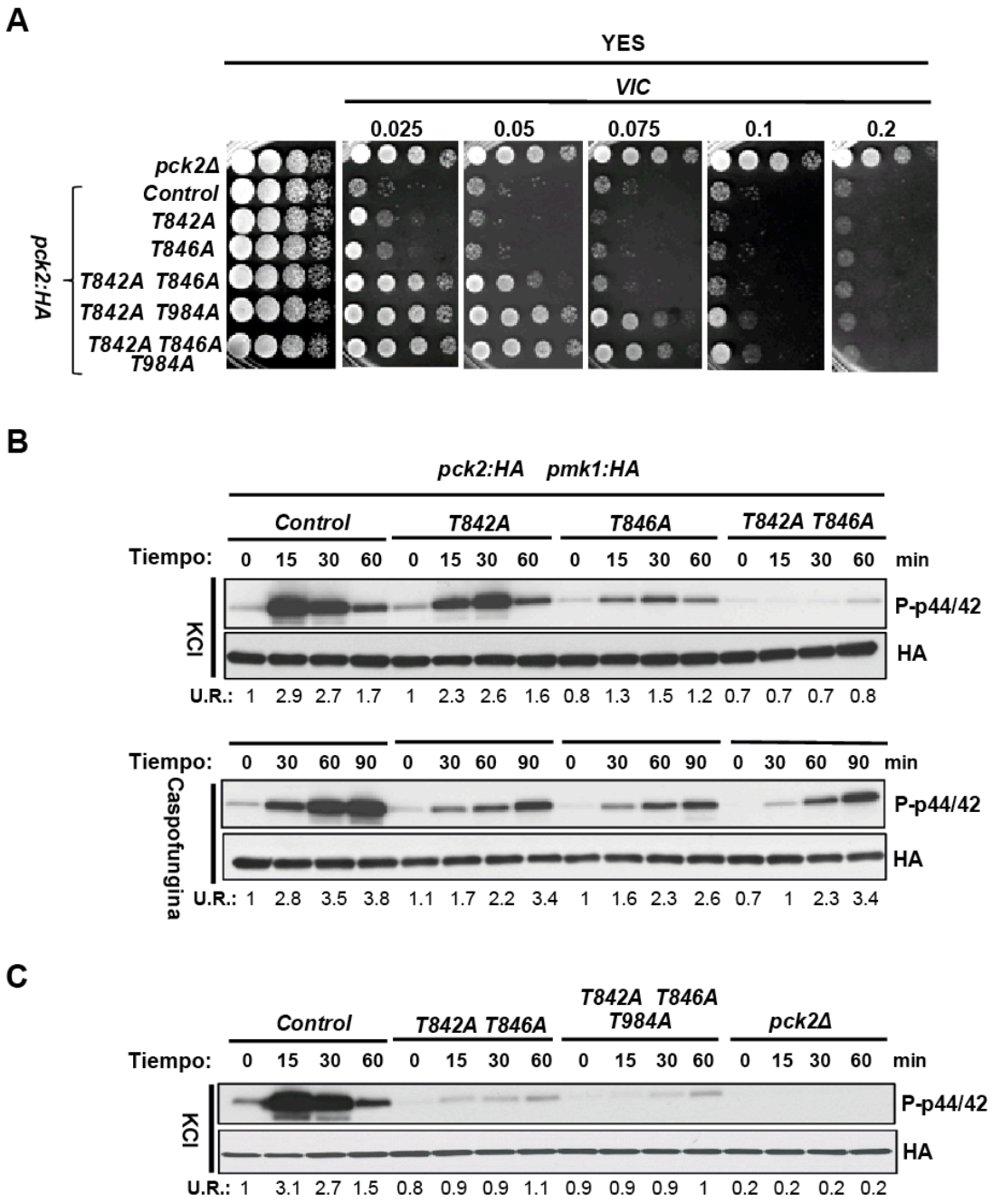


Figura 4.18 Significación biológica de la fosforilación de Pck2 en T846. (A) Las cepas MM913 (Pck2-HA; control) MM918 (Pck2.T842A-HA), MM916 (Pck2.T846A-HA), MM921 (Pck2.T842A T846A-HA), MM1123 (Pck2.T842A T984A-HA), MM931 (Pck2.T842A T846A T984A-HA) y GB3 (pck2Δ) se cultivaron en medio YES a 28ºC hasta mitad de fase exponencial. Diluciones seriadas de cada una de las cepas se inocularon en placas con medio YES suplementadas con 0,025-0,2M de $MgCl_2$ junto con 1µg/ml de FK506. **(B, C)** Cultivos de las cepas descritas en (A) se trataron con 0,6 KCl o 1µg/ml de caspofungina. La proteína de fusión Pmk1-HA6H se purificó mediante cromatografía de afinidad, y los niveles totales y de activación de la quinasa se detectaron mediante inmunodetección con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-P44/42, respectivamente. U.R., unidades relativas.

Como se puede observar en la Figura 4.18A, el mutante doble en el bucle de activación (Pck2.T842A T846A) presentó un fenotipo VIC moderado en comparación con la cepa control y los mutantes simples T842A o T846A. Sin embargo, dicho fenotipo fue menos agresivo que el mostrado por los mutantes afectados conjuntamente en el bucle de activación y en el motivo de giro (Pck2.T842A T984A y Pck2.T842A T846A T984A), y todavía menor que el del mutante *pck2Δ* (Figura 4.18A).

Para profundizar más en la significación biológica del residuo T846 para la actividad de Pck2, estudiamos la dinámica y el nivel de fosforilación de Pmk1 en cultivos de las cepas anteriores tras someterlos a estrés salino y un tratamiento con caspofungina. Sorprendentemente, la activación de Pmk1 disminuyó considerablemente en el mutante T846A respecto a la cepa control y el mutante T842A en ambas condiciones (Figura 4.18B). Además, la doble mutación en los dos residuos fosforilables del bucle de activación (T842A T846A) anuló casi por completo la activación de Pmk1 inducida por estrés osmótico (Figura 4.18B). Dicho bloqueo fue de una magnitud similar al que provoca el triple mutante T842A T846A T984, y ligeramente superior al del mutante nulo *pck2Δ* (Figura 4.18C). En conjunto, todos estos resultados sugieren que la fosforilación del bucle de activación de Pck2 en T846 podría estar desempeñando un papel importante en la transmisión de la señal hacia la ruta de integridad celular.

4.17 Los residuos fosforilables conservados del dominio de activación de Pck2 son esenciales para el mantenimiento de los niveles de proteína durante la respuesta a estrés

Los resultados obtenidos previamente (Figuras 4.9A y B) sugerían que los niveles totales y de fosforilación de Pck2 en T842 se incrementan progresivamente en condiciones de estrés térmico. Nos preguntamos entonces si dicho incremento era específico del estrés térmico o se producía en otras condiciones de estrés, y cuál era el papel de los distintos residuos fosforilables del dominio de activación de Pck2 en este proceso.

Cultivamos en medio YES a 28ºC cepas que expresan en un fondo genético Pmk1-HA6H mutantes de Pck2 en los residuos canónicos de fosforilación del dominio de activación, así como en el sitio de anclaje de Ksg1 (Pck2.F998A F1001A), y en el dominio catalítico (Pck2. K712W). Posteriormente los cultivos se sometieron a un estrés osmótico (KCl) o de daño en la pared celular (caspofungina), y se recogieron muestras a distintos tiempos. Los niveles total y fosforilado de Pck2 en T842 se determinaron tras la incubación con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo-T842 (P-T842), respectivamente. Los resultados de la Figura 4.19A muestran que los niveles de Pck2 total y fosforilado incrementaron significativamente en la cepa control en respuesta al estrés salino o al daño en la pared celular. Sin embargo, se redujeron fuertemente en el mutante que expresa una versión catalíticamente inactiva de Pck2 (K712W).

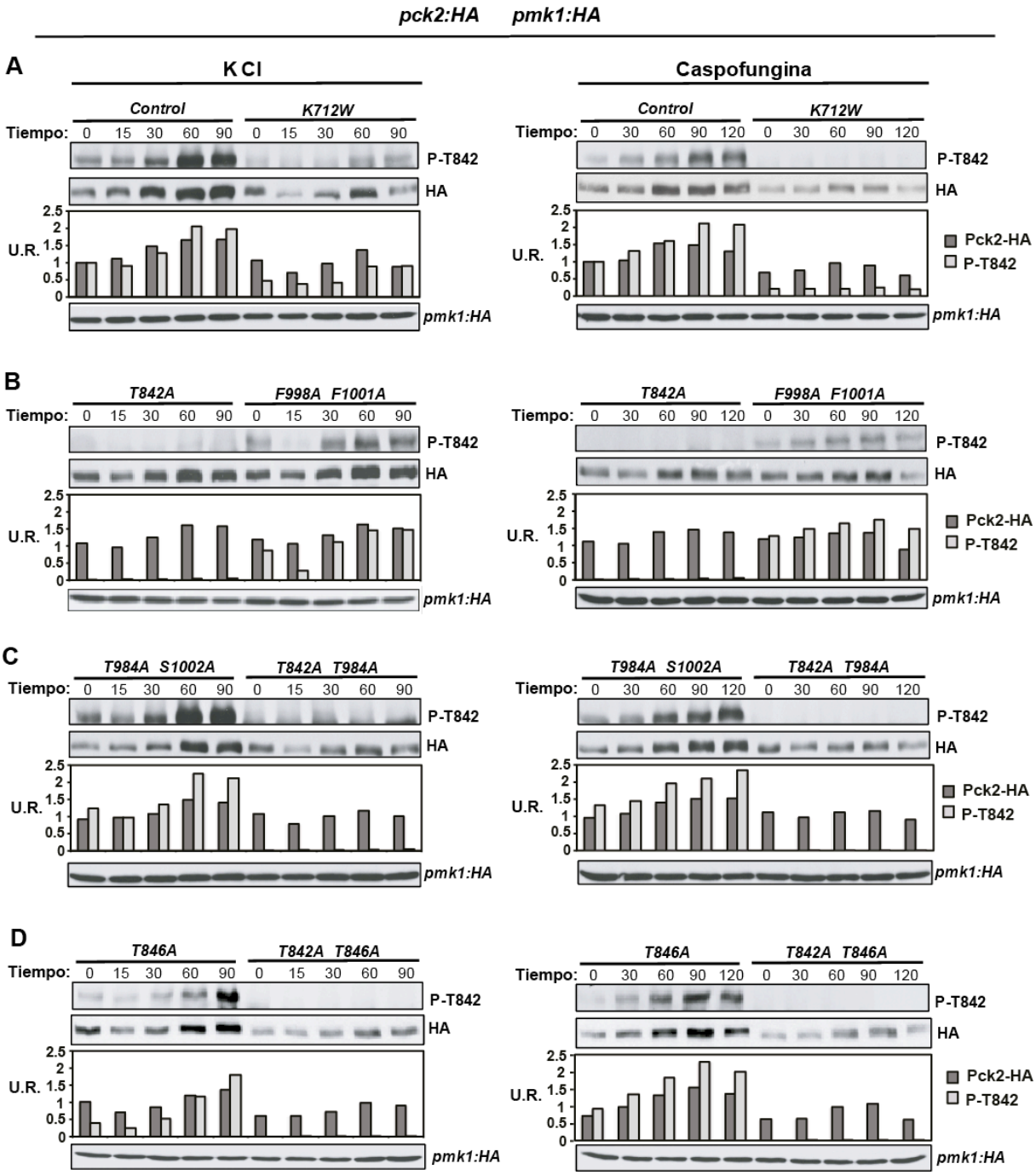


Figura 4.19 Los residuos fosforilables conservados del bucle de activación y del motivo de giro son necesarios para el incremento de los niveles de Pck2 en respuesta a estrés. Las cepas **(A)** MM913 (Pck2-HA; control) y MM1022 (Pck2.K712W-HA), **(B)** MM918 (Pck2.*T842A*-HA) y MM998 (Pck2.F998A F1001A-HA), **(C)** MM1042 (Pck2.T984A S1002A-HA) y MM1123 (Pck2.T842A T984A-HA), y **(D)** MM916 (Pck2.T846A-HA) y MM921 (Pck2.T842A T846A-HA), que expresan una versión genómica de la proteína de fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron medio YES a 28ºC hasta mitad de fase exponencial, y se trataron con 0,6M KCl o 1µg/ml de caspofungina. Tras la recogida de las alícuotas a los tiempos indicados, los extractos celulares correspondientes se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con anticuerpos anti-fosfo-T842 (Pck2 fosforilado en T842) y anti-HA (Pck2 total). Como control de carga, se detectó Pmk1-HA6H utilizando un anticuerpo anti-HA. U.R., unidades relativas.

Esta observación confirma que la autofosforilación y/o cambios conformacionales inducidos por la unión a nucleótido juegan un papel importante en el control de los niveles totales y la fosforilación del bucle de activación de Pck2 en respuesta a estrés.

La mutación en el residuo T842 no alteró el incremento en los niveles de Pck2 en respuesta a estrés (Figura 4.19B). Sin embargo, la fosforilación en T842 en respuesta a estrés en el mutante que expresa la versión Pck2.F998A F1001A fue menor que en el control en ambas condiciones de estrés (Figura 4.19B). Dado que los residuos mutados comprometen probablemente la arquitectura del sitio de anclaje de Ksg1 sobre Pck2, este resultado confirma la relevancia de los residuos de fenilalanina 998 y 1001 del motivo hidrofóbico para la correcta fosforilación del residuo conservado del bucle de activación de Pck2 en condiciones de estrés.

Respecto a la cepa control, la mutación simultánea en los residuos fosforilables de los motivos de giro e hidrofóbico (T984A S1002A) no afectó a la fosforilación en T842 ni a los niveles totales de Pck2 durante el tratamiento con KCl o caspofungina (Figura 4.19C). No obstante, la cantidad de Pck2 sí se redujo en cultivos estresados del doble mutante en el residuo canónico del bucle de activación y el residuo fosforilable dentro del motivo de giro (Pck2.T842A T984A) (Figura 4.19C).

Finalmente, nos pareció interesante investigar el papel del residuo fosforilable T846 del bucle de activación en el control de los niveles de Pck2 durante la respuesta a estrés. Como se puede ver en la Figura 4.19D, y al igual que ocurrió en el mutante sencillo Pck2.T842A, el mutante simple T846A no experimentó variaciones significativas en la cantidad total de Pck2 y en la fosforilación en T842 respecto a la cepa control. Sin embargo, la doble mutación en el bucle de activación (mutante Pck2-T842A T846A) provocó una clara disminución en los niveles de Pck2 total en respuesta a estrés (Figura 4.19D). Todos estos resultados sugieren que en *S. pombe* la fosforilación simultánea de los residuos conservados del bucle de activación (T842 y T846), y el motivo de giro (T984), juega un papel importante en el incremento de los niveles de Pck2 en respuesta a condiciones ambientales desfavorables.

4.18 Las Rho GTPasas Rho1 y Rho2 junto con la fosforilación del bucle de activación de Pck2 son esenciales para el mantenimiento de los niveles de la quinasa en respuesta a estrés

Estudios previos habían demostrado que las formas activas de las GTPasas Rho1 y Rho2 interaccionan *in vivo* con Pck1 y Pck2 estabilizándolas e incrementando la fosforilación de Pck2 en T842 (Arellano *et al*., 1999; Sayer *et al*., 2000). Para profundizar en estas observaciones comparamos los niveles totales de Pck2, la fosforilación en T842, y la actividad de Pmk1 en respuesta a estrés en la cepa control MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA) y el doble mutante MM1162 (*rho2Δ rho1-596* Pck2-HA), que expresa el alelo hipomórfico *rho1-596*, ya que la deleción de Rho1 es letal en *S. pombe* (Viana *et al.*, 2013). Tras incubar ambas cepas hasta mitad de fase exponencial, los cultivos se trataron con KCl

y se recogieron muestras a distintos tiempos. La Figura 4.20 (paneles superiores) muestra que en respuesta a estrés salino el nivel total y fosforilado en T842 de Pck2 se redujo drásticamente en el mutante *rho2Δ rho1596* respecto a la cepa control. Además, este efecto vino acompañado por una ausencia de activación de Pmk1 (Figura 4.20, paneles inferiores).

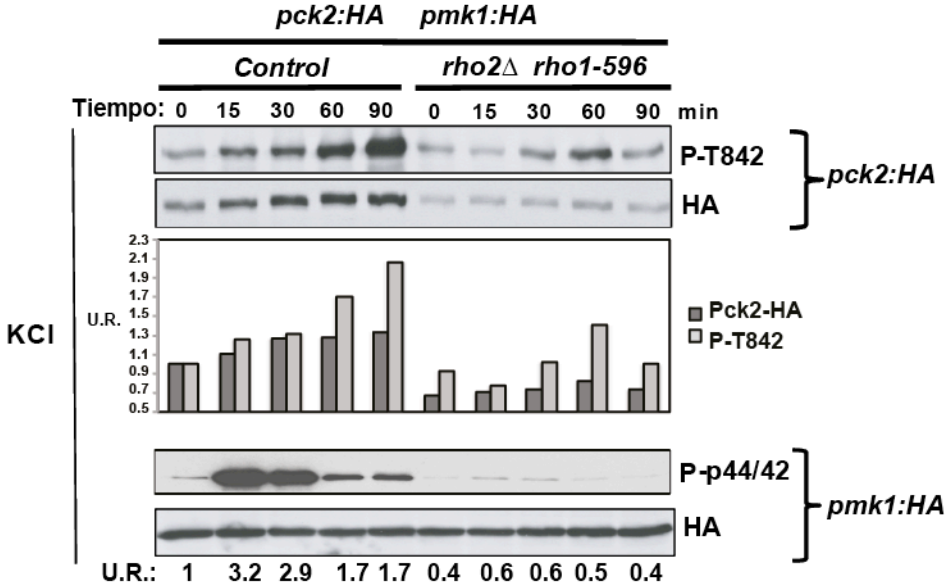


Figura 4.20 Las Rho GTPasas Rho1 y Rho2 son esenciales para el mantenimiento de los niveles de Pck2 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés. Las cepas MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA6H) y MM1162 (*rho2Δ rho1-596,* Pck2-HA), que expresan la fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron hasta fase exponencial temprana en medio YES a 28ºC y se trataron con 0,6M KCl. Los extractos obtenidos se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-fosfo-T842 y anti-HA. Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas.

En conjunto, estos resultados indican que en *S. pombe* la fosforilación de Pck2 en los residuos T842, T846, y T984 del dominio de activación, así como la estabilización mediada por Rho1 y Rho2 son esenciales para permitir el incremento de los niveles de Pck2 durante el crecimiento vegetativo y en condiciones de estrés.

4.19 La síntesis *de novo* de Pck2 es necesaria para la actividad basal de la ruta de integridad celular en *S. pombe*

A continuación llevamos a cabo una serie de experimentos encaminados a estudiar el papel de los niveles de Pck2 sobre la actividad basal de la ruta de integridad celular. Pare ello la cepa MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA; control) se cultivó hasta fase exponencial temprana y se incubó con o sin cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se determinaron los niveles total y fosforilado en T842 de Pck2, así como los niveles totales y de fosforilación de Pmk1, tal como se ha descrito previamente. A diferencia de los cultivos no tratados,

los niveles de Pck2 total y fosforilado en T842 descendieron rápidamente en los cultivos tratados con cicloheximida (Figura 4.21, panel superior), lo que apoya la hipótesis de que Pck2 es una proteína inestable con una vida media corta (Villar-Tajadura *et al*., 2008). De forma notable, la disminución en el contenido de Pck2 se vio acompañada por una reducción similar en los niveles de Pmk1 fosforilado, pero no de Pmk1 total (Figura 4.21, panel inferior). Este resultado sugiere la existencia de una fuerte correlación entre la síntesis *de novo* de Pck2 y la actividad basal de la ruta de integridad celular.

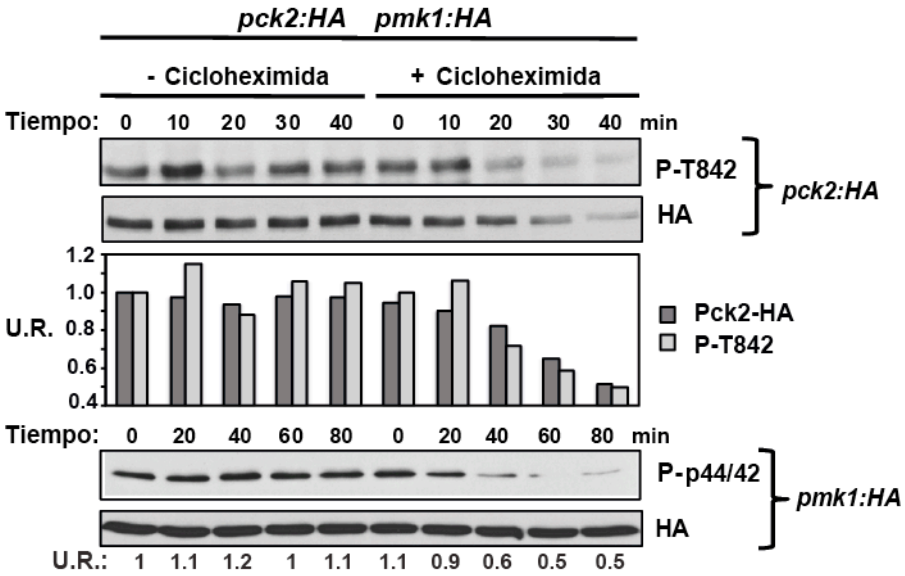


Figura 4.21 La síntesis *de novo* de Pck2 es necesaria para el mantenimiento de la actividad basal de la ruta de integridad celular. La cepa MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA6H) se cultivó hasta fase exponencial temprana en medio YES a 28ºC, y a continuación se incubó en presencia o ausencia de 100 µg/ml de cicloheximida durante los tiempos indicados. Los extractos obtenidos se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-fosfo-T842 y anti-HA. Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas. /42 y anti-HA, respectivamente.

4.20 El incremento en la síntesis *de novo* de Pck2 es necesario para la activación de la ruta de integridad celular en respuesta al daño en la pared celular

Los experimentos realizados en el apartado anterior pusieron de manifiesto una correlación entre la síntesis *de novo* de Pck2 y la actividad basal de Pmk1 en ausencia de estrés. Para estudiar la relevancia de dicha relación en condiciones de estrés, la cepa control MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA) se cultivó hasta fase exponencial temprana, se incubó con o sin cicloheximida durante 1 hora, y se sometió a un estrés por daño en la pared celular con Caspogungina (Figura 4.22A, paneles superiores), o a estrés osmótico con KCl (Figura 4.22B). Si el aumento en los niveles de Pck2 durante el estrés es esencial para la activación aguas abajo de la ruta de integridad celular, entonces el bloqueo de la síntesis de Pck2 provocaría una activación defectiva de Pmk1. Tal como se observa en la Figura

4.22A, el tratamiento con cicloheximida impidió la fosforilación de Pmk1 a tiempos cortos en respuesta al estrés por caspofungina, aunque su actividad se incrementó ligeramente a tiempos largos de incubación. Además, este aumento coincidió con un leve aumento en los niveles totales y fosforilados de Pck2 en T842 (Figura 4.22A).

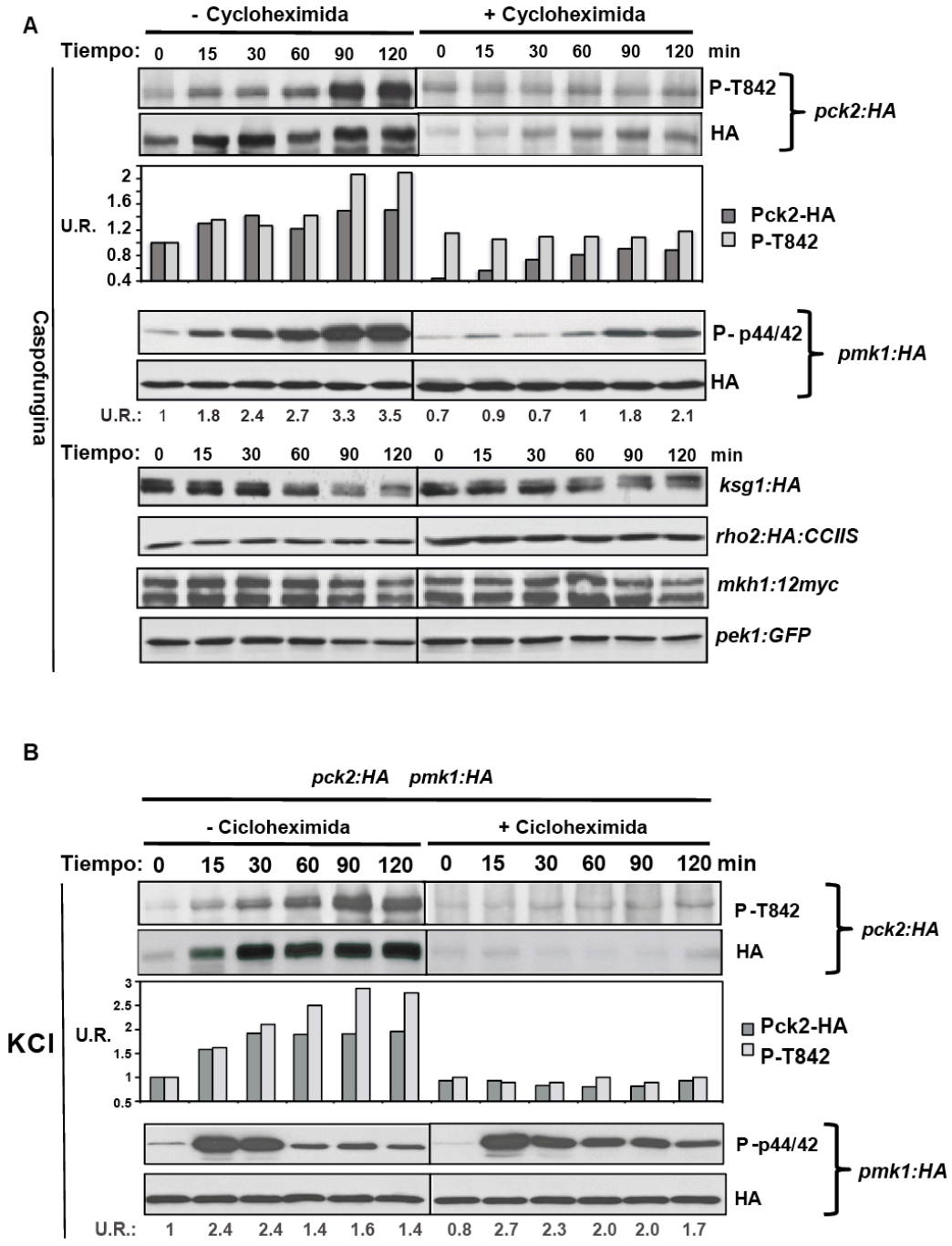


Figura 4.22 El incremento de la síntesis *de novo* de Pck2 es necesario para la activación de la ruta de integridad celular en respuesta al daño en la pared celular pero no durante el estrés salino. (A) Paneles superiores. La estirpe MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA6H) se cultivó hasta fase exponencial temprana en medio YES a 28ºC, se incubó en presencia o ausencia de 100 µg/ml de cicloheximida durante 1 hora, y finalmente se trató con 1 µg/ml de caspofungina, recogiéndose las correspondientes alícuotas a los tiempos indicados. Los extractos obtenidos se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con los anticuerpos anti-

fosfo T842 y anti-HA. Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas. **Paneles inferiores.** Las cepas MM1372 (Ksg1-HA), LSM400 (Rho2-HA-CCIIS), LS210 (Mkh1-12myc) y MI401 (Pek1-GFP), fueron tratadas como se describió anteriormente y las fusiones se detectaron tras la incubación con anticuerpos anti-HA, anti-myc, y anti-GFP, respectivamente. **(B)** La cepa MM913 se cultivó con o sin cicloheximida tal como se describe en (A), y a continuación se sometió a un estrés salino con 0,6M KCl. La detección de Pck2 y Pmk1 totales y fosforilados se realizó como se describe en (A).

Para descartar que el descenso de la activación de Pmk1 observada en estas condiciones era provocado por la disminución en la síntesis de otros elementos activadores de la ruta, llevamos a cabo la inmunodetección en las mismas condiciones de las proteínas Ksg1, Rho2, Mkh1 (MAPKKK) y Pek1 (MAPKK) a partir de cepas que expresan versiones genómicas fusionadas a distintos epitopos. Como se puede observar en los paneles inferiores de la Figura 4.22A, el pretratamiento con cicloheximida no alteró en ningún caso los niveles de estas proteínas en presencia de caspofungina.

Significativamente, aunque el tratamiento con cicloheximida también inhibió la síntesis de Pck2 y su fosforilación en T842 durante el estrés salino, la activación de Pmk1 no se vio afectada (Figura 4.22B)**.** Estos resultados apoyan la idea de que la síntesis *de novo* de Pck2 es necesaria para la activación de la ruta de integridad celular en ciertas condiciones de estrés (daño en la pared celular), pero no en otras (estrés salino).

4.21 El complejo TORC2 regula la síntesis *de novo* de Pck2 durante el crecimiento vegetativo.

En vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, nos preguntamos cuáles podrían ser los mecanismos responsables del incremento de la síntesis de Pck2 en condiciones de estrés. En *S. pombe* existen dos complejos TOR, denominados TORC2 y TORC1, cuyas quinasas activadoras son, respectivamente, Tor1 (no esencial) y Tor2 (esencial) (Alvarez y Moreno, 2006). Ambos complejos son cruciales para coordinar el crecimiento y tamaño celulares dentro de un contexto nutricional y ambiental (David y Petersen, 2012). Con objeto de estudiar si TORC1 estaba implicado en la regulación de la actividad de la ruta de Pmk1, las cepas control y MM1225, que expresa un alelo termosensible de Tor2 (*tor2-51*) (Álvarez y Moreno, 2006), se cultivaron en medio YES hasta mitad de fase exponencial y posteriormente se incubaron a 36ºC en presencia de 1µg/ml de caspofungina. Como se observa en la Figura 4.23A, la activación de Pmk1 en respuesta al daño en pared celular fue similar en ambas cepas, lo que sugiere que Tor2 no regula de forma significativa la actividad de la ruta de integridad celular. A continuación, decidimos investigar si el complejo TORC2 está implicado de alguna forma en la síntesis *de novo* de Pck2. Para ello, realizamos un experimento comparativo empleando las cepas MM913 (Pck2-HA; control), MM1100 (Pck2-HA; *ksg1-208*), y MM1257 (Pck2-

HA, *Ksg1-208 tor1Δ*). Una vez crecidos hasta fase exponencial temprana los cultivos se incubaron a 36ºC (temperatura restrictiva para el alelo *ksg1-208*), recogiendo alícuotas a los tiempos indicados.

Como indica la Figura 4.23B, los niveles total y fosforilado en T842 de Pck2 fueron prácticamente indetectables en el doble mutante *ksg1-208 tor1Δ* incubado a temperatura restrictiva, en comparación con el mutante *ksg1-208*. Como cabía esperar, dicho defecto vino acompañado de una drástica reducción en los niveles de activación de Pmk1 en las mismas condiciones. Por tanto, Tor1 (TORC2) participa en la regulación de la síntesis *de novo* de Pck2.

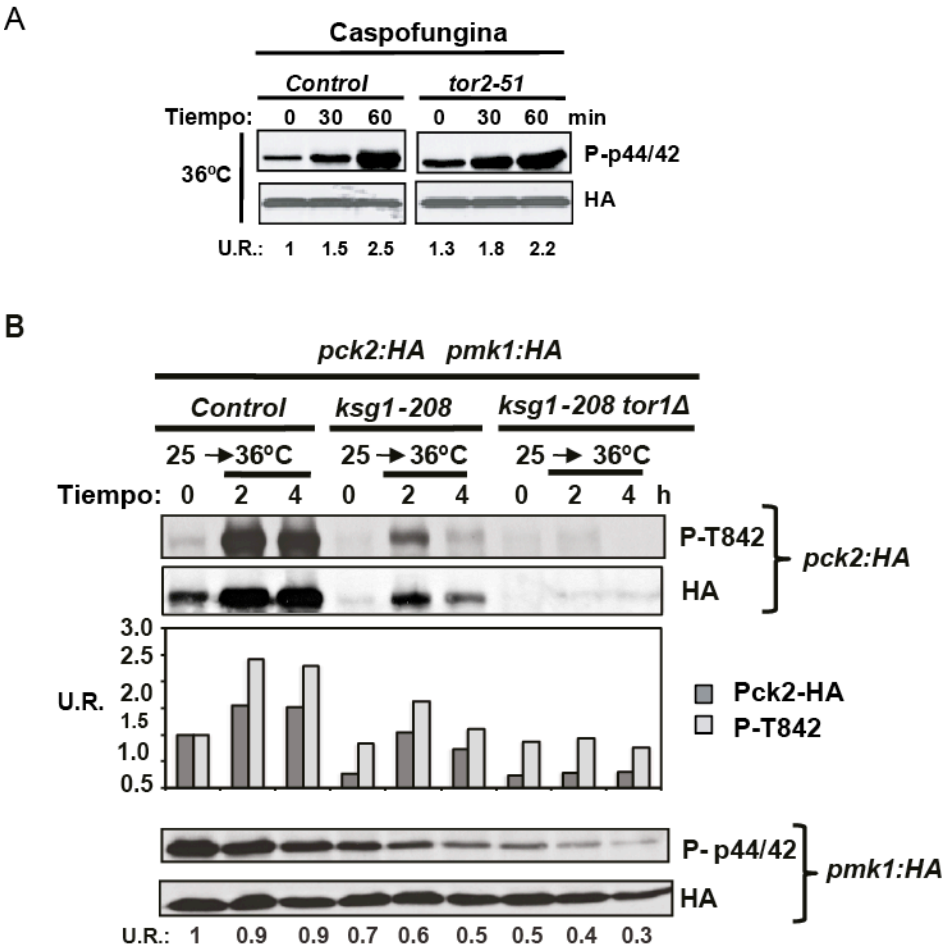


Figura 4.23 Tor1 regula la síntesis *de novo* de Pck2. (A) Las cepas MI200 (Pmk1-HA, control) y MM1225 (*tor2-51*, Pmk1-HA6H) se cultivaron en medio YES hasta mitad de fase exponencial y posteriormente se incubaron a 36ºC a los tiempos indicados en presencia de 1µg/ml de caspofungina. Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. **(B)** Las cepas MM913 (control), MM1100 (Pck2-HA; *ksg1-208*) y MM1257 (Pck2-HA, *ksg1-208 tor1Δ*), que expresan la fusión Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES a 25ºC hasta la fase exponencial temprana, y posteriormente se incubaron a 36ºC durante los tiempos indicados. Los extractos celulares se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron por separado con anticuerpos anti-fosfo-T842 (Pck2 fosforilado) o anti-HA (Pck2 total). Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas.

4.22 Tor1 regula positivamente la síntesis *de novo* de Pck2 en respuesta al estrés por daño en la pared celular y por ayuno de glucosa

Los resultados del apartado anterior sugieren que el complejo TORC2 está implicado en la regulación de la síntesis de Pck2 durante el crecimiento. En este punto nos planteamos si esta regulación también tiene lugar en respuesta a estrés. Para ello las cepas MM913 (Pck2-HA; control) y MM1205 (*tor1Δ*, Pck2-HA), que expresan una versión genómica Pmk1-HA6H, se cultivaron en medio YES y se trataron con KCl (estrés salino), recogiendo alícuotas a los tiempos indicados. Tal como muestra la Figura 4.24A, la cinética y grado de activación de Pmk1 en respuesta a estrés salino fueron idénticas en la cepa control y en el mutante *tor1Δ*. Sin embargo los niveles total y fosforilado de Pck2 en T842 fueron menores en el mutante *tor1Δ* a tiempos cortos respecto a la cepa control, aunque alcanzaron niveles similares a ésta a tiempos largos de incubación. Estos resultados indican que el complejo TORC2 no participa en la activación de la ruta de Pmk1 en respuesta a estrés salino, aunque sí parece regular parcialmente la síntesis de Pck2 en estas condiciones.

A continuación decidimos determinar si el complejo TORC2 regula la actividad de la ruta de integridad celular en respuesta al daño en la pared celular. Para ello las cepas MM913 (Pck2-HA; control) y MM1205 (*tor1Δ*, Pck2-HA) se cultivaron en medio YES a 28ºC hasta mitad de fase exponencial y se trataron con caspofungina. En la Figura 4.24B (paneles superiores) se puede apreciar que los niveles totales y fosforilados en T842 de Pck2 se vieron reducidos drásticamente en el mutante *tor1Δ* en presencia de dicho compuestp, lo que provocó una disminución evidente en la activación de Pmk1. La disminución de la activación de Pmk1 en ausencia de Tor1 se debía específicamente a la limitación en el contenido de Pck2 y no de otros activadores de la ruta, ya que los niveles de Rho2, Mkh1 (MAPKKK) y Pek1 (MAPKK) permanecieron invariables en las mismas condiciones experimentales (Figura 4.24B, paneles inferiores).

En *S. pombe* el complejo TORC2 está compuesto por la quinasa Tor1, el homólogo de la proteína Rictor Ste20 (también conocido como Ste16), Pop3 (también denominado Wat1) y Bit61 (Otsubo y Yamamoto, 2008). Para poner de manifiesto la relevancia de los distintos elementos del complejo en la respuesta de *S. pombe* frente al estrés por daño en pared celular, las cepas GB3 (*pck2Δ*), MI200 (control), MM1194 (*tor1Δ*), MM1242 (*ste20Δ*), MM1241 (*pop3Δ*), MM1240 (*bit61Δ*) y MM1214 (*sin1Δ*) se cultivaron en medio YES y a continuación se sembraron diluciones seriadas sobre placas Petri con el mismo medio suplementado con concentraciones crecientes de caspofungina, incubándose a 28ºC durante 3 días.

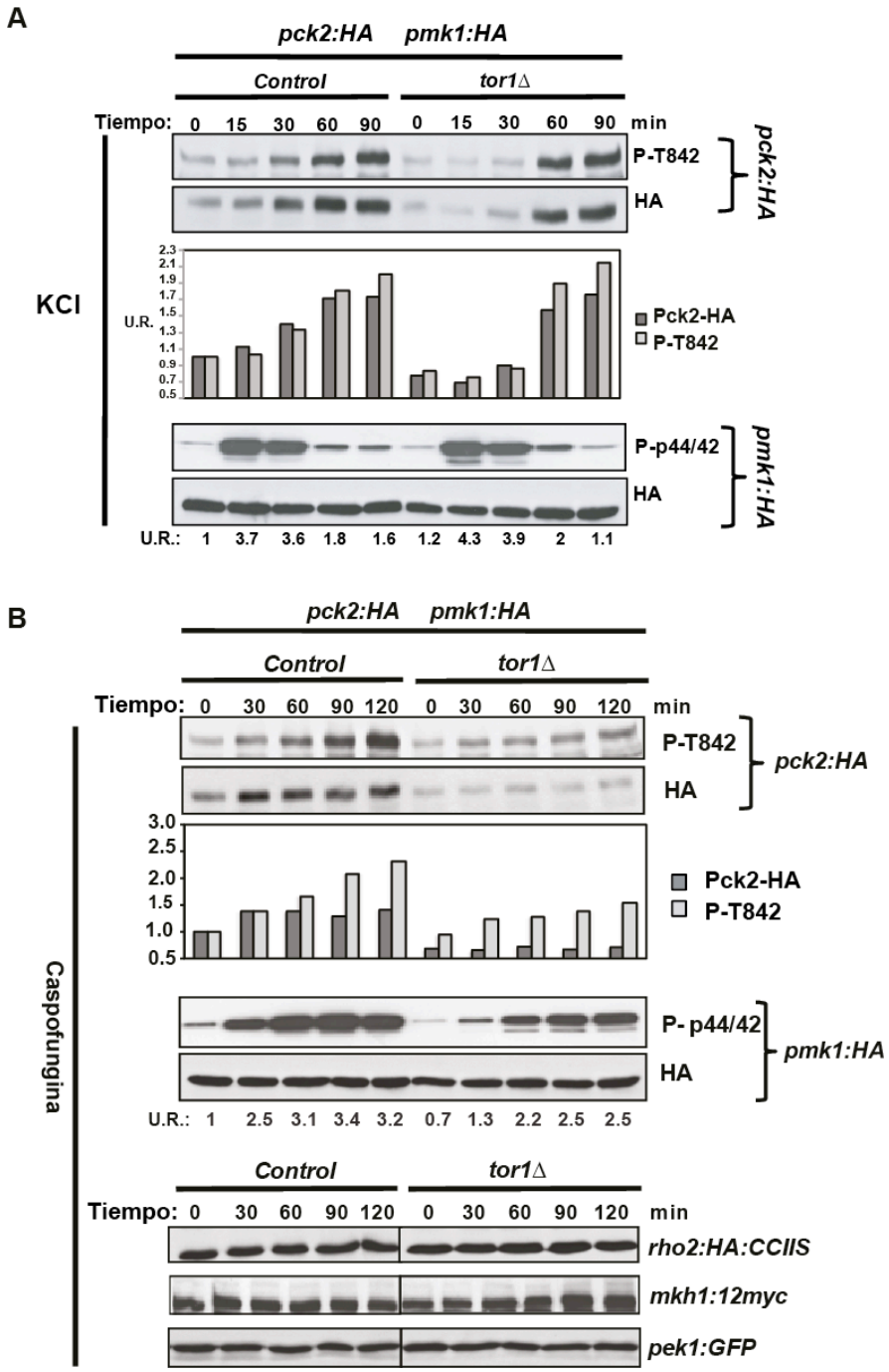


Figura 4.24 Tor1 regula la síntesis *de novo* de Pck2 en respuesta a estrés salino y de pared celular (A) Las cepas MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA6H) y MM1205 (*tor1Δ,* Pck2-HA, Pmk1-HA) se cultivaron hasta fase exponencial temprana en medio YES a 28ºC , se trataron con 0,6M de KCl y se recogieron alícuotas a los tiempos indicados. La detección de Pck2 total y fosforilado en T842 se realizó con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo T842, respectivamente. Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas.**(B) Paneles superiores.** Las cepas descritas en (A) se cultivaron hasta fase exponencial temprana en medio YES a 28ºC, se trataron con 1 µg/ml de caspofungina y se recogieron alícuotas a los tiempos indicados. La detección de las formas totales y fosforiladas de Pck2 y Pmk1 se realizó como se describe en (A). **Paneles inferiores.** Los extractos de las cepas LSM400 (Rho2-HA-CCIIS), LS210 (Mkh112myc) y MI401 (Pek1-GFP) se incubaron con anticuerpos anti-HA, anti-myc, y anti-GFP, respectivamente. U.R, Unidades relativas.

En la Figura 4.25A se puede observar que, en comparación con la cepa control, los mutantes *tor1Δ*, *ste20Δ*, y *sin1Δ* presentaron una sensibilidad moderada al crecimiento en presencia de caspofungina, mientras que el crecimiento de los mutantes *pop3Δ* y *bit61Δ* no se vio afectado por la presencia de la droga.

Estos resultados confirman el papel relevante del complejo TORC2 durante la respuesta defensiva frente al daño en la pared celular inducido por la caspofungina. Sin embargo, utilizando idéntica metodología al experimento anterior, observamos que el doble mutante *tor1Δ* Pck2-*K712W* mostró una sensibilidad aditiva frente a la caspofungina en comparación con los mutantes sencillos *tor1Δ* y Pck2-*K712W* (Figura 4.25B). Ello sugiere que el complejo TORC2 regula la integridad de la pared celular mediante mecanismos dependientes e independientes de Pck2 y de la ruta de integridad celular.

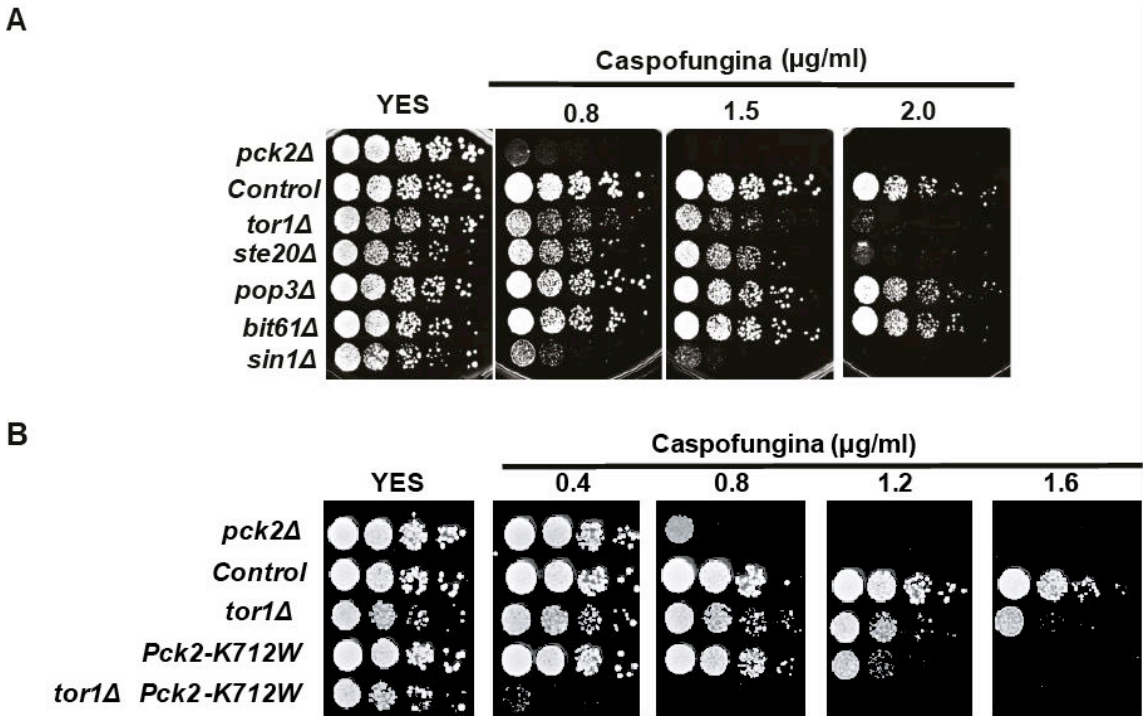


Figura 4.25 (A) Mutantes en componentes del complejo TORC2 son sensibles a caspofungina. Las cepas GB3 (*pck2Δ*), MI200 (control), MM1194 (*tor1Δ*), MM1242 (*ste20Δ*), MM1241 (*pop3Δ*), MM1240 (*bit61Δ*), y MM 1214 (*sin1Δ*) se cultivaron en medio YES a 28ºC hasta mitad de fase exponencial. Diluciones seriadas de cada cepa se inocularon en placas con medio YES suplementadas con 0,8-2,0 µg/ml de caspofungina, incubándose durante 3 días a 28ºC. **(B) Interacción genética entre Pck2 y Tor1.** Las cepas GB3 (*pck2Δ*), MI200 (control), MM1194 (*tor1Δ*), MM1022 (Pck2.K712W-HA) y MM1463 (*tor1Δ,* Pck2.K712W-HA) se crecieron en medio YES a 28ºC hasta mitad de fase exponencial. Diluciones seriadas de cada cepa se inocularon en placas con medio YES suplementadas con 0,4-1,6 µg/ml de caspofungina incubándose durante 3 días a 28ºC.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación habían demostrado que el pre-tratamiento con cicloheximida suprimía la activación de Pmk1 durante el estrés por ayuno de glucosa (Madrid *et al*., 2013). Esta observación sugiere que la activación de la MAPK en estas condiciones también requiere la síntesis *de novo* de Pck2. Para aclarar si Tor1 participa en este proceso, las cepas MM913 (Pck2-HA; control) y MM1205 (*tor1Δ,* Pck2-HA) se sometieron a un estrés por ayuno de glucosa según se describe en el Apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la Figura 4.26, en ausencia de glucosa, los niveles total y fosforilado en T842 de Pck2 se redujeron significativamente en el mutante *tor1Δ* en comparación con la cepa control, y dicho descenso vino acompañado por una disminución de la activación de Pmk1.

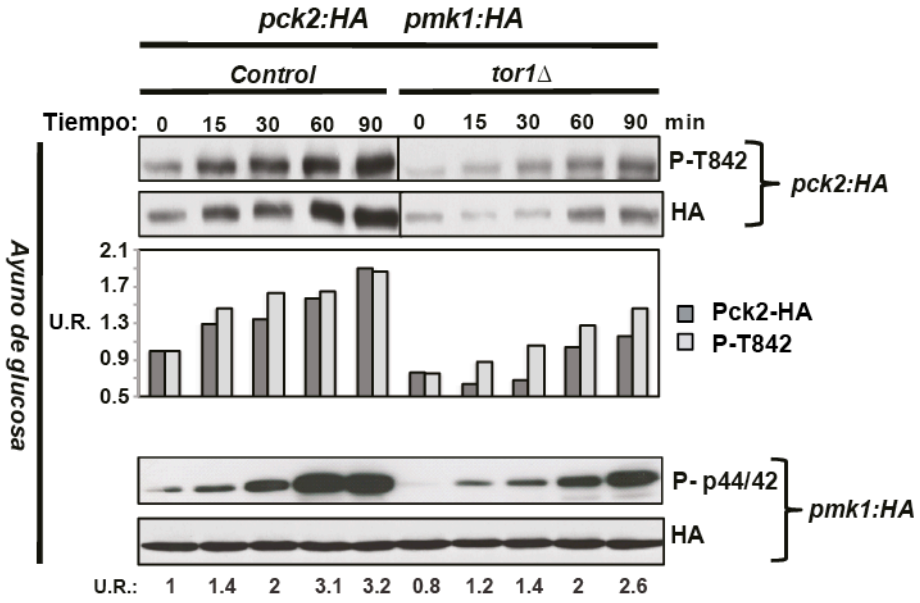


Figura 4.26 Tor1 regula la síntesis *de novo* de Pck2 y la activación de Pmk1 en respuesta al ayuno de glucosa. Las cepas MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA6H) y MM1205 (*tor1Δ,* Pck2-HA, Pmk1-HA) se cultivaron a 28ºC en medio YES con 7% glucosa y se transfirieron al mismo medio sin glucosa y en presencia de 3% glicerol. La detección de Pck2 total y fosforilado en T842 se realizó con los anticuerpos anti-HA y anti-fosfo T842, respectivamente. Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron con los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas.

En conjunto, estos resultados sugieren que Tor1, como parte del complejo TORC2, promueve la síntesis de Pck2, contribuyendo así a la adecuada activación de la ruta de integridad celular de *S. pombe* en respuesta al estrés por daño en la pared celular y durante el ayuno de glucosa.

5. DISCUSIÓN

Discusión

Uno de los principales resultados obtenidos en el presente trabajo ha consistido en la demostración de que Ksg1, el ortólogo de la quinasa de pendiente de fosfoinosítidos (PDK-1) en organismos superiores, es un regulador positivo de la ruta de MAP quinasas de integridad celular en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Así, nuestros experimentos han mostrado que la actividad de Pmk1, la MAPK de dicha ruta, es prácticamente inexistente en células que expresan el alelo termosensible *ksg1-208* incubadas a temperatura restrictiva durante el crecimiento vegetativo y en respuesta distintas condiciones de estrés (Resultados; Figura 4.1 y 4.2). También hemos demostrado que Ksg1 se asocia y fosforila *in vivo* el residuo conservado T842 presente en el bucle de activación del ortólogo a PKC Pck2 (Resultados; Figura 4.9), y que es el principal activador aguas arriba del modulo de MAP quinasas (Barba *et al.,* 2008; Ma *et al.,* 2006). Distintos estudios habían demostrado previamente que en la mayoría de los casos, la fosforilación en el bucle de activación de las distintas isoformas de PKC de eucariotas superiores es dependiente de PDK-1, aunque existen algunas excepciones como en el caso de las isoformas PKCθ o PKCδ, donde dicho proceso es debido a un mecanismo de autofosforilación (Freeley 2011, Liu *et al.,* 2006).

Este mecanismo parece ser también operativo en el caso de Pck2, ya que el bajo nivel de fosforilación en T842 detectado en el mutante *ksg1-208* desapareció por completo en un mutante doble *ksg1-208 pck2.K712W* que expresa una versión catalíticamente inactiva de la quinasa (Resultados; Figura 4.9B). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la fosforilación del bucle de activación de Pck2 se encuentra regulada por un mecanismo dual dependiente tanto de la PDK (Ksg1) como de autofosforilación.

En *S. pombe* la fosforilación por Ksg1 en el bucle de activación de distintas AGC-quinasas como Pka1, Gad8, o Psk1 es esencial para su activación catalítica *in vivo* y el ejercicio de sus funciones biológicas (Matsuo *et al*., 2003; Nakashima *et al*., 2012; Tang y Mcleod, 2004). En *S. cerevisiae*, la fosforilación del bucle de activación del ortólogo de PKC Pkc1 en el residuo T983 por los ortólogos de la PDK Pkh1 y Pkh2 es también indispensable para su activación catalítica y su función biológica (Roelants *et al*., 2004). Sorprendentemente, y al contrario que estas evidencias previas, nuestros resultados indican que la fosforilación de Pck2 en T842 no es estrictamente necesaria para su actividad catalítica y/o función biológica, ya que las células que expresan la mutación Pck2.T842A son perfectamente funcionales en cuanto a su capacidad de complementar tanto los fenotipos asociados a la falta de Pck2 (sensibilidad frente a la Caspofungina, *VIC*) (Resultados; Figura 4.13), como de activar la ruta de integridad y su principal efector Pmk1 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a distintas situaciones de estrés (Resultados; Figura 4.12 y 4.14). Por el

contrario, nuestros resultados sugieren que la autofosforilación en el sitio conservado del motivo de giro (T984) es crítica, junto con la fosforilación del bucle de activación en T842 (Ksg1-dependiente + autofosforilación), para la activación catalítica de Pck2. Ello es debido a que los "*readouts"* biológicos de Pck2, como son la activación de la ruta de integridad celular, el control de la homeostasis iónica (VIC), o el control de la integridad de la pared celular, se encuentran completamente bloqueados en las cepas que expresan el doble mutante Pck2.T842AT984A (Resultados; Figuras 4.12, 4.13 y 4.14).

La fosforilación del bucle de activación es esencial para la activación de la mayoría de isoformas de PKC con la excepción de PKCδ. En este caso se ha descrito la presencia de dos residuos fenilalanina flanqueando al residuo conservado del bucle de activación (T507), y que son responsables de la estabilización de su actividad catalítica sin necesidad de que éste se fosforile (Liu *et al*., 2006). Sin embargo, ambas fenilalaninas están ausentes en las posiciones equivalentes en la secuencia de aminoácidos de Pck2, lo que sugeriría la existencia de otros residuos en el bucle de activación que podrían ser fosforilados *in vivo* de manera alternativa y/o complementaria a T842. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el residuo T846 podría ser también importante para la activación catalítica de Pck2 y sus funciones señalizadoras. Esta hipótesis se sustenta por el hecho de que las células que expresan el mutante Pck2.T842A T846A muestran los defectos típicos de un mutante por pérdida de función de Pck2, como son una completa pérdida de la actividad de Pmk1 en condiciones de estrés y una mayor sensibilidad frente a la caspofungina respecto a los mutantes simples T842A o T846A (Resultados; Figura 4.18). En apoyo de esta posibilidad se encuentra el hecho de que estudios masivos del fosfoproteoma humano han demostrado la existencia de residuos equivalentes a T846 que se encuentran fosforilados *in vivo* en algunas isoformas de PKC (Phanstiel *et al*., 2011), lo que sugiere que dicha modificación post-traduccional podría estar conservada evolutivamente. Desafortunadamente no hemos sido capaces de obtener anticuerpos que detecten de manera específica la fosforilación *in vivo* de Pck2 en T846. Además, los ensayos quinasa *in vitro* realizados evidenciaron que, en comparación con la versión silvestre, la baja fosforilación del mutante Pck2.T842A por Ksg1 no se ve agravada en el mutante doble Pck2.T842A T846A (Resultados; Figura 4.17C). Es posible que la fosforilación de Pck2 en T846 solamente tenga lugar bajo ciertas condiciones fisiológicas, como por ejemplo en presencia de las GTPasas Rho1 o Rho2, o que dicha modificación sea llevada a cabo por otra quinasa distinta a Ksg1.

Tal como se comentó en la Introducción, la fosforilación inicial del bucle de activación de las PKCs posiciona correctamente los residuos para la catálisis, y es necesaria para el posterior procesamiento de su extremo C-terminal mediante dos fosforilaciones secuenciales en los motivos de giro e hidrofóbico. La fosforilación del motivo de giro juega un papel fundamental en la maduración y estabilización de las PKCs, además de servir como plataforma para el establecimiento de distintas interacciones proteína-proteína (Newton, 2001; Freeley *et al*., 2011). Los resultados de este trabajo indicaron que Ksg1 no fosforila *in vivo* a Pck2 en el residuo conservado del motivo de giro (T984), y

que dicha fosforilación se anuló por completo en el mutante Pck2-T842A T846A durante el crecimiento vegetativo y en respuesta al choque térmico (Resultados; Figura 4.17B). Estas observaciones sugieren un modelo en el que, en respuesta a estrés, la fosforilación *in vivo* del bucle de activación de Pck2 en T842 (mediada por Ksg1 y un mecanismo de autofosforilación) y posiblemente en T846 (¿autofosforilación?, ¿dependiente de quinasa?) es fundamental para permitir la fosforilación posterior del motivo de giro en T984 y promover la activación catalítica de la quinasa. Sin embargo, este modelo presenta ciertas limitaciones, como la derivada de la observación de que el fenotipo VIC del mutante triple Pck2.T842A T846A T984A es más agresivo que en el mutante doble Pck2.T842A T846A (Resultados; Figura 4.18A), lo que sugeriría que el modelo de interdependencia de fosforilación entre bucle de activación y el motivo de giro podría existir únicamente en respuesta a estrés, y no durante el crecimiento vegetativo.

En este trabajo también hemos analizado el papel que juega el dominio hidrofóbico de Pck2 sobre su actividad y funciones biológicas. Los residuos conservados de fenilalanina en el motivo hidrofóbico de las isoformas de PKC atípicas humanas PKCζ y PRK2 definen un sitio de acoplamiento para PDK-1 que es necesario para la posterior fosforilación del bucle de activación (Balendran *et al*., 2000). Nuestros resultados indican que la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de Pck2 dependiente de Ksg1 en el bucle de activación (T842) se encuentra disminuida en células que expresan una versión mutante en las fenilalaninas conservadas del dominio hidrofóbico en posiciones 998 y 1001 (Pck2.F998A F1001A). Parece, por tanto, bastante probable que la fosforilación del bucle de activación de Pck2 por Ksg1 dependa de su acoplamiento previo por medio del motivo hidrofóbico de la quinasa. Por el contrario, la posible fosforilación del residuo conservado S1002 del motivo hidrofóbico parece regular negativamente la actividad catalítica de Pck2. Esta hipótesis se fundamenta en que tanto la fosforilación basal de Pck2 en T842 como la actividad de Pmk1 se incrementaron notablemente en el mutante Pck2.S1002A con respecto a la cepa silvestre, y disminuyeron en los correspondientes mutantes fosfomiméticos Pck2.S1002E y Pck2.S1002D (Resultados; Figura 4.12). En este contexto Pck2 se asemeja de nuevo a la PKCδ humana, ya que en este caso se ha descrito que la fosforilación del motivo hidrofóbico regula negativamente su actividad catalítica (Karmacharya *et al*., 2010).

Otro resultado reseñable obtenido en este trabajo se refiere al posible papel señalizador de Pck2 en ausencia de actividad catalítica. Previamente, en *S. cerevisiae* se había descrito que un fosfomutante de Pkc1 en el bucle de activación (y por tanto, no activable) era capaz de complementar el fenotipo de sensibilidad del mutante nulo *pkc1Δ* frente a la miriocina, un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos (Roelants *et al*., 2004). Sin embargo, el hecho de que en este organismo el mutante *pkc1Δ* no sea viable sin la presencia de un estabilizador osmótico (sorbitol) en el medio de cultivo, complicaba la interpretación de esta observación. En este estudio hemos confirmado que los mutantes que expresan una versión catalíticamente inactiva de Pck2 muestran cierta actividad biológica que se

expresa por su capacidad de complementar parcialmente algunos de los fenotipos del mutante nulo *pck2Δ*, como son el fenotipo VIC, o la sensibilidad de crecimiento frente a la caspofungina (Resultados; Figura 4.13). Estos resultados implicarían que determinadas funciones de Pck2 en *S. pombe* son ejecutadas en parte por la propia proteína, siendo por tanto independientes de su actividad catalítica. Este papel regulatorio de Pck2 independiente de catálisis podría estar conservado evolutivamente y no haber sido detectado en las isoformas de PKC de organismos superiores debido, como en el caso de *S. cerevisiae*, a su carácter esencial.

Estudios previos habían demostrado que las Rho GTPasas Rho1 como Rho2 promueven la estabilización y el incremento de los niveles de fosforilación de Pck2 en T842 (Sayers *et al*., 2000; Villar-Tajadura *et al*., 2008). En base a nuestros resultados, la síntesis *de novo* de Pck2 y la fosforilación *in vivo* en el bucle de activación (T842) y en el motivo de giro (T984) aumentan progresivamente en respuesta al estrés salino, estrés por daño en la pared celular, o al exponer las células a altas temperaturas (Resultados; Figura 4.9 y 4.19). Estas observaciones sugieren que en la levadura con fisión Pck2 se comporta como una proteína inducible por estrés. Por lo tanto, el mantenimiento de niveles elevados de Pck2 activo en respuesta a estrés parece estar regulado por un complejo mecanismo que es dependiente de la fosforilación del dominio catalítico dependiente de Ksg1, autofosforilación , u otras quinasas todavía desconocidas, junto con la estabilización ligada a la interacción con Rho1 o Rho2 por medio de los motivos HR del extremo N-terminal de la quinasa.

Desde un punto de vista general, las fosforilaciones del bucle de activación y del motivo de giro de Pck2 son necesarias para la transmisión de la señal aguas abajo hacia el módulo de MAP quinasas y la activación de Pmk1 durante el crecimiento y en respuesta a la mayoría de estreses (Ma *et al*., 2006; Barba *et al*., 2008; Madrid *et al*., 2013; este trabajo). Sin embargo, el aumento de la síntesis de Pck2 en respuesta a estrés es esencial para permitir la adecuada activación de Pmk1 en respuesta al estrés por daño en la pared celular o tras el ayuno de glucosa, pero no durante el estrés osmótico salino. Esta conclusión se basa esencialmente en dos observaciones, ya que i- la cinética de aumento en la fosforilación de Pmk1 en las dos primeras condiciones es paralela al aumento en los niveles de Pck2 total; y ii- al contrario del resto de componentes de la ruta de integridad celular, los niveles de proteína de Pck2 disminuyen significativa y rápidamente en respuesta a la inhibición de la síntesis proteica en presencia de cicloheximida. La activación de Pmk1 en respuesta al estrés osmótico transcurre de manera rápida y transitoria, y es independiente de la síntesis proteica *de* novo (Madrid *et al*., 2006). Por el contrario, la cinética de activación de Pmk1 en respuesta a caspofungina (daño en la pared celular), o tras el ayuno de glucosa, requiere la síntesis proteica *de novo* (Madrid *et al*., 2013; el presente trabajo), y presenta una cinética progresiva que recuerda a un mecanismo de retroalimentación positivo. La necesidad de ofrecer una respuesta adaptativa mantenida durante la reparación de los daños causados en la pared celular (caspofungina), o la reorganización de la pared celular durante el arresto nutricional (glucosa), podría ser la causa que explique la necesidad de

incrementar la síntesis de Pck2 que activa la ruta de integridad celular en ambas situaciones.

En cualquier caso, ¿cuáles son los circuitos moleculares responsables del aumento de la síntesis de Pck2 en condiciones de estrés?. Las evidencias obtenidas en este trabajo apuntan a que la quinasa Tor1, formando parte del complejo TORC2, podría actuar a nivel traduccional regulando la síntesis de Pck2, tal como evidencia el bloqueo en la síntesis de Pck2 en el mutante *tor1Δ* durante el crecimiento y bajo diferentes situaciones de estrés (Resultados; Figura 4.24). Lógicamente, este papel es particularmente evidente durante el estrés por daño en pared o en ayuno de glucosa, al tratarse de situaciones en las que es obligado el aumento en los niveles de Pck2 para permitir una adecuada activación de la ruta de Pmk1.

En células de mamíferos se ha descrito que el complejo mTORC2 regula la fosforilación del motivo de giro de algunas PKCs, aumentando su estabilidad y favoreciendo su plegamiento (Freeley *et al.*, 2011). Con estos precedentes se podría considerar que Tor1 también fosforila el motivo de giro (T984) de Pck2 y regula su estabilidad. Sin embargo, el tratamiento con cicloheximida no produjo una reducción adicional en los niveles de Pck2 en el mutante *tor1Δ* tras el tratamiento con caspofungina (Figura 4.27).

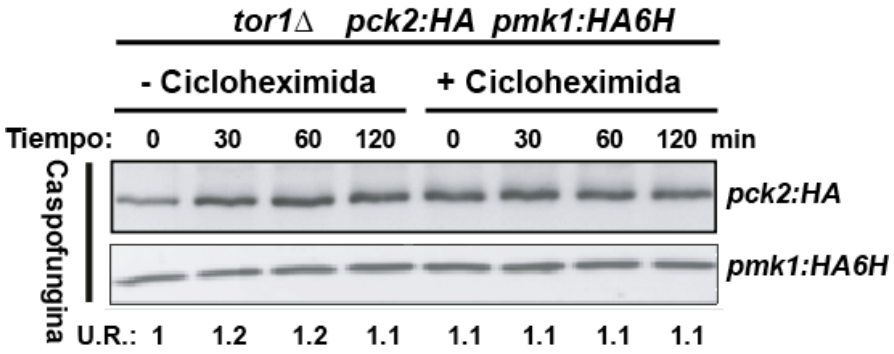


Figura 4.27 Las cepas MM913 (Pck2-HA, Pmk1-HA6H) y MM1205 (*tor1Δ*) se cultivaron hasta fase exponencial temprana en medio YES a 28ºC, se incubaron en presencia o ausencia de 100 µg/ml de cicloheximida durante 1 hora, y finalmente se trataron con 1 µg/ml de caspofungina, recogiéndose las correspondientes alícuotas a los tiempos indicados. Los extractos obtenidos se resolvieron mediante SDS-PAGE y se hibridaron con un anticuerpo anti-HA. U.R., unidades relativas.

Además, si esta hipótesis fuese correcta, Pmk1 no podría activarse en respuesta a estrés salino en un mutante Pck2.T842A *tor1Δ*, ya que dicha activación depende por completo de la fosforilación conjunta de Pck2 en el bucle de activación y en el motivo de giro. Al contrario, tal como muestra la Figura 4.28, Pmk1 se activó de manera similar durante el estrés salino en los mutantes Pck2.T842A y Pck2.T842A *tor1Δ*. Por tanto, Tor1 no es responsable de la fosforilación *in vivo* del motivo de giro de Pck2. Estos resultados sugieren además que Tor1 regula la síntesis de Pck2 en respuesta a estrés a nivel traduccional mediante un mecanismo independiente de fosforilación.

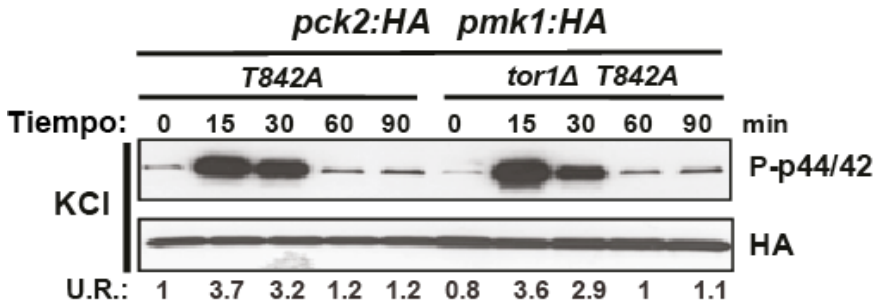


Figura 4.28 Las cepas MM918 (Pck2.T842-HA) y MM1207 (*tor1Δ* Pck2.T842A-HA) se cultivaron hasta fase exponencial temprana en medio YES a 28ºC, se trataron con KCl 0,6M, y se recogieron alícuotas a los tiempos indicados. Las formas activa y total de Pmk1 se detectaron tras la hibridación con anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-HA, respectivamente. U.R., unidades relativas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente Tesis, proponemos un modelo de trabajo que se resume en la Figura 4.29. Según este modelo, en *S. pombe* tanto la PDK Ksg1 como un mecanismo de autofosforilación son responsables de la fosforilación *in vivo* del bucle de activación de Pck2 en T842 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a distintos tipos de estrés ambiental. Además, la fosforilación (todavía no confirmada) del residuo conservado del bucle de activación T846, podría jugar un papel relevante para la activación catalítica de la quinasa. Estas modificaciones, sumadas a la fosforilación secuencial en el motivo de giro en la posición T984 y a la estabilización mediada por la interacción con las GTPasas Rho1 y/o Rho2, conducirían a la activación catalítica de Pck2. Una vez activado, Pck2 promueve la adaptación celular frente al estrés, bien activando la ruta de MAP quinasas de integridad celular, o mediante mecanismos independientes de la ruta, como por ejemplo favoreciendo la incorporación de glucanos estructurales (α-glucano) en la pared celular. Por último, el complejo TORC2 favorece la síntesis *de novo* de Pck2 durante el crecimiento celular y en respuesta a estrés, siendo este necesario para permitir la activación de Pmk1 en respuesta a estímulos ambientales específicos, tales como el daño en la pared celular o el ayuno de glucosa.

En *S. pombe* Gad8, cuya fosforilación *in vivo* en el motivo hidrofóbico es dependiente de TORC2, copurifica con algunas proteínas ribosomales y regula la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Du *et al*., 2012). Esta observación, junto con la demostración previa en células superiores de que el complejo mTORC2 copurifica con ribosomas (Zinzalla *et al*., 2011), sugiere que en la levadura con fisión el complejo TORC2-Gad8 podría estar también asociado con los ribosomas de manera constitutiva y/o inducible, proporcionando una localización subcelular idónea para regular la traducción de Pck2 y su activación en respuesta a distintos cambios ambientales.

Aunque en *S. pombe* la señalización mediada por TORC2-Gad8 es necesaria para una adecuada respuesta celular frente al estrés, recientemente se ha propuesto que la ruta de integridad

celular podría actuar regulando negativamente su actividad (Cohen *et al*., 2014). Estas evidencias añaden una nueva faceta al modelo regulatorio propuesto en este trabajo, y dibujan un escenario donde el complejo TORC2 regula positivamente la ruta de integridad celular por medio de Pck2, y en el que Pmk1, una vez activada, inhibe o limita la actividad del complejo. Este mecanismo de retroregulación entre ambas rutas de señalización permitiría modular la respuesta celular de adaptación frente al estrés de una manera dinámica y enormemente flexible.

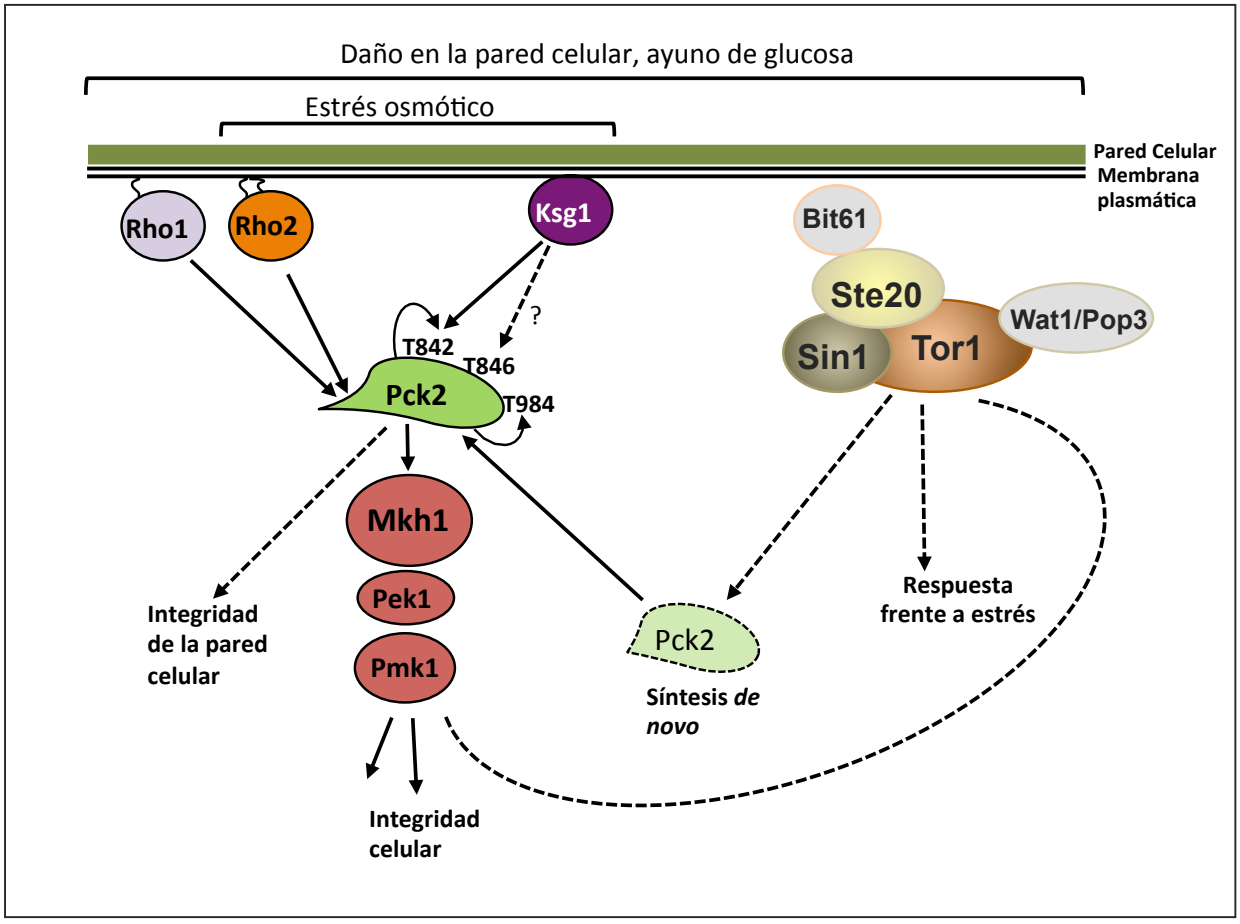


Figura 4.29 Modelo sobre los mecanismos de regulación de la función de Pck2 en el control de la integridad celular en *S. pombe* (ver la información detallada en el texto)

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

1- Ksg1, el único ortólogo a la PDK1 presente en *S. pombe*, es necesario para la correcta activación de Pmk1, la MAP quinasa de la ruta de integridad, celular durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a múltiples situaciones de estrés.

2- Ksg1 se asocia in vivo con Pck1 y Pck2, los dos ortólogos a PKC existentes en este organismo. Ksg1 fosforila *in vivo* a Pck2 (el principal activador aguas arriba de la ruta de MAP quinasas de integridad celular) en el residuo conservado de treonina-842 presente en su bucle de activación. La fosforilación del bucle de activación de Pck2 también se encuentra regulada por un mecanismo de autofosforilación.

3- La autofosforilación es probablemente el mecanismo responsable de la fosforilación *in vivo* del residuo conservado de treonina-984 del motivo de giro de Pck2.

4- A diferencia de la mayoría de PKCs, la fosforilación *in vivo* de Pck2 en el sitio conservado del bucle de activación (treonina-842) no es necesaria para la transmisión de señales hacia la ruta de MAP quinasas integridad celular durante el crecimiento y en respuesta a estrés.

5- La activación catalítica y función biológica de Pck2 es dependiente de la fosforilación conjunta de los residuos de treonina-842 (bucle de activación) y -984 (motivo de giro) del dominio de activación. Evidencias adicionales sugieren que este proceso es también regulado fosforilación del residuo conservado de treonina en posición 846 dentro del bucle de activación.

6- La síntesis *de novo* de Pck2 y la fosforilación en treonina-842 del bucle de activación se incrementan notablemente en respuesta a estreses térmico y salino, durante el daño en la pared celular, o tras el ayuno de glucosa.

7- Las Rho GTPasas Rho1 y Rho2 promueven, junto con la fosforilación del bucle de activación y el motivo de giro, la estabilización de Pck2 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés.

8- La síntesis *de novo* de Pck2 es crítica para la activación de Pmk1en respuesta al daño en la pared celular o tras el ayuno de glucosa, pero no en respuesta al estrés osmótico salino.

9- El complejo TORC2 no fosforila *in vivo* a Pck2, pero favorece su síntesis *de novo* durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés, permitiendo la activación de Pmk1 en respuesta al daño en la pared celular o al ayuno de glucosa.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11 (7)**, 36-42.

Ahmed, S., Kozma, R., Lee, J., Monfries, C., Harden, N., Lim, L. (1991). The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C and diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding. *Biochem J* **280 (Pt 1)**, 233-41.

Ai, W., Bertram, P. G., Tsang, C. K., Chan, T. F., Zheng, X. F. (2002). Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol Cell* **10**, 1295-305.

Albert, V., Hall, M. N. (2015). mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 55-66.

Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell F. B., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman D. G., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., Bownes, M. (1997a). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol* **7(10)**, 776-89.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Cohen, P. (1997b). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol* **7**, 261-9.

Álvarez, B., Moreno, S. (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J Cell Sci* **119**, 4475-85.

Ananthanarayanan, B., Stahelin, R. V., Digman, M. A., Cho, W. (2003). Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J Biol Chem* **278**, 46886-94.

Anderson, K. E., Coadwell, J., Stephens, L. R., Hawkins, P. T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* **8**, 684-91.

Andrews, P. D., Stark, M. J. (2000). Dynamic Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci* **113 (Pt 15)**, 2685-93.

Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M. A., Paravicini, G. (1994). Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J Biol Chem* **269**, 16821-8.

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

Arellano, M., Durán, A., Pérez, P. (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J* **15**, 4584-91.

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

Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Durán, A., Pérez, P. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, Pck1p and Pck2p, are targets of Rho1p and Rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci* **112 (Pt 20)**, 3569-78.

Aronova, S., Wedaman, K., Aronov, P. A., Fontes, K., Ramos, K., Hammock, B. D., Powers, T. (2008). Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell Metab* **7**, 148-58.

Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A. 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-51.

Balendran, A., Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M., Alessi, D. R. (2000). A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase Czeta (PKCzeta) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J Biol Chem* **275**, 20806-13.

Balendran, A., Casamayor, A., Deak, M., Paterson, A., Gaffney, P., Currie, R., Downes, C. P., Alessi, D. R. (1999). PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol* **9**, 393-404.

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

Berchtold, D., Walther, T. C. (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell* **20**, 1565-75.

Biondi, R. M. (2004). Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation. *Trends Biochem Sci* **29**, 136-42.

Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M., Alessi, D. R. (2001). The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J* **20**, 4380-90.

Bornancin, F., Parker, P. J. (1996). Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase C alpha. *Curr Biol* **6**, 1114-23.

Borner, C., Filipuzzi, I., Wartmann, M., Eppenberger, U., Fabbro, D. (1989). Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **264**, 13902-9.

Broadus, M. R., Gould, K. L. (2012). Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Mol Biol Cell* **23**, 4118-28.

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

Bultynck, G., Heath, V. L., Majeed, A. P., Galan, J. M., Haguenauer-Tsapis, R., Cyert, M. S. (2006). Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* **26**, 4729-45.

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

Burns, D. J., Bell, R. M. (1991). Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem* **266**, 18330-8.

Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B. A., Downward, J., Parker, P. J., Larijani, B. (2007). Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation *in vivo*. *PLoS Biol* **5**, e95.

Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P. J., Larijani, B. (2009). Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol* **7**, e17.

Calonge, T. M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I., Pérez, P. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase Pck2p. *Mol Biol Cell* **11**, 4393-401.

Cameron, A. J., Escribano, C., Saurin, A. T., Kostelecky, B., Parker, P. J. (2009). PKC maturation is promoted by nucleotide pocket occupation independently of intrinsic kinase activity. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 624-30.

Cameron, A. J., Procyk, K. J., Leitges, M., Parker, P. J. (2008). PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival. *Int J Cancer* **123**, 769-79.

Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J., Alessi, D. R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* **9**, 186-97.

Cenni, V., Döppler, H., Sonnenburg, E. D., Maraldi, N., Newton, A. C., Toker, A. (2002). Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem J* **363**, 537-45.

Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., Dreazen, A., Cagnard, N., Carpentier, W., Kiss, T., Meyuhas, O., Pende, M. (2014). Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* **33**, 474-83.

Chen, D., Wilkinson, C. R., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N., Bähler, J. (2008). Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 308-17.

Chen, H., Nystrom, F. H., Dong, L. Q., Li, Y., Song, S., Liu, F., Quon, M. J. (2001). Insulin stimulates increased catalytic activity of phosphoinositide-dependent kinase-1 by a phosphorylation-dependent mechanism. *Biochemistry* **40**, 11851-9.

Cohen, A., Kupiec, M., Weisman, R. (2014). Glucose activates TORC2-Gad8 protein via positive regulation of the cAMP/cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway and negative regulation of the Pmk1 protein-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **289**, 21727-37.

Corbalán-García, S., Gómez-Fernández, J. C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 633-54.

Cortés, J. C., Ishiguro, J., Durán, A., Ribas, J. C. (2002). Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* **115**, 4081-96.

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

Cortés, J. C., Sato, M., Muñoz, J., Moreno, M. B., Clemente-Ramos, J. A., Ramos, M., Okada, H., Osumi, M., Durán, A., Ribas, J. C. (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol* **198**, 637-56.

Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., Francke, U., Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**, 859-66.

Crespo, J. L., Díaz-Troya, S., Florencio, F. J. (2005). Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **139**, 1736-49.

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

Currie, R. A., Walker, K. S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C. P., Cohen, P., Alessi, D. R., Lucocq, J. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J* **337 (Pt 3)**, 575-83.

Cybulski, N., Hall, M. N. (2009). TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci* **34**, 620-7.

Czerwinski, R., Aulabaugh, A., Greco, R. M., Olland, S., Malakian, K., Wolfrom, S., Lin, L., Kriz, R., Stahl, M., Huang, Y., Liu, L., Chaudhary, D. (2005). Characterization of protein kinase C theta activation loop autophosphorylation and the kinase domain catalytic mechanism. *Biochemistry* **44**, 9563-73.

Dai, N., Christiansen, J., Nielsen, F. C., Avruch, J. (2013). mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Genes Dev* **27(3)**, 301-12.

Dames, S. A., Mulet, J. M., Rathgeb-Szabo, K., Hall, M. N., Grzesiek, S. (2005). The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J Biol Chem* **280**, 20558-64.

Daquinag, A., Fadri, M., Jung, S. Y., Qin, J., Kunz, J. (2007). The yeast PH domain proteins Slm1 and Slm2 are targets of sphingolipid signaling during the response to heat stress. *Mol Cell Biol* **27**, 633-50.

Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103(2)**, 239-52.

De Camilli, P., Emr, S. D., McPherson, P. S., Novick, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* **271**, 1533-9.

Degols, G., 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**, 3356-63.

DeHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A., Hicke, L. (2002). The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **156**, 241-8.

Díaz-Cuervo, H., Bueno, A. (2008). Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Flp1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 2488-99.

Díaz-Meco, M. T., Moscat, J. (2001). MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* **21**, 1218-27.

Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., el-Sherbeini, M. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12907-11.

Du, W., Hálová, L., Kirkham, S., Atkin, J., Petersen, J. (2012). TORC2 and the AGC kinase Gad8 regulate phosphorylation of the ribosomal protein S6 in fission yeast. *Biol Open* **1**, 884-8.

Dubé, N., Tremblay, M. L. (2005). Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 108-17.

Dutil, E. M., Keranen, L. M., DePaoli-Roach, A. A., Newton, A. C. (1994). *In vivo* regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. *J Biol Chem* **269**, 29359-62.

Dutil, E. M., Newton, A. C. (2000). Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J Biol Chem* **275**, 10697-701.

Edwards, A. S., Newton, A. C. (1997). Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J Biol Chem* **272**, 18382-90.

Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* **27**, 1932-43.

Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T., Kunz, J. (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol Biol Cell* **16**, 1883-900.

Farooq, A., Zhou, M. M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* **16**, 769-79.

Ferguson, K. M., Kavran, J. M., Sankaran, V. G., Fournier, E., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., Lemmon, M. A. (2000). Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* **6**, 373-84.

Filippa, N., Sable, C. L., Hemmings, B. A., Van Obberghen, E. (2000). Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol Cell Biol* **20**, 5712-21.

Flynn, P., Mellor, H., Casamassima, A., Parker, P. J. (2000). Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **275**, 11064-70.

Forsburg, S. L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* **21**, 2955-6.

Freeley, M., Kelleher, D., Long, A. (2011). Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell Signal* **23**, 753-62.

Friant, S., Lombardi, R., Schmelzle, T., Hall, M. N., Riezman, H. (2001). Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J* **20**, 6783-92.

Frödin, M., Antal, T. L., Dümmler, B. A., Jensen, C. J., Deak, M., Gammeltoft, S., Biondi, R. M. (2002). A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J* **21**, 5396-407.

Frödin, M., Jensen, C. J., Merienne, K., Gammeltoft, S. (2000). A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J* **19**, 2924-34.

Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K., 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**, 1464-73.

Gaits, F., Russell, P. (1999). Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/StyI in fission yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 1395-407.

Gaits, F., Shiozaki, K., Russell, P. (1997). Protein phosphatase 2C acts independently of stress-activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast. *J Biol Chem* **272**, 17873-9.

Gangloff, Y. G., Mueller, M., Dann, S. G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J. F., Um, S. H., Brown, E. J., Cereghini, S., Thomas, G., Kozma, S. C. (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol* **24**, 9508-16.

Gao, T., Brognard, J., Newton, A. C. (2008). The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *J Biol Chem* **283**, 6300-11.

Gao, T., Toker, A., Newton, A. C. (2001). The carboxyl terminus of protein kinase C provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J Biol Chem* **276**, 19588-96.

García, P., Tajadura, V., García, I., Sánchez, Y. (2006). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 1620-31.

García, P., Tajadura, V., Sánchez, Y. (2009). The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 721-31.

Genot, E. M., Parker, P. J., Cantrell, D. A. (1995). Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon, and -zeta in T cell activation. *J Biol Chem* **270**, 9833-9.

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

Gould, C. M., Kannan, N., Taylor, S. S., Newton, A. C. (2009). The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J Biol Chem* **284**, 4921-35.

Graub, R., Hilti, N., Niederberger, C., Schweingruber, M. E. (2003). Ksg1, a homologue of the phosphoinositide-dependent protein kinase 1, controls cell wall integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Basic Microbiol* **43**, 473-82.

Griner, E. M., Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 281-94.

Grodsky, N., Li, Y., Bouzida, D., Love, R., Jensen, J., Nodes, B., Nonomiya, J., Grant, S. (2006). Structure of the catalytic domain of human protein kinase C beta II complexed with a bisindolylmaleimide inhibitor. *Biochemistry* **45**, 13970-81.

Guan, K. L., Dixon, J. E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* **192**, 262-67.

Guertin, D. A., Sabatini, D. M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**, 9-22.

Gusarova, G. A., Dada, L. A., Kelly, A. M., Brodie, C., Witters, L. A., Chandel, N. S., Sznajder, J. I. (2009). Alpha1-AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K-ATPase endocytosis via direct phosphorylation of protein kinase C zeta. *Mol Cell Biol* **29**, 3455-64.

Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loprieno, N. (1974)**.** *Schizosaccharomyces pombe*. En *Handbook of Genetics*. 1: 395. Ed. King, R.C. Plenum Press. N.Y.

Hagan, I. M., 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.

Hall, M. N. (2008). mTOR-what does it do? *Transplant Proc* **40**, S5-8.

Hálová, L., Du, W., Kirkham, S., Smith, D. L., Petersen, J. (2013). Phosphorylation of the TOR ATP binding domain by AGC kinase constitutes a novel mode of TOR inhibition. *J Cell Biol* **203**, 595-604.

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

Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., Hannan, R.D. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* **23**, 8862-77.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**, 177-89.

Hartmuth, S., Petersen, J. (2009). Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *J Cell Sci* **122**, 1737-46.

Hauge, C., Antal, T. L., Hirschberg, D., Doehn, U., Thorup, K., Idrissova, L., Hansen, K., Jensen, O. N., Jørgensen, T. J., Biondi, R. M., Frödin, M. (2007). Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J* **26**, 2251-61.

Hay, N., Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**, 1926-45.

Hayashi, T., Hatanaka, M., Nagao, K., Nakaseko, Y., Kanoh, J., Kokubu, A., Ebe, M., Yanagida, M. (2007). Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes Cells* **12**, 1357-70.

He, Y., Sugiura, R., Ma, Y., Kita, A., Deng, L., Takegawa, K., Matsuoka, K., Shuntoh, H., Kuno, T. (2006). Genetic and functional interaction between Ryh1 and Ypt3: two Rab GTPases that function in *S. pombe* secretory pathway. *Genes Cells* **11**, 207-21.

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

Helliwell, S. B., Schmidt, A., Ohya, Y., Hall, M. N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr Biol* **8**, 1211-4.

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

Hinnebusch, A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**, 407-50.

Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J., Klausner, R. D. (1998). Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9161-6.

Honma, Y., Kitamura, A., Shioda, R., Maruyama, H., Ozaki, K., Oda, Y., Mini, T., Jenö, P., Maki, Y., Yonezawa, K., Hurt, E., Ueno, M., Uritani, M., Hall, M. N., Ushimaru, T. (2006). TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. *EMBO J* **25**, 3832-42.

House, C., Kemp, B. E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* **238**, 1726-8.

Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R., Loewith, R. (2009). Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev* **23**, 1929-43.

Hug, H., Sarre, T. F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* **291 (Pt 2)**, 329-43.

Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M., Nishizuka, Y. (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* **6**, 477-80.

Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F., Shiozaki, K. (2008). Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle* **7**, 358-64.

Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., Guan, K. L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J* **27**, 1919-31.

Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 8344-52.

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* **17**, 1829-34.

Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* **252**, 7610-6.

Ishiguro, J. (1998). Genetic control of fission yeast cell wall synthesis: the genes involved in wall biogenesis and their interactions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Genet Syst* **73**, 181-91.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M. A., Hall, A., Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6**, 1122-8.

Jacinto, E., Lorberg, A. (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* **410**, 19-37.

Jacoby, J. J., Nilius, S. M., Heinisch, J. J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet* **258**, 148-55.

Jaken, S. (1997). Protein kinase C intracellular binding proteins. En Parker, P.J. & Dekker, L. V. (eds.) Protein kinase C: 179-188. Ed. Springer-Verlag, Heilderberg

Jaken, S. (2004). Protein kinase C regulation by protein interactions. En Dekker, L. V. (ed.) Protein kinase C: 49-62. Ed. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.

Johnson, L. N., Lewis, R. J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* **101(8)**, 2209-42.

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

Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N. N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N., Ohsumi, Y. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* **25**, 7239-48.

Kanashiro, C. A., Khalil, R. A. (1998). Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **25**, 974-85.

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

Karmacharya, M. B., Jang, J. I., Lee, Y. J., Lee, Y. S., Soh, J. W. (2010). Mutation of the hydrophobic motif in a phosphorylation-deficient mutant renders protein kinase C delta more apoptotically active. *Arch Biochem Biophys* **493**, 242-8.

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

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

Kawai, M., Nakashima, A., Ueno, M., Ushimaru, T., Aiba, K., Doi, H., Uritani, M. (2001). Fission yeast *tor1* functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr Genet* **39**, 166-74.

Kazanietz, M. G. (2005). Targeting protein kinase C and "non-kinase" phorbol ester receptors: emerging concepts and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 296-304.

Keeney, J. B., Boeke, J. D. (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**, 849-56.

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**, 371-82.

Kemp, B. E., Pearson, R. B. (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci* **15**, 342-6.

Kiley, S. C., Parker, P. J. (1995). Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J Cell Sci* **108 (Pt 3)**, 1003-16.

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163-75.

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* **11**, 895-904.

King, C. C., Zenke, F. T., Dawson, P. E., Dutil, E. M., Newton, A. C., Hemmings, B. A., Bokoch, G. M. (2000). Sphingosine is a novel activator of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *J Biol Chem* **275**, 18108-13.

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

Knopf, J. L., Lee, M. H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M., Bell, R. M. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* **46**, 491-502.

Kong, S. K., Chock, P. B. (1992). Protein ubiquitination is regulated by phosphorylation. An *in vitro* study. *J Biol Chem* **267**, 14189-92.

Krause, S. A., Gray, J. V. (2002). The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **12**, 588-93.

Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., François, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147-66.

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**, 5160-70.

Le Good, J. A., Brindley, D. N. (2004). Molecular mechanisms regulating protein kinase Czeta turnover and cellular transformation. *Biochem J* **378**, 83-92.

Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., Parker, P. J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-5.

Lee, H. W., Smith, L., Pettit, G. R., Vinitsky, A., Smith, J. B. (1996). Ubiquitination of protein kinase C-alpha and degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **271**, 20973-6.

Lee, K., Gudapati, P., Dragovic, S., Spencer, C., Joyce, S., Killeen, N., Magnuson, M. A., Boothby, M. (2010). Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* **32**, 743-53.

Lempiäinen, H., Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 855-63.

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**, 262-91.

Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145-75.

Levin, D. E., Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M., Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**, 213-24.

Li, W., Zhang, J., Bottaro, D. P., Pierce, J. H. (1997). Identification of serine 643 of protein kinase C-delta as an important autophosphorylation site for its enzymatic activity. *J Biol Chem* **272(39)**, 24550-5.

Ling, M., Trollér, U., Zeidman, R., Lundberg, C., Larsson, C. (2004). Induction of neurites by the regulatory domains of PKCdelta and epsilon is counteracted by PKC catalytic activity and by the RhoA pathway. *Exp Cell Res* **292**, 135-50.

Liu, J. P. (1996). Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* **116,** 1-29.

Liu, W. S., Heckman, C. A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* **10(8)**, 529-42.

Liu, Y., Belkina, N. V., Graham, C., Shaw, S. (2006). Independence of protein kinase C-delta activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells. *J Biol Chem* **281**, 12102-11.

Liu, Y., Graham, C., Li, A., Fisher, R. J., Shaw, S. (2002). Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to *in vivo* nuclear-factor-kappaB induction. *Biochem J* **361**, 255-65.

Lizcano, J. M., Alessi, D. R. (2002). The insulin signalling pathway. *Curr Biol* **12**, R236-8.

Loewith, R. (2010). TORC1 signaling in budding yeast . *The Enzymes* **27**, 147-175.

Loewith, R., Hubberstey, A., Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the Mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **113 (Pt 1)**, 153-60.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10**, 457-68.

Lu, Z., Liu, D., Hornia, A., Devonish, W., Pagano, M., Foster, D. A. (1998). Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* **18**, 839-45.

Luo, X., Talarek, N., De Virgilio, C. (2011). Initiation of the yeast G_0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs. *RNA Biol* **8**, 14-7.

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

MacNeill, S. A., Fantes, P. A. (1997). Genetic and physiological analysis of DNA replication in fission yeast. *Methods Enzymol* **283**, 440-59.

Madrid, M., Fernández-Zapata, J., Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Cansado, J. (2013). Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. *BMC Microbiol* **13**, 1-12.

Madrid, M., Núñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Cansado, J. (2007). Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol Biol Cell* **18**, 4405-19.

Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M., Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **281**, 2033-43.

Mahfouz, M. M., Kim, S., Delauney, A. J., Verma, D. P. (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* **18**, 477-90.

Maines, M. D., Miralem, T., Lerner-Marmarosh, N., Shen, J., Gibbs, P. E. (2007). Human biliverdin reductase, a previously unknown activator of protein kinase C betaII. *J Biol Chem* **282**, 8110-22.

Makowske, M., Rosen, O. M. (1989). Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *J Biol Chem* **264**, 16155-9.

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

Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-85.

Martelli, A. M., Sang, N., Borgatti, P., Capitani, S., Neri, L. M. (1999). Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J Cell Biochem* **74**, 499-521.

Martín, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Durán, A., Sánchez, Y. (2000). *bgs2*$^{+}$, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* **38**, 308-21.

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

Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., Yamamoto, M. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *EMBO J* **22**, 3073-83.

Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F., Yamamoto, M. (2007). Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Mol Cell Biol* **27**, 3154-64.

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

Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**, 10857-64.

Maundrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-30.

Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* **18**, 423-34.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* **15**, 5671-81.

McManus, E. J., Collins, B. J., Ashby, P. R., Prescott, A. R., Murray-Tait, V., Armit, L. J., Arthur, J. S., Alessi, D. R. (2004). The *in vivo* role of PtdIns(3,4,5)P3 binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation. *EMBO J* **23**, 2071-82.

McMullen, J. R., Sherwood, M. C., Tarnavski, O., Zhang, L., Dorfman, A. L., Shioi, T., Izumo, S. (2004). Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* **109**, 3050-5.

Mellor, H., Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* **332 (Pt 2)**, 281-92.

Messerschmidt, A., Macieira, S., Velarde, M., Bädeker, M., Benda, C., Jestel, A., Brandstetter, H., Neuefeind, T., Blaesse, M. (2005). Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C-iota reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *J Mol Biol* **352**, 918-31.

Meyuhas, O., Hornstein, E. (2000). Translational control of TOP mRNAs. En *Translational control of gene expression,* 671-693. Cold Spring Harbor, NY.

Millar, J. B., Buck, V., Wilkinson, M. G. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* **9**, 2117-30.

Miller, R. C. (1972). Assymetric annealing of an RNA linked DNA molecule isolated during the initiation of bacteriophage T7 DNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* **49**,1082-6.

Mitchison, J. M. (1970). Methods in Cell Physiology. 4: 131. Academic Press.

Mitchison, J. M., Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. J Cell Sci* **75**, 357-76.

Mochly-Rosen, D., Gordon, A. S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* **12**, 35-42.

Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M., Alessi, D. R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 161-70.

Moreno, S., Klar, A., Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol* **194**, 795-823.

Morigasaki, S., Shiozaki, K. (2013). Phosphorelay-dependent and -independent regulation of MAPKKK by the Mcs4 response regulator in fission yeast. *Commun Integr Biol* **6**, e25020.

Moscat, J., Díaz-Meco, M. T. (2000). The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep* **1**, 399-403.

Moscat, J., Rennert, P., Díaz-Meco, M. T. (2006). PKCzeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell Death Differ* **13**, 702-11.

Mosior, M., Newton, A. C. (1996). Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry* **35**, 1612-23.

Mukai, H. (2003). The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *J Biochem* **133**, 17-27.

Mulet, J. M., Martin, D. E., Loewith, R., Hall, M. N. (2006). Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. *J Biol Chem* **281**, 33000-7.

Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **24**, 6710-8.

Nakashima, A., Otsubo, Y., Yamashita, A., Sato, T., Yamamoto, M., Tamanoi, F. (2012). Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *J Cell Sci* **125**, 5840-9.

Nakashima, A., Sato, T., Tamanoi, F. (2010). Fission yeast TORC1 regulates phosphorylation of ribosomal S6 proteins in response to nutrients and its activity is inhibited by rapamycin. *J Cell Sci* **123**, 777-86.

Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* **101**, 2353-64.

Newton, A. C. (2004). Diacylglycerol's affair with protein kinase C turns 25. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 175-7.

Newton, A. C. (2009). Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S266-71.

Newton, A. C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E395-402.

Nguyen, A. N., Ikner, A. D., Shiozaki, M., Warren, S. M., Shiozaki, K. (2002). Cytoplasmic localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 2651-63.

Nguyen, A. N., Shiozaki, K. (1999). Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev* **13**, 1653-63.

Niederberger, C., Schweingruber, M. E. (1999). A *Schizosaccharomyces pombe* gene, *ksg1*, that shows structural homology to the human phosphoinositide-dependent protein kinase PDK1, is essential for growth, mating and sporulation. *Mol Gen Genet* **261**, 177-83.

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

Oh, W. J., Wu, C. C., Kim, S. J., Facchinetti, V., Julien, L. A., Finlan, M., Roux, P. P., Su, B., Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J* **29**, 3939-51.

Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A., Suzuki, K. (1990). A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. A molecular link between autophosphorylation and down-regulation. *J Biol Chem* **265**, 6296-300.

Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., Nishizuka, Y. (1989). Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3099-103.

Ono, Y., Kurokawa, T., Kawahara, K., Nishimura, O., Marumoto, R., Igarashi, K., Sugino, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Nishizuka, Y. (1986). Cloning of rat brain protein kinase C complementary DNA. *FEBS Lett* **203**, 111-5.

Oppermann, F. S., Gnad, F., Olsen, J. V., Hornberger, R., Greff, Z., Keri, G., Mann, M., Daub, H. (2009). Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1751-64.

Orr, J. W., Newton, A. C. (1994). Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J Biol Chem* **269**, 27715-8.

Orr, N., Yavin, E., Lester, D. S. (1992). Identification of two distinct populations of protein kinase C in rat brain membranes. *J Neurochem* **58**, 461-70.

Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**, 2196-207.

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

Parekh, D., Katso, R. M., Leslie, N. R., Downes, C. P., Procyk, K. J., Waterfield, M. D., Parker, P. J. (2000). Beta1-integrin and PTEN control the phosphorylation of protein kinase C. *Biochem J* **352 (Pt 2)**, 425-33.

Parekh, D., Ziegler, W., Yonezawa, K., Hara, K., Parker, P. J. (1999). Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKCdelta and nPKCepsilon. *J Biol Chem* **274**, 34758-64.

Park, J., Hill, M. M., Hess, D., Brazil, D. P., Hofsteenge, J., Hemmings, B. A. (2001). Identification of tyrosine phosphorylation sites on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and their role in regulating kinase activity. *J Biol Chem* **276**, 37459-71.

Paul, A., Wilson, S., Belham, C. M., Robinson, C. J., Scott, P. H., Gould, G. W., Plevin, R. (1997). Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal* **9**, 403-10.

Pears, C. J., Kour, G., House, C., Kemp, B. E., Parker, P. J. (1990). Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur J Biochem* **194**, 89-94.

Pérez, P., Cansado, J. (2010). Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci* **11**, 680-92.

Pérez, P., Ribas, J. C. (2004). Cell wall analysis. *Methods* **33**, 245-51.

Petersen, J., Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol* **9**, 1263-72.

Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137**, 873-86.

Phanstiel, D. H., Brumbaugh, J., Wenger, C. D., Tian, S., Probasco, M. D., Bailey, D. J., Swaney, D. L., Tervo, M. A., Bolin, J. M., Ruotti, V., Stewart, R., Thomson, J.A., Coon J. J. (2011). Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nat Methods* **8**, 821-7.

Ponting, C. P., Ito, T., Moscat, J., Díaz-Meco, M. T., Inagaki, F., Sumimoto, H. (2002). OPR, PC and AID: all in the PB1 family. *Trends Biochem Sci* **27**, 10.

Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., Toone, W. M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H_2O_2 levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **13**, 805-16.

Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J. M., Yates, J. III., Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K. P., Powers, T. (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 14752-62.

Reiter, A., Steinbauer, R., Philippi, A., Gerber, J., Tschochner, H., Milkereit, P., Griesenbeck, J. (2011). Reduction in ribosomal protein synthesis is sufficient to explain major effects on ribosome production after short-term TOR inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **31**, 803-17.

Reyland, M. E. (2009). Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 2386-99.

Ribas, J. C., Díaz, M., Durán, A., Pérez, P. (1991). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3)beta-D-glucan. *J Bacteriol* **173**, 3456-62.

Roccio, M., Bos, J. L., Zwartkruis, F. J. (2006). Regulation of the small GTPase Rheb by amino acids. *Oncogene* **25**, 657-64.

Rodríguez-Gabriel, M. A., Russell, P. (2005). Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **4**, 1396-402.

Roelants, F. M., Torrance, P. D., Bezman, N., Thorner, J. (2002). Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol Biol Cell* **13**, 3005-28.

Roelants, F. M., Torrance, P. D., Thorner, J. (2004). Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology* **150**, 3289-304.

Ron, D., Kazanietz, M. G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* **13**, 1658-76.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1998). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Col Spring Harbor, N.Y.

Samejima, I., Mackie, S., Fantes, P. A. (1997). Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J* **16**, 6162-70.

Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* **25**, 903-15.

Sánchez-Bautista, S., Kazaks, A., Beaulande, M., Torrecillas, A., Corbalán-García, S., Gómez-Fernández, J. C. (2006). Structural study of the catalytic domain of PKCzeta using infrared spectroscopy and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *FEBS J* **273**, 3273-86.

Sánchez-Mir, L., Franco, A., Martín-García, R., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Soto, T., Gacto, M., Pérez, P., Cansado, J. (2014a). Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity mitogen- activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **34**, 2745-59.

Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Madrid, M., Viana, R. A., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P., Cansado, J. (2014b). Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS One* **9**, e88020.

Santos, J. L., Shiozaki, K. (2001). Fungal histidine kinases. *Sci STKE* **98**, re1.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**, 1296-302.

Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H., Sugiura, R. (2009). Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 2473-85.

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

Schaeffer, H. J., Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**, 2435-44.

Schmelzle, T., Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**, 253-62.

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

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

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-5.

Schonbrun, M., Kolesnikov, M., Kupiec, M., Weisman, R. (2013). TORC2 is required to maintain genome stability during S phase in fission yeast. *J Biol Chem* **288**, 19649-60.

Schonbrun, M., Laor, D., López-Maury, L., Bähler, J., Kupiec, M., Weisman, R. (2009). TOR complex 2 controls gene silencing, telomere length maintenance, and survival under DNA-damaging conditions. *Mol Cell Biol* **29**, 4584-94.

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

Shibata, H., Mukai, H., Inagaki, Y., Homma, Y., Kimura, K., Kaibuchi, K., Narumiya, S., Ono, Y. (1996). Characterization of the interaction between RhoA and the amino-terminal region of PKN. *FEBS Lett* **385**, 221-4.

Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., Buck, V., Morgan, B. A., Makino, K., 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**, 1008-22.

Shinozaki-Yabana, S., Watanabe, Y., Yamamoto, M. (2000). Novel WD-repeat protein Mip1p facilitates function of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Mol Cell Biol* **20**, 1234-42.

Shiozaki, K., Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**, 739-43.

Shiozaki, K., 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**, 2276-88.

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**, 409-19.

Shiozaki, K., Shiozaki, M., Russell, P. (1998). Heat stress activates fission yeast Spc1/StyI MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **9**, 1339-49.

Sim, A. T., Scott, J. D. (1999). Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* **26**, 209-17.

Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* **1**, REVIEWS1011.

Smith, E. M., Finn, S. G., Tee, A. R., Browne, G. J., Proud, C. G. (2005). The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J Biol Chem* **280**, 18717-27.

Soderling, T. R. (1990). Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *J Biol Chem* **265**, 1823-6.

Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Blenis, J., Hunter, T., Cantley, L. C. (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* **16**, 6486-93.

Soto, T., Beltrán, F. F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J. B., Vicente-Soler, J., Cansado, J., Gacto, M. (2002). Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem* **269**, 5056-65.

Soto, T., Núñez, A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Cansado, J. (2007). Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **153**, 1519-29.

Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P., Hall, M. N. (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell* **21**, 3475-86.

Srivastava, J., Procyk, K. J., Iturrioz, X., Parker, P. J. (2002). Phosphorylation is required for PMA- and cell-cycle-induced degradation of protein kinase Cdelta. *Biochem J* **368**, 349-55.

Steinberg, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* **88**, 1341-78.

Stempka, L., Schnölzer, M., Radke, S., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M. (1999). Requirements of protein kinase cdelta for catalytic function. Role of glutamic acid 500 and autophosphorylation on serine 643. *J Biol Chem* **274**, 8886-92.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P. T. (1998). Protein kinase B kinases

that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**, 710-4.

Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S. O., Kuno, T. (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* **424**, 961-5.

Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H., Kuno, T. (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* **399**, 479-83.

Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., Kuno, T. (1998). *pmp1*$^{+}$, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J* **17**, 140-8.

Sun, Y., Taniguchi, R., Tanoue, D., Yamaji, T., Takematsu, H., Mori, K., Fujita, T., Kawasaki, T., Kozutsumi, Y. (2000). Sli2 (Ypk1), a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Mol Cell Biol* **20**, 4411-9.

Suzuki, A., Akimoto, K., Ohno, S. (2003). Protein kinase C lambda/iota (PKClambda/iota): a PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *J Biochem* **133**, 9-16.

Tabuchi, M., Audhya, A., Parsons, A. B., Boone, C., Emr, S. D. (2006). The phosphatidylinositol 4,5-biphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol Cell Biol* **26**, 5861-75.

Takada, H., Nishida, A., Domae, M., Kita, A., Yamano, Y., Uchida, A., Ishiwata, S., Fang, Y., Zhou, X., Masuko, T., Kinoshita, M., Kakehi, K., Sugiura, R. (2010). The cell surface protein gene *ecm33*$^{+}$ is a target of the two transcription factors Atf1 and Mbx1 and negatively regulates Pmk1 MAPK cell integrity signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* **21**, 674-85.

Talarek, N., Cameroni, E., Jaquenoud, M., Luo, X., Bontron, S., Lippman, S., Devgan, G., Snyder, M., Broach, J. R., De Virgilio, C. (2010). Initiation of the TORC1-regulated G_0 program requires Igo1/2, which license specific mRNAs to evade degradation via the 5'-3' mRNA decay pathway. *Mol Cell* **38**, 345-55.

Tatebe, H., Shiozaki, K. (2010). Rab small GTPase emerges as a regulator of TOR complex 2. *Small GTPases* **1**, 180-2.

Taylor, S. S., Buechler, J. A., Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**, 971-1005.

Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* **2**, 345-55.

Tee, A. R., Blenis, J., Proud, C. G. (2005). Analysis of mTOR signaling by the small G-proteins, Rheb and RhebL1. *FEBS Lett* **579**, 4763-8.

Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R., 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**, 6752-64.

Toda, T., Shimanuki, M., Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J* **12**, 1987-95.

Toker, A., Newton, A. C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* **103**, 185-8.

Torres, J., Di Como, C. J., Herrero, E., De La Torre-Ruiz, M. A. (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* **277**, 43495-504.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 205-15.

Urano, J., Sato, T., Matsuo, T., Otsubo, Y., Yamamoto, M., Tamanoi, F. (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 3514-9.

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J. R., De Virgilio, C., Hall, M. N., Loewith, R. (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell* **26**, 663-74.

Uritani, M., Hidaka, H., Hotta, Y., Ueno, M., Ushimaru, T., Toda, T. (2006). Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes Cells* **11**, 1367-79.

Valbuena, N., Rozalén, A. E., Moreno, S. (2012). Fission yeast TORC1 prevents eIF2α phosphorylation in response to nitrogen and amino acids via Gcn2 kinase. *J Cell Sci* **125**, 5955-9.

Vannini, A., Ringel, R., Kusser, A. G., Berninghausen, O., Kassavetis, G. A., Cramer, P. (2010). Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell* **143**, 59-70.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., Koonin, E. V., Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-5.

Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., 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 USA* **94**, 13804-9.

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

Villar-Tajadura, M. A., Coll, P. M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B., Pérez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol Microbiol* **70**, 867-81.

Wall, N. R., Mohammad, R. M., Reddy, K. B., Al-Katib, A. M. (2000). Bryostatin 1 induces ubiquitination and proteasome degradation of Bcl-2 in the human acute lymphoblastic leukemia cell line. *Int J Mol Med* **5(2)**, 165-71.

Wang, X., Beugnet, A., Murakami, M., Yamanaka, S., Proud, C. G. (2005). Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* **25**, 2558-72.

Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R., Proud, C. G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* **20**, 4370-9.

Wang, Y., Wang, Y., Zhang, H., Gao, Y., Huang, C., Zhou, A., Zhou, Y., Li, Y. (2015). Sequential posttranslational modifications regulate PKC degradation. *Mol Biol Cell* **27(2)**, 410-20.

Warbrick, E., Fantes, P. A. (1991). The wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **10**, 4291-9.

Weisman, R., Choder, M. (2001). The fission yeast TOR homolog, *tor1*$^{+}$, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *J Biol Chem* **276**, 7027-32.

Weisman, R., Roitburg, I., Schonbrun, M., Harari, R., Kupiec, M. (2007). Opposite effects of *tor1*$^{+}$ and *tor2*$^{+}$ on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics* **175**, 1153-62.

Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2289-301.

Wissing, J., Jansch, L., Nimtz, M., Dieterich, G., Hornberger, R., Keri, G., Wehland, J., Daub, H. (2007). Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **6**, 537-47.

Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-84.

Xu, Z. B., Chaudhary, D., Olland, S., Wolfrom, S., Czerwinski, R., Malakian, K., Lin, L., Stahl, M. L., Joseph-McCarthy, D., Benander, C., Fitz, L., Greco, R., Somers, W. S., Mosyak, L. (2004). Catalytic domain crystal structure of protein kinase C-theta (PKCtheta). *J Biol Chem* **279**, 50401-9.

Yamamoto, A., Imai, I., Watanabe, Y. (1997). Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe. Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 1035-106.

Yang, C., Kazanietz, M. G. (2003). Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 602-8.

Yoshida, K. (2007). PKCdelta signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. *Cell Signal* **19**, 892-901.

Yoshinaga, C., Mukai, H., Toshimori, M., Miyamoto, M., Ono, Y. (1999). Mutational analysis of the regulatory mechanism of PKN: the regulatory region of PKN contains an arachidonic acid-sensitive autoinhibitory domain. *J Biochem* **126**, 475-84.

Young, S., Parker, P. J., Ullrich, A., Stabel, S. (1987). Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem J* **244**, 775-9.

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

Zhang, H., Cicchetti, G., Onda, H., Koon, H. B., Asrican, K., Bajraszewski, N., Vazquez, F., Carpenter, C. L., Kwiatkowski, D. J. (2003). Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J Clin Invest* **112**, 1223-33.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., Hall, M. N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* **144**, 757-68.