



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**Caracterización de la función de PP2A en la
morfogénesis de *Schizosaccharomices pombe***

TESIS DOCTORAL

Manuel Bernal Muñoz
2013

El Dr. **Rafael Rodríguez Daga**, profesor titular de Genética de la Universidad Pablo de Olavide,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por el licenciado **Manuel Bernal Muñoz** titulado **“CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE PP2A EN LA MORFOGÉNESIS DE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE”** ha sido realizado íntegramente por él bajo la mi dirección y supervisión, y reúne las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expido el presente certificado.

Rafael Rodríguez Daga

Índice

1. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*
 - 1.1 Origen e historia
 - 1.2 *S. pombe* como organismo modelo
 - 1.3 Ciclo de vida vegetativo y sexual

2. Crecimiento polarizado y morfogénesis
 - 2.1 Polaridad celular
 - 2.1.1 Crecimiento polarizado: establecimiento y mantenimiento de la polaridad en las células de *S. pombe*
 - 2.1.2 Citoesqueleto en las células de *S. pombe*
 - a) Citoesqueleto de microtúbulos
 - b) Citoesqueleto de actina: cables, parches y anillo
 - 2.2 Morfogénesis
 - 2.3 La superfamilia de las Ras GTPasas
 - 2.3.1 Clasificación y características generales
 - 2.3.2 Las GTPasas de la familia Rho GTPasas
 - a) Clasificación y funciones biológicas
 - b) Regulación de las Rho GTPasas
 - c) GTPasas y polaridad celular en *S. cerevisiae*
 - d) Actividad CDK y el control temporal de la polaridad celular
 - 2.3.3) La GTPasas Cdc42 como proteína central del crecimiento polarizado

3. Fosfatasa
 - 3.1 Características y clasificación
 - 3.2 La proteína fosfatasa de tipo 2A: PP2A
 - 3.2.1 Mecanismo de acción del complejo de PP2A
 - 3.2.2 Estructura y actividad del complejo de PP2A por parte del activador PTPA
 - a) Superficie de contacto entre PTPA y PP2A
 - b) La actividad ATPásica de PTPA
 - 3.2.3 Mecanismos e regulación de PP2A
 - a) Mediante modificaciones posttraduccionales
 - b) Asociación con otras proteínas: formación de complejos holoenzimáticos
 - 3.3 Mecanismo de acción de PP2A en *S. cerevisiae*
 - 3.4 Elementos constituyentes del complejo de PP2A en *S. pombe*

I. INTRODUCCIÓN

1. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

1.1 Origen e historia

EL organismo usado para la realización de este trabajo es un hongo unicelular perteneciente al filo Ascomycota que se denomina *Schizosaccharomyces pombe*. Fue aislada por primera vez en 1893 por Patrick Lindner a partir de una cerveza de mijo que se realizaba en África. El nombre científico de esta levadura hace referencia al género al que pertenece, *Saccharomyces*; y al tipo de división mediante fisión que presenta esta levadura, *Schizo*. Mientras que el nombre *pombe* hace referencia a la cerveza realizada en las zonas locales en las que se aisló por primera vez.

La mayor parte de las cepas usadas hoy en día en los laboratorios de investigación proceden de un aislamiento de *S. pombe* por A. Osterwalder en 1921 a partir de un concentrado de mosto. No fue hasta la década de los 40 cuando Urs Leupold realizó la primera caracterización de esta levadura y la utilizó como organismo para estudios genéticos. Posteriormente, Murdoch Mitchison la utilizó para sus estudios de crecimiento y división celular. Ya en la década de los 70 Paul Nurse fue capaz de combinar por primera vez los estudios genéticos realizados por Leupold con los realizados en el grupo de M. Mitchinson; convirtiendo a esta levadura en un gran organismo modelo; utilizado hoy en día en gran cantidad de laboratorios para estudiar procesos celulares básicos.

1.2 *S. pombe* como organismo modelo

S. pombe se ha convertido en las últimas décadas en una importante referencia como organismo modelo eucariota debido a su facilidad de crecimiento en el laboratorio; y al desarrollo de nuevas herramientas, en el campo de la biología molecular y la biología computacional.

Señalar que su morfología y su patrón de división son muy característicos, proporcionando un buen modelo para el estudio de morfogénesis y de crecimiento polarizado (Chang F, *et al* 2001).

Esta levadura tiene repartido su material genético en tres cromosomas; y no hace muchos años que se obtuvo la secuencia completa de su genoma; 13,8 Mb organizado en 3 cromosomas, I (5,7 Mb), II (4,6 Mb) y III (3,5 Mb); que codifican para 4.824 genes, (Wood *et al*, 2002). Esto, junto con el corto tiempo de generación que tiene entre 2 y 4 horas; y su fácil manejo en el laboratorio, junto con la elevada eficiencia de transformación; y su alta frecuencia de recombinación homóloga que presenta, hace de *S. pombe* un organismo fácilmente manipulable desde el punto de vista genético. Proporcionando una gran herramienta para generar la expresión de proteínas recombinantes, la expresión diferencial de genes o el marcaje de proteínas con epítomos que nos permita visualizar las proteínas en el microscopio, purificarlas, etc.

1.3 Ciclo de vida vegetativo y sexual

Durante el crecimiento vegetativo *S. pombe* presentan una forma cilíndrica, con una longitud media entre 12 y 14 μm , en el momento de comenzar la división celular; y una anchura entre 3 y 4 μm . Las células de *S. pombe* crecen por extensión de las puntas y se divide mediante un proceso de fisión medial; generando dos células hijas de idéntico tamaño. Éstas experimentan cambios en la polarización celular durante su progresión por el ciclo celular, el cual también se denomina ciclo mitótico vegetativo.

Las células presenta un patrón de crecimiento característico; y tras la división, las células hijas resultantes empiezan a crecer por uno de sus polos, denominado polo viejo o sitio en el que la célula estaba creciendo en la anterior división. Después de completar fase S, en un momento aún no muy bien definido en G2 se inicia el crecimiento por el otro extremo, denominado polo nuevo, dicho extremo es generado por la división celular. Este crecimiento por ambos extremos se mantendrá hasta la entrada en mitosis, garantizando así un tamaño mínimo que permita un reparto satisfactorio de las masas de ADN entre las dos células hijas. Dicha transición, de crecimiento monopolar a crecimiento bipolar, se denomina NETO (**New End Take Off**) (May JW, *et al* 1995 y Mitchison JM, *et al* 1985) este mecanismo molecular no se encuentra muy conocido (Kume K, *et al* 2011 y Martin SG, *et al* 2005). Cuando las

células entran en mitosis la maquinaria de crecimiento se concentra en la región medial de la célula donde se produce el ensamblaje del anillo de actomiosina. La contracción del mismo va aparejado con la finalización de la mitosis; y se encuentra coordinado con la síntesis de nueva membrana y pared celular que posibilita la formación del septo, produciendo separación de las dos células hijas.

Tras el agotamiento de los nutrientes del medio que le rodea se produce una entrada de las células en fase estacionaria. Este estacionamiento se puede producir en G1, si se detecta una falta de nitrógeno; o se puede producir en G2, si se detecta una falta de carbono (Costello *et al* 1986). En este momento, las células pueden adquirir un estado de latencia, denominado G0, o pueden iniciar un proceso de reproducción sexual. Para que la diferenciación sexual se lleve a cabo se necesita una población en la que se encuentren presentes los dos sexos compatibles, conocidos como h^+ y h^- . Las cepas de *S. pombe* en estado silvestre son homotálicas, de esta manera se garantiza que en una misma cepa se encuentre individuos de ambos sexos; y se pueda producir el proceso diferenciación sexual. Las células del sexo opuesto se reconocen mediante el uso de feromonas liberadas al medio. Seguidamente se produce la elongación de las células hacia la dirección donde se ha producido la liberación de feromonas por parte del sexo contrario, este proceso se conoce con el nombre de “shmooing”. De esta manera se posibilita la fusión de ambas células; y seguidamente se produce la fusión de los núcleos, cariogamia. Dando como resultado la formación de un cigoto diploide, este fenómeno se conoce con el nombre de conjugación o mating. Si en este momento del ciclo sexual las condiciones nutricionales mejoran, el cigoto puede mantenerse en un ciclo de vida mitótico diploide y empezar a esporular si las condiciones ambientales vuelven a ser desfavorables.

Dado que en *S. pombe* los cigotos son muy poco estables, lo normal es que mediante un proceso de meiosis el cigoto diploide de lugar a 4 ascosporas haploides. Las esporas son estructuras de resistencia que son liberadas al medio, pero sólo germinan cuando las condiciones ambientales son favorables (Yamamoto *et al* 1997).

2. Crecimiento polarizado y morfogénesis

2.1 Polaridad celular

La polaridad celular es el resultado del transporte vectorial de factores que determinan la organización celular interna y se observa en la mayoría de las células eucariotas diferenciadas. Se define por dos propiedades fundamentales: la acumulación asimétrica de componentes móviles (a menudo moléculas reguladoras) entre polos opuestos de la célula y la organización orientada de filamentos polares del citoesqueleto (citoesqueletos de actina y microtúbulos) a lo largo del eje de polaridad; todo ello producido en respuesta a señales intra y extracelulares (Drubin DG, *et al* 1996 y Nelson WY, *et al* 2003). Estas propiedades coexisten en la mayoría de las células polarizadas y la interacción de ambas es crucial para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular (Li R, *et al* 2008 y Chang F, *et al* 2003). La alteración de la polaridad tiene un impacto directo sobre la morfogénesis, la virulencia de hongos patógenos, la migración, o la adhesión celular y en mamíferos está asociada con defectos durante el desarrollo y la malignidad de ciertos tumores (Wodarz *et al*, 2007).

Mucho de los genes que regulan la polaridad celular se encuentran conservados en la evolución por lo que el estudio en un organismo, aparentemente más simple como es la levadura *S. pombe*, podría ser extrapolable para entender procesos similares en células eucariotas superiores.

2.1.1 Crecimiento polarizado: establecimiento y mantenimiento de la polaridad en las células de *S. pombe*

Así como en otras células eucariotas, la polarización en la levadura de fisión depende tanto del citoesqueleto de microtúbulos como del de actina (Chang F, *et al* 2009; Siegrist SE, *et al* 2007 y Verde F, *et al* 1995). En la levadura de fisión la polarización del citoesqueleto de actina, similar al que presentan las levaduras de gemación; su polimerización es dependiente de proteínas estructurales y de la activación de la GTPasa Cdc42. Ambas cosas son esenciales para la formación y

establecimiento de las zonas de crecimiento y responsable de forma cilíndrica que presenta la célula (Chang EC, *et al* 1994, Miller PJ, *et al* 1994 y Pruyne D, *et al* 2004); teniendo en cuenta que los microtúbulos se encargan de marcar en primer lugar las zonas de crecimiento de crecimiento activo; y esto sirve de control para la deposición de la actina en dichas zonas, posibilitando el mantenimiento del crecimiento polarizado en dichas zonas (Chang F, *et al* 2009; Mata J, *et al* 1997; Sawin KE, *et al* 1998).

Los microtúbulos se encargan de depositar factores de polaridad, generando así zonas activas de crecimiento. Entre esos factores de polaridad cabe destacar la proteína Tea1 y el complejo Tea4/Wsh3. La proteína Tea1 se ancla a la membrana mediante la unión con la proteína receptora Mod5 (Snaith *et al* 2003); produciendo la reclusión de los componentes el polarisoma a las puntas; produciéndose la reclusión de la kinasa Pom1 al sitio activo de crecimiento y la activación de la formina For3, responsable de la nucleación de cables de actina (Martin SG, *et al* 2005; Martin SG, *et al* 2007; Mata J, *et al* 1997; Bahler J, *et al* 2001; Bahler J, *et al* 1998; Feirbach B, *et al* 2001; Feirbach B, *et al* 2004 y Tatebe H, *et al* 2005). La actividad de For3 se encuentra controlada por las interacciones autoinhibitorias entre los dominios DID, presente en la región N-terminal y el dominio DAD, presente en la región C-terminal de la proteína (Good BL, *et al* 2007). En las levaduras de fisión, la completa activación de For3 se consigue mediante la unión de Cdc42 a la región N-terminal y la correspondiente unión de Bub6 al dominio DAD de la región C-terminal de la proteína, revertiendo la conformación autoinhibitoria de For3 (Faix *et al* 2006; Wallar *et al* 2003 y Martin SG, *et al* 2007). Cdc42 se une a la proteína Pob1; y es también requerida para la localización de For3 en las puntas (Rincon SA, *et al* 2009).

La nucleación de los cables de actina mediante forminas actúa como atractor hacia las zonas activas de crecimiento activo, a lo largo de la cual las vesículas del exocisto son transportadas por la miosina-V hacia los sitios donde se produce la nucleación de los cables de actina (Pruyne DW, *et al* 1998 y Pruyne DW, *et al* 2004), fusionándose estas vesículas a la membrana plasmática mediante la asociación con los elementos del exocisto. Dependiendo así la localización de los mismos a las zonas

activas de crecimiento de la presencia previa de cables de actina y de la activación de Cdc42 (Bendezu FO, *et al* 2011 y Estravis M, *et al* 2011).

Por lo tanto, Cdc42 es requerido para la nucleación de filamentos de actina mediante la activación de la formina For3 y también para el reclutamiento de componentes del exocisto a las zonas activas de crecimiento (Martin SG, *et al* 2007, Bendezu FO, *et al* 2011 y Estravis M, *et al* 2011). La cantidad de Cdc42 activo se encuentra regulado por la unión de GTP a la GTPasa, esta regulación se lleva a cabo por los GEFs (**Guanine nucleotide Exchange Factors**) y los GAPs (**GTPase Activating Proteins**) (Estravis M, *et al* 2011). Se conocen dos GEFs para Cdc42, Scd1 y Gef1, ambos tienen una localización en las puntas (Chang F, *et al* 2003; Chang EC, *et al* 1994 e Hirota K, *et al* 2003); mientras que el único GAP que se conoce se denomina Rga4 y localiza en las regiones laterales y en la zona del septo (Tatebe H, *et al* 2008). Rga4 se encuentra excluido de las puntas mediante un proceso en el que se requiere la kinasa Pom1, preservando así a las células de un crecimiento ectópico (Hirota K, *et al* 2003; Tatebe H, *et al* 2008; Das M, *et al* 2007 y Kelly FD, *et al* 2011).

La NDR kinasa Orb6 restringe espacialmente el crecimiento a las puntas mediante la correcta localización de Gef1 a las puntas. Rga4 es también requerido para la correcta localización de For3 y para la organización del citoesqueleto de actina (Das M, *et al* 2009). Además del control espacial de la actividad de Cdc42, también hay que señalar la regulación temporal de los GEFs y los GAPs mediante la actividad de Cdk1, produciéndose así una coordinación entre crecimiento polarizado y la progresión con el ciclo celular (Moseley JB, *et al* 2009; McCusker D, *et al* 2007 e Yoshida S, *et al* 2008). Una vez establecido la polaridad celular, se produce un mecanismo de feedback para el mantenimiento de la misma en las puntas.

2.1.2 Citoesqueleto en las células de *S. pombe*

a) Citoesqueleto de microtúbulos

En *S. pombe*, como en células animales, los microtúbulos (MTs) son esenciales para el establecimiento de la polaridad celular (Sawin *et al*, 1998). En esta levadura los

MTs se encuentran organizados desde la región perinuclear en 3-5 haces antiparalelos que se extiende desde el centro de la célula hacia los extremos. Una vez que los MTs contactan con el córtex permanecen en contacto con él durante algún tiempo antes de retraerse por despolimerización hacia el sitio de nucleación (Niccoli *et al* 2003; Sawin *et al* 2004; Snaith *et al*, 2005, Drummond *et al*, 2000 y Tran *et al*, 2001). Este proceso es muy dinámico, ocurre cada 2-3 minutos y tienen una enorme repercusión en la morfogénesis de la levadura porque regula el posicionamiento del núcleo (Daga R, *et al* 2006 y Tran *et al* 2001) que posteriormente determinará el futuro plano de división (Daga R, *et al* 2005).

Los MTs también juega un papel fundamental en el posicionamiento del huso mitótico (Daga R, *et al* 2008 y Vogel *et al* 2007) y el transporte vectorial de factores de polaridad que son depositados en los extremos de la células y que contribuyen al establecimiento de la polaridad celular (Mata J, *et al* 1997; Daga *et al* 2006 y Martin SG, *et al* 2005).

b) Citoesqueleto de actina: cables, parches y anillo

El citoesqueleto de actina en las células de *S. pombe* tiene un papel fundamental en el crecimiento polarizado y en la división celular. El citoesqueleto de actina se organiza en tres tipos de estructuras diferentes: parches, cables y anillo (Marks *et al* 1985).

Los parches de actina son filamentos muy cortos y ramificados localizados en la zona del cortex celular. Asociados al crecimiento polarizado en los extremos donde los procesos de endocitosis tienen una función fundamental; y en la zona medial cuando la célula entra en mitosis (Arellano, *et al* 1997; Balasubramanian, *et al* 1998 y Gachet *et al* 2005).

Los cables de actina se extienden a lo largo del eje longitudinal de células interfásicas, responsables del transporte vectorial de vesículas y otros componentes celulares hacia las zonas de crecimiento en los extremos. La polimerización de los cables de actina se produce en los extremos más próximos a los polos. Estos son

ensamblados por la formina For3 (Feierbach *et al* 2001; Kamasaki *et al* 2005 y Nakano *et al* 2002). La ausencia de este tipo de cables interfásicos no son esenciales para la viabilidad celular, como se puede ver en las células del mutante *for3*. Estas estructuras sirven para las miosinas de tipo V (Myo52) pueden transportar las vesículas secretoras a las zonas activas de crecimiento (Motegi *et al* 2001).

El anillo de actomiosina es una estructura formada por filamentos de actina y miosina de tipo II; y es esencial para la división celular. Su ensamblaje se produce en la región medial de la célula y su contracción se encuentra coordinada con la formación de nueva pared y membrana necesaria para generar dos células independientes (Balasubramanian *et al* 2004).

2.2 Morfogénesis

En las de células de *S. pombe* la ruta MOR (**Morphogenesis Orb6 Network**) se encarga de controlar la morfología celular y el crecimiento polarizado mediante el establecimiento y mantenimiento de los cables de actinas en los extremos en células interfásicas (Verde F, *et al* 1998 y Kanai M, *et al* 2005). Esta ruta se encuentra constituida fundamentalmente por dos kinasas Nak1, STE20-like kinasa (**Sterile 20**) /GCK (**Germinal Center Kinase**), y Orb6, NDR kinasa, (**Nuclear Dbf2-Related**). Así como unas proteínas activadoras que se encargan de controlar su actividad, denominadas Pmo25 y Mob2, respectivamente; y todas ellas unidas a una proteína estructural denominada Mor2. Algunos de estos elementos presentan una localización diferencia, entre el SPB (**Spindle Pole Body**), y los sitios activos de crecimiento (el septo y los polos celulares) en función del estadio del ciclo en el que se encuentren, en los cuales se asociaran con determinadas proteínas facilitando o evitando que se produzca una activación de las dos kinasas esenciales de esta ruta; y sobre las que recaen todas las funciones efectoras (Goshima T, *et al* 2010; Ray S, *et al* 2010; Kume K, *et al* 2007 y Kanai M, *et al* 2005). Como última estancia se produce la activación de la GTPasa Cdc42 mediante la activación/inactivación de sus reguladores (GEFs y GAPs), que se encarga de mantener un crecimiento polarizado y coordinado con el ciclo celular

mediante el transporte a través del citoesqueleto de actina (Coll PM, *et al* 2003; Perez P, *et al* 2010; Estravis M, *et al* 2011 y Estravis M, *et al* 2012).

La ruta de morfogénesis se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariotas, desde levaduras hasta organismos superiores como pueden ser la mosca o los mamíferos (Gupta S, *et al* 2011). En la levadura de gemación *S. cerevisiae* la ruta que controla los procesos de morfogénesis se denomina RAM (**R**egulation of **A**ce2p and **M**orphogenesis) (Maerz S, *et al* 2010). El factor de transcripción Ace2 desencadena la activación de los genes implicados en la separación celular (Weiss EL, *et al* 2002). En *Drosophila melanogaster* la ruta de morfogénesis recibe el nombre de ruta Hippo, esta se encuentra constituida por otro módulo de dos kinasas denominadas Hpo, ortólogo a Nak1; y Trc, ortólogo a Orb6 (Harvey KF, *et al* 2012 y Gupta S, *et al* 2011). Estudios realizados en células de mamíferos revelan que las kinasas Mst3 y Ndr1/2 tienen funciones homólogas a las descritas para la ruta Hippo en *Drosophila* (Yu FX, *et al* 2013 y Avruch J, *et al* 2012).

En las células de *S. pombe* también podemos encontrar otra ruta cuyo núcleo central se encuentra constituido por una STE-20 like kinasa, Sid1; y una NDR kinasa, Sid2. Esta se conoce con el nombre de ruta SIN (**S**eptation **I**nitiation **N**etwork), ésta es activada durante mitosis y desempeña el papel esencial en citokinesis, posibilitando la correcta contracción del anillo de actomiosina y produciendo una correcta separación generando dos células hijas independientes. Esta cascada de señalización se encuentra controlada en sus inicios por la GTPasa Spg1, que se encarga de controlar a la kinasa Cdc7, a Sid1 (STE-20 like kinase) y Sid2 (NDR kinase) (Krapp A, *et al* 2008 y Daga R, *et al* 2005). La gran mayoría de los componentes de la ruta SIN localizan exclusivamente en el SPB (Krapp A, *et al* 2008), con excepción de la kinasa Sid2, la cual cuando es activada por Sid1 en el SPB es capaz de translocarse hasta el anillo, donde promueve el ensamblaje y contracción del anillo de actomiosina, así como la formación del septo de división (Sparks CA, *et al* 1999).

Existe una clara interconexión entre los elementos de la ruta SIN y la ruta MOR (Ray S, *et al* 2010 y Lahoz A, *et al* 2010). Los elementos principales de ambas rutas se

encuentran muy conservados en los eucariotas superiores, así como su mecanismo de acción y de regulación (Gupta S, *et al* 2011). Ambas rutas, tienen un nexo común en su inicio, pero una coordinación antagónica necesaria para la coordinación de la citoquinesis (separación celular) y el control de la polaridad celular. Toda la ruta de señalización en las células de *S. pombe* empieza tras la activación que la GTPasa realiza sobre la kinasa Cdc7 en el SPB. Esta se encarga de activar a la STE-20 like kinasa Sid1 y esta desencadena una bifurcación de la señal. Podemos decir que el complejo Cdc7-Sid1 actúa de dos maneras diferentes, por un lado estimula la formación del septo, esta vía se produce a partir de la activación que Cdc7-Sid1 realiza sobre la NDR kinasa Sid2, esta señal de activación precede de ambos SPBs. Mientras que por otro lado se encuentra regulando la localización de los componentes de la ruta MOR, esta regulación es independiente de la kinasa Sid2 (Goshima T, *et al* 2010).

Este control de la ruta MOR mediante la activación de Cdc7-Sid1 se realiza mediante una localización subcelular diferenciada de Pmo25. Esta proteína se une a la kinasa Nak1; y actúa por encima de la kinasa Orb6 en la ruta MOR, controlando su activación. Pmo25 se localiza, específicamente durante mitosis, en los SPBs; y tras la finalización de la misma se relocaliza en la zona de septación, donde forma un complejo con la kinasa Nak1; y ambas se asocian para activar a Orb6. Así que tanto la localización de Pmo25 como en última instancia la activación de la NDR Orb6 depende de la activación de Cdc7-Sid1 cuya señal parte de ambos SPBs (Goshima T, *et al* 2010; Kume K, *et al* 2007; Mendoza M, *et al* 2005 y Kanai M, *et al* 2005). Es el único componente de la ruta de MOR que tiene una localización determinada por la activación del complejo Cdc7-Sid1 de la cascada de señalización de la ruta SIN. También cabe destacar el papel que juega la kinasa Ppk11 (GCK), ya que esta juega un papel importante en la acumulación de Pmo25 en la región medial de la célula (Goshima T, *et al* 2010). La ausencia de Ppk11 en mutantes de la ruta MOR agrava los defectos morfogénesis que presentan estas células. La kinasa Ppk11 tiene un papel auxiliar, pero independiente en los procesos de separación y control de la polaridad celular a altas temperaturas (Goshima T, *et al* 2010). Esta presenta un dominio MBM (**MO25 Binding Motif**) en la región C-terminal con el cual interacciona Pmo25, con el cual se posibilita el acúmulo de dicha proteína en la región medial. Este dominio se

encuentra presente en las otras dos GCK que existen en *S. pombe*, Sid1 y Nak1, jugando Pmo25 un papel esencial y siendo el nexo de unión entre la ruta SIN y MOR en *S. pombe* (Goshima T, *et al* 2010).

INTERCONEXIÓN ENTRE LA RUTA SIN Y MOR EN *S. pombe* COMO MECANISMO DE REGULACIÓN

Se ha demostrado que la activación constitutiva de la ruta SIN bloquea el crecimiento polarizado y produce una septación descontrolada (Minet M, *et al* 1979). Cuando se produce la inactivación del GAP de Spg1, Cd16 mediante el uso de un mutante termosensible, *cdc16-116*, se produce una inhibición del crecimiento polarizado en las células de *S. pombe*, las cuales no experimentan un incremento de su tamaño celular, pero si un incremento de su diámetro. Otro aspecto a tener en cuenta de los mutantes de la ruta MOR, además de la desorganización del citoesqueleto de actina, es el bloqueo que presentan las células en G2. Este arresto es independiente de Wee1 (Hirata D, *et al* 2002), mientras que una inhibición de la kinasa Cdc2 impide la progresión en G2/M. Por lo tanto alteraciones en ambas rutas pueden inhibir el crecimiento polarizado, así como la división celular. El bloqueo del crecimiento celular no es una consecuencia indirecta del bloqueo realizado en la división; ya que la activación ectópica de la ruta SIN mimetiza la ausencia de la activación de la ruta MOR. Finalmente, la reducción de la actividad de la ruta MOR se traducía en un decrecimiento de la actividad Orb6. Con todos estos resultados se puede concluir que la activación de la ruta SIN previene el crecimiento polarizado, incluso en células interfásicas, mediante la reducción de la actividad kinasa de la NDR kinasa Orb6 en la ruta MOR (Ray S, *et al* 2010).

Para que la ruta MOR estuviese activa la pareja formada por Pmo25-Nak1 se tiene que asociar a la kinasa Orb6 para modular su activación (Kanai M, *et al* 2005). Para comprobar la asociación entre ambas kinasas Nak1-Orb6 el elemento regulado por la ruta SIN para inhibir el crecimiento polarizado en células interfásicas, se realizó una proteína quimérica entre Nak1/Orb6, que posibilitaba siempre esta unión y se expresó en unas células donde estaba activa la ruta SIN. Esta construcción fue capaz de

baipasear los efectos inhibitorios que realizaba la ruta SIN sobre el crecimiento celular, también eran capaces de superar el bloqueo en la división celular (Ray S, et al 2010).

También es importante destacar que la proteína Mor2 es requerida para la actividad kinasa de Orb6, pero no para la actividad kinasa de Nak1, ya que esta mantiene los niveles constante a lo largo de todo el ciclo celular (Leonhard K, et al 2005). Sugiriendo la idea que la función de proteína estructural que tiene Mor2, promueve la activación de Orb6 mediante la activación de Nak1 (Kanai M, et al 2005; Cong J, et al 2001 y Du LL, et al 2002). Consistente con esta idea la proteína quimérica Nak1-Orb6 también fue capaz de rescatar al mutante *mor2* (Ray S, et al 2010).

Este mecanismo de interconexión y coordinación entre procesos antagónicos como es el caso de la división celular y el crecimiento polarizado se encuentra altamente conservados en los eucariotas superiores realizando funciones parecidas (Cornils H, et al 2011 y Hergovich A, et al 2006). En *Drosophila melanogaster*, las NDR kinasas, Trc (ortóloga a Orb6) y Wts (ortóloga a Sid2) presentan funciones opuestas en la regulación de la morfología de las células que constituyen el ala (Fang X, et al 2010). En organismos superiores como es el caso de los mamíferos el equivalente a la ruta SIN y MOR son MST1/2-LAT1/2 y MST3-NDR1/2, respectivamente; y presentan efectos opuestos en la proliferación celular (Cornils H, et al 2011; Visser S, et al 2010 y Hergovich A, et al 2008).

Estudios recientes han demostrado que el ácido okadaico es un potente activador de la ruta Hippo en cultivos de células de mamíferos (Hata Y, et al 2013). El ácido okadaico es un potente inhibidor de la actividad fosfatasa de PP1 y PP2A. Se ha demostrado que la regulación de la actividad kinasa MST1/2 (STE-20 like kinasa) se encuentra regulado por el ácido okadaico; siendo entonces PP2A un regulador negativo de la ruta Hippo en mamíferos (Hata Y, et al 2013). La dimerización que sufren las kinasas MST1/2 facilita la autofosforilación que se desencadena su activación. Cuando las células son crecidas en condiciones restrictivas de suero Raf-1 interfiere con MST2, en estado de dimerización, y recluta a PP2A para defosforilarla (O'Neill E, et al 2004). Opuestamente MST2 mantiene unos niveles constantes de expresión de la fosfatasa

PP2A; y ésta se encarga de revertir la fosforilación inhibitoria en la Ser-259 de Raf-1, que hace mantener la activación de la misma (Kilili GK, *et al* 2010). En general, la inhibición de PP2A por ácido okadaico se encarga de suprimir los efectos inhibitorios de Raf-1 sobre la kinasa MST2. En los últimos años se han realizado masivos experimentos de inmunoprecipitación de componentes de la ruta Hippo y su posterior identificación mediante espectrometrías de masas, así como estudios genéticos que han puesto de manifiesto el papel que juega PP2A como regulador negativo de ruta Hippo tanto en *Drosophila* como en mamíferos (Ribeiro PS, *et al* 2010). Gracias a estudios como estos se ha encontrado que el regulado dRASSF de *Drosophila* promueve la asociación del complejo de PP2A a la ruta Hippo. En contraposición, en células de mamíferos, el ortólogo de dRASSF, RASSF1A libera la asociación de la kinasa MST2 de la asociación con Raf-1 y contrarresta la defosforilación que sufre MST2 promoviendo su estado autofosforilación (activación), (Matallanas D, *et al* 2007 y Guo C, *et al* 2011). Esto sugiere que el activador RASSF en *Drosophila* y en mamíferos trabaja de manera diferente.

2.3 La superfamilia de las Ras GTPasas

Las GTPasas son pequeñas moléculas monoméricas, entre 20 y 40 kDa, que se encuentran altamente conservadas en todas las células eucariotas; y que presenta un importante grado de similitud con las subunidad α de las proteínas G heterotriméricas (Hughes *et al* 1983 y Wennerberg *et al* 2005).

Estas proteínas realizan funciones muy diversas e importantes entre las que podemos destacar remodelación del citoesqueleto, participa en la polaridad celular y en cascadas de señalización celular. Así como en las rutas de tráfico vesicular, expresión génica y progresión del ciclo celular (Bustelo *et al* 2007; Garcia *et al* 2006; Jaffe *et al* 2005; Iden *et al* 2008; Park *et al* 2007; Heasman *et al* 2008 y Estravís M, *et al* 2012).

Los miembros de esta superfamilia tienen gran capacidad de unir nucleótidos de guanina. Cuando se encuentra unido a GTP, las GTPasas se encuentran activas y son

capaces de unirse y activar a gran cantidad de moléculas efectoras. Cuando se produce la activación de la actividad intrínseca GTPasa, se produce la hidrólisis de la molécula de GTP, dando lugar a GDP y a una molécula de fosfato inorgánico (Bourne *et al* 1991). Cuando la GTPasa se encuentra unida a una molécula de GDP se encuentra inactiva.

2.3.1 Clasificación y características generales

Los miembros de esta superfamilia se denominan con el nombre de superfamilia Ras. El nombre proviene de la primera proteína descrita, el oncogén Ras humano (Parada *et al* 1982). Dentro de esta superfamilia encontramos 5 grandes familias, agrupadas por similitudes en su secuencia y por realizar una serie de funciones específicas en cada caso.

- **Ras (*Ras sarcoma*)**. Esta familia de proteínas se encuentran implicadas en funciones de proliferación y diferenciación celular (Wennerber *et al* 2005). Alteraciones en estas proteínas pueden desencadenar procesos de oncogénesis.
- **Rho (*Ras homologous*)**. Los miembros de esta familia están implicadas en cascadas de señalización celular, afectando así a multitud de procesos como la organización del citoesqueleto de actina, la progresión en el ciclo celular o el tráfico de membranas, entre otras muchas. Entre los miembros de esta familia podemos distinguir tres subfamilias diferentes: RhoA, Rac1 y Cdc42.

RhoA se encuentra implicada en la formación de fibras de estrés de actina así como en el ensamblaje de focos de adhesión. Rac1 se encarga de promover la formación de estructuras en las que está implicada una fuerte remodelación y orientación del citoesqueleto, como son los lamelipodios, y el “ruffling” de la membrana. Cdc42 se encarga de promover la formación de filopodios (Arellano *et al* 1999; Heasman *et al* 2008; Iden *et al* 2008; Jaffe *et al* 2005; Park *et al* 2007 y Wennerberg *et al* 2005).

- **Ran** (*Ras-like nuclear proteins*). Se encuentra constituida por un único miembro en humanos. Esta proteína se encarga de regular el tráfico de molecular de ARN y proteínas entre el núcleo y el citoplasma.
- **Arf** (*ADP ribosylation factor*). Esta familia se encarga de regular el tráfico intracelular de vesículas. El miembro más importante de ella es Arf1 que se encarga de controlar la formación del revestimiento de coatómero de las vesículas en diferentes puntos tanto de la ruta de endocitosis como de exocitosis.
- **Rab** (*Ras-like proteins in brain*). Constituyen la familia más numerosa de todas ellas; y comparte funciones con los miembros de la familia Arf.

2.3.1 Las GTPasas de la familia Rho en *S. pombe*

Todos los miembros de esta familia presentan un elevado grado de similitud, hasta un 40% aproximadamente con otras GTPasas de la familia Ras. Los componentes de esta familia se caracterizan por presentar un dominio Rho. Dentro de esta secuencia encontramos unos aminoácidos que son responsables de que estas proteínas presenten una elevada capacidad intrínseca de hidrólisis de GTP, hasta 10 veces mayor que en otras proteínas Ras (Hart *et al* 1991).

Estas proteínas presentan una gran variedad de proteínas efectoras, lo que le permite participar en multitud de procesos celulares, crecimiento polarizado, secreción y regulación transcripcional entre otras muchas. Además, éstas se encuentran muy conservadas desde levaduras hasta humanos, tanto a nivel estructural como funcional (Bourne *et al* 1991; Bouerne *et al* 1990; Etienne-Manneville *et al* 2002 y Hall *et al* 1998).

En *S. pombe* la familia de Rho se encuentra constituido por 6 miembros: Rho1, Rho2, Rho3, Rho4, Rho5 y Cdc42, siendo sólo esenciales Rho1 y Cdc42 (Arellano *et al* 1991 y Miller *et al* 1994).

a) Clasificación y funciones biológicas

- **Rho1.** Esta GTPasa juega un papel esencial en el crecimiento celular, relacionada con la síntesis de pared celular y con la regulación del citoesqueleto de actina (Arellano et al 1996 y Nakano et al 1997). Rho1 tiene como proteínas efectoras a la enzima β -(1-3)-glucán sintasa y a las proteínas kinasas C, Pck1 y Pck2 (Arellano et al 1999 y Sayers et al 2000).

Cuando se disminuye la expresión de rho1+, se produce una drástica disminución de la actividad β -(1-3)-glucán sintasa, dando lugar a un fenotipo de lisis. (Arellano et al 1997 y Arellano et al 1999).

Rho1 también presenta un papel fundamental en el citoesqueleto de actina, ya que su sobreexpresión produce una pérdida total en la polarización de los filamentos de actina (Arellano et al 1997). Dicha GTPasa localiza en las zonas de crecimiento activo y en el septo (Arellano et al 1997 y Nakano et al 1997). Rho1, únicamente funciona una vez establecido el área de crecimiento polarizado, ya que su localización depende de Tea1 (Arellano et al 1997).

- **Rho2.** Ésta tiene funciones parecidas la GTPasa Rho1, es necesaria para el mantenimiento de la integridad celular. Al igual que la anterior GTPasa localiza en las áreas activas de crecimiento y en el septo (Hirata et al 1998).

Rho2, mediante Pck2 promueve la biosíntesis de α -glucano, mediante la activación y localización de Mok1; y la activación de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1 (Calonge et al 2000, Barbara et al 2008; Ma et al 2006 y Arellano et al 1999).

- **Rho3.** Esta GTPasa no es esencial, aunque una cepa *rho3 Δ* no crece a 37°C. Esta GTPasa se localiza en la membrana plasmática y se encuentra concentrada en las zonas de crecimiento y en la división (Nakano et al 2002). Existe una interacción de Rho3 con los componentes del exocisto, sugiriendo que esta GTPasa regula la actividad del mismo. También es conocido como la localización de Rho3 depende de este complejo, ya que las células de *rho3 Δ* presentan un acúmulo de vesículas a 37°C (Wang et al 2003). Se ha descrito que Rho3 en su estado activo, interacciona con la formina For3 (Nakano et al 2002), aunque hasta el momento no se ha demostrado que participe en su activación.

Todos estos datos nos sugieren que Rho3 en *S. pombe* participa en la coordinación de procesos necesarios para la secreción polarizada celular.

- **Rho4.** Esta GTPasa es la única que localiza exclusivamente en la región de división. No es una proteína esencial, pero las células *rho4Δ* presentan defectos en la separación celular; y acumulan vesículas en las zonas próximas al septo, a altas temperaturas (Nakano *et al* 2003 y Santos *et al* 2003).

Rho4 participa en la localización y secreción de las enzimas líticas Agn1 y Eng1, ambas necesarias para la degradación del septo y la correcta separación de las células hijas (Santos *et al* 2005).

- **Rho5.** Presenta un elevado grado de similitud con la GTPasa Rho1 (86% de identidad). Esta GTPasa se expresa bajo condiciones de estrés y en ausencia de Rho1, regulando la actividad β -glucán sintasa y la regulación del citoesqueleto de actina. Rho5 puede hacer las mismas funciones que Rho1, pero mucho menos eficiente (Nakano *et al* 2005 y Rincon *et al* 2006).

- **Cdc42.** Es una proteína esencial en el control del crecimiento celular polarizado y es necesaria para mantener la morfología característica de dicha levadura (Miller *et al* 1994). Los mutantes de algunos de sus activadores o de sus efectores, descritos hasta el momento, presentan una morfología redondeada y defectos en la polarización de los parches de actina (Ottillie *et al* 1995; Sell *et al* 1998; Murray *et al* 2001 y Hirota *et al* 2003).

Otra de las funciones importantes de Cdc42 es la participación en el ensamblaje de los cables de actina. Esta GTPasa es necesaria para la correcta localización y activación de For3, formina responsable de la nucleación de cables de actina interfásicos. El mutante *cdc42-1625*, un mutante puntual de *cdc42*, presenta unos cables de actina muy finos y cortos; y además no se acumula correctamente For3 en los polos celulares (Martin SG, *et al* 2007).

b) Regulación de las Rho GTPasas

Las células contralan la actividad de estas proteínas mediante diferentes tipos de regulación.

I) Regulación por cambios en su localización celular

La gran mayoría de las proteínas Rho necesitan de ciertos cambios postraduccionales para poder dirigirse y anclarse a las estructuras de membrana donde va a desempeñar la gran mayoría de sus funciones biológicas. Por lo general, estos cambios tienen lugar en el extremo C terminal de estas proteínas, consistentes en la incorporación de grupos isoprenoides seguida de una proteólisis, incrementándose la afinidad de estas proteínas por las membranas de la célula. Estos cambios en la estructura de la proteína varían dependiendo de la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de cada GTPasa.

- Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-X, siendo A un aminoácido alifático y X un aminoácido cualquiera; se produce la incorporación de un grupo geranylgeranilo o menos frecuentemente un farnesilo. La incorporación de este grupo isoprenoide promueve la translocación de toda la proteína al retículo endoplasmático donde se elimina mediante proteólisis el grupo A-A-X. En último lugar, se produce la carboximetilación de la cisteína (Bustelo et al, 2007).
- Si el extremo C-terminal es una Cys-S-S-Leu, la cisteína es geranylgeranilada por la enzima geranylgeranil-transferasa I y tras una proteólisis de los tres últimos aminoácidos es carboximetilada (Wennerberg et al, 2005)
- Si el extremo C-terminal es Cys-X-Cys o Cys-Cys, las dos cisteínas son geranylgeraniladas por la geranylgeraniltransferasa II. Esta modificación es característica de la subfamilia de las proteínas Rab (Wennerberg et al, 2005).

En general un grupo lipídico terminal no basta para anclar las proteínas a la membrana. Por ello, algunas proteínas Rho son modificadas con un grupo palmitoilo o miristoilo (Casey et al, 1994). En otros casos llevan una serie de aminoácidos básicos en el extremo C-terminal que facilitan su anclaje a la membrana.

También se pueden dar otro tipo de modificaciones postraduccionales como son las fosforilaciones que afectan a su correcta localización. Así, es el caso de la proteína RhoA, ésta es fosforilada en el extremo C-terminal por la proteína Kinasa A, evitando su asociación con la membrana plasmática, y promoviendo su afinidad con otras proteínas, lo que evita su degradación (Forget et al, 2002; Lang et al 1996 y Rolli-Derkinderen et al, 2005)

II) Regulación por cambio de nucleótido

Las GTPasas de la familia Rho alternan entre un estado de unión a GTP (activo) y un estado de unión al GDP (inactivo). Las proteínas Rho presentan una alta afinidad por la unión con GDP o GTP, pero posee una baja actividad GTPásica intrínseca, intercambiando el GTP por GDP de manera muy poco eficiente. Para que las GTPasas realicen sus funciones de manera adecuada es necesaria la existencia de unas proteínas que regulen el ciclo de unión GTP/GDP (Wennerberg et al, 2005).

Se pueden agrupar estas proteínas entres clases diferentes:

- **Las proteínas GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*)**

Estas proteínas al interactuar con las GTPasas provocan un cambio conformacional que favorece la unión del GTP. Los GEFs interactúan con la forma unida a GDP de la GTPasa y provoca la disociación del nucleótido, que posteriormente será sustituido por GTP (Vetter et al, 2011). El sitio de unión de los nucleótidos de guanina se sitúa entre las regiones denominadas switch I y switch II de las proteínas Rho. La unión del GTP permite la apertura de estas dos regiones y la accesibilidad de las proteínas dianas a las mismas. Cuando la GTPasa se encuentra unida a GTP posee una gran afinidad por las proteínas efectoras, desencadenándose la señal de respuesta (Bishop et al 2000). Las regiones switch I y switch II, junto con el P-loop (región de unión al fosfato); interactúan con los fosfatos y con el ion magnesio, que son moléculas imprescindibles para la unión entre el nucleótido y la GTPasa sea de alta afinidad (Vetter *et al* 2001). La unión de las proteínas GEFs con las proteínas Rhos induce cambios conformacionales dichas regiones, produciendo un bloqueo en el sitio de unión al magnesio. Esto posibilita que la interacción con los grupos fosfatos se debiliten y se faciliten la liberación del nucleótido y la entrada de otro nuevo. Las

proteínas Rho presentan una afinidad similar tanto por el GTP como el GDP; y los reguladores de tipo GEFs no favorecen la unión de un tipo u otro. La unión del GTP se produce debido a que la concentración intracelular de este nucleótido es 10 veces superiora a la de GDP. Las proteínas GEFs desplazan el nucleótido unido; y posteriormente el nuevo nucleótido a la proteína GEF unida (Bos et al 2007).

- GEFs de las GTPasas de la familia Rho:

Las proteínas Rho-GEFs se caracterizan por la presencia de una serie de dominios característicos. Entre ellos cabe destacar el dominio DH (Dbl homology) descrito por vez primera en la proteína Bbl (primer GEF de mamíferos aislado como un oncogén), (Eva et al 1985). Este dominio es imprescindible para la actividad GEF. Estos dominios presentan un bajo grado de identidad a nivel de secuencia proteica, sin embargo, la estructura terciaria de los mismos se encuentra muy conservada (Liu et al, 1998; Soisson et al, 1998 y Worthylake et al 2000).

Los GEF presentan otros dominios denominados PH (Pleskstrin homology), adyacente al dominio DH hacia su extremo carboxilo-terminal. En algunas ocasiones el módulo DH-PH es suficiente para promover el intercambio de GDP por GTP. El dominio PH es capaz de unirse a los fosfolípidos de membrana, así como a otras proteínas y regular de esta manera su localización, su actividad catalítica así como la propia unión con la GTPasa (Rossman et al 2005).

También se pueden encontrar otro tipo de dominios, menos importantes desde el punto de vista funcional, como son el caso de los dominios SH3, SH2, PDZ, DEP, PH adicionales y Ser/Thr kinasa. Estos están implicados en la interacción con otras proteínas: proteínas de cascadas de señalización y proteínas kinasas entre otras (Rossman et al 2005 y Schmidt et al 2002).

- Regulación de los Rho-GEFs:

Estas proteínas a su vez se encuentran reguladas de una manera muy precisa, de manera que cada miembro de esta familia puede llegar a poseer un mecanismo de control único, pero se pueden describir mecanismos generales (Schmidt *et al*, 2002).

- Inhibición intramolecular:

Algunos GEFs presentan un dominio regulador que bloquee la actividad de la proteína mediante una interacción intramolecular, produciéndose un bloqueo del sitio activo en el dominio DH. La reversión de este proceso de autoinhibición se puede producir mediante la unión de otras proteínas, por fosforilación o por otros mecanismos (Bustelo et al 2000).

- Interacción proteína-proteína:

Muchos GEF son activados por la interacción con otras proteínas o mediante procesos de fosforilación de alguno de sus residuos, sin la necesidad de eliminar ningún mecanismo autoinhibitorio.

- Regulación por localización:

Algunas de las funciones realizadas por las GTPasa dependen del control espacial de sus reguladores (Rossman et al, 2005 y Schmidt et al, 2002).

• **Las proteínas GAP (GTPase Activating Protein)**

Estas proteínas reguladoras promueven la actividad GTPásica intrínseca de las GTPasa. Acelerando la hidrólisis del GTP a GDP, haciendo más eficiente dicho paso varios órdenes de magnitud y promoviendo que la GTPasa se encuentre en estado inactivo.

Se sabe que el mecanismo de acción que realiza las proteínas Rho-GAP consiste en el ataque nucleofílico que produce la molécula de agua al grupo fosfato del GTP, promoviendo su conversión a GDP. La función de la proteína con actividad GAP en dicha reacción consiste en permitir la correcta orientación de la molécula de agua y estabilizar el estado de transición (Bos et al, 2007).

- **GAPs de las GTPasas de la familia Rho:**

Las proteínas GAP de las Rho GTPasas se definen por la presencia de un dominio RhoGAP que se encuentra altamente conservado en todas ellas. Este dominio consta de unos 150 aminoácidos; y es diferente a otros dominios GAP presente en otros reguladores de tipo GAP específico de otras GTPasa. En ambos casos es

suficiente este dominio para la unión a las proteínas Rho activas; y acelerar su actividad GTPásica (Moon et al, 2003).

Este dominio consiste en 9 α -hélices y un residuo de arginina altamente conservado. El dominio RhoGAP interacciona con las regiones switch I y switch II, así como con la región P-loop de las proteínas Rho; estas regiones constituyen el sitio de unión del GTP (Moon et al, 2003). Estudios estructurales del proceso de unión realizado entre la proteína Rho-GAP y su correspondiente GTPasa muestra cambios conformacionales en la GTPasa con respecto a la proteína con actividad GAP. Estos cambios conformacionales podrían ayudar a que el residuo conservado de arginina se introduzca en el sitio activo de la proteína Rho y estabilizar así el proceso de hidrólisis del GTP durante la formación del estado transicional. Estas modificaciones permiten que la arginina interactúe con el glutamato o glutamina de la GTPasa, que es responsable del posicionamiento de la molécula de agua necesaria para que se produzca la catálisis. La estabilización que realiza la arginina en este residuo, limita la movilidad de la molécula de agua, pudiendo así reducir la barrera energética que se necesita superar para la hidrólisis de la molécula de GTP (Moon et al, 2003).

- Regulación de los Rho-GAPs:

La actividad de cada Rho-GAP se encuentra finamente regulada desde el punto de vista espacial y temporal para que la inactivación de las GTPasas se produzca de manera adecuada y un momento preciso (Moon et al 2003). Este proceso se encuentra regulado, a su vez, por la propia regulación que sufren las proteínas con actividad GAP. Estos tipos de regulación podemos agruparlos en diferentes grupos.

- Regulación por fosforilación:

Un claro ejemplo de este tipo de fosforilación lo encontramos en las proteínas Bem2 y Bem3 de *S. cerevisiae*. Estas GAPs son hiperfosforiladas durante la emergencia de la yema por la kinasa Cdc28. Esta fosforilación inhibe la actividad GAP in vivo. Bem2 y Bem3 regulan negativamente a la GTPasa Cdc42 durante G1; y su inactivación por parte del complejo Cdc28/Cln2 contribuye a activar específicamente a Cdc42 durante el proceso de emergencia de la yema para promover la polimerización de filamentos de actina (Knaus et al, 2007).

- Regulación por unión a lípidos:

Los GAPs de Cdc42 Rga1 y Rga2 para *S. cerevisiae* son regulados por fosfolípidos de membrana. Se sabe que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina estimulan la actividad GAP de los mismos; mientras que el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato la inhibe. Así que mediante la distribución de estos fosfolípidos de membrana se puede regular la localización de Cdc42 activo en el sitio de crecimiento (Goldenberg et al, 2010; Saito et al, 2007 y Yeung et al 2008).

- Regulación por interacciones proteína-proteína:

Un ejemplo de este tipo de regulación lo encontramos en la proteína CdGAP. Ésta presenta un dominio RhoGAP en el extremo N-terminal y región de múltiples dominios en prolina en el C-terminal de la proteína. CdGAP regula negativamente a Cdc42 y Rac1, en células de mamífero, e interactúa directamente a través de su región intermedia con los dominios SH3 de la intersectina, una proteína estructural endocítica. Esto sugiere que la interacción con esta proteína produce cambios conformacionales, impidiendo al dominio GAP realizar su función (Moon et al, 2003).

Existen mayor número de GEFs y GAPs que GTPasas a las que regular. Una misma GTPasa puede ser regulada por varios GEFs y GAP, lo que permite una gran especificidad en el control de las distintas rutas de señalización de las GTPasas. Estas proteínas reguladoras presentan diferentes dominios que le permiten tener un control espacial y temporal de las GTPasas.

• **Las proteínas GDI (*GDP Dissociation Inhibitor*)**

Este tipo de proteínas reguladoras inhibe la disociación de la molécula de GDP, tendiendo a mantener a la GTPasa en su estado inactivo. Se unen a la GTPasa y enmascaran el grupo prenilo de la misma impidiendo que se ancle a la membrana e interactúe con los GEFs. De esta manera tendremos la proteína Rho en su estado inactivo en el citosol (Wennerberg et al, 2005). Estos reguladores negativos sólo actúan sobre proteínas de la familia Rho y Rab.

III) Otros tipos de regulación

En células de mamífero, algunas GTPasa de la familia Rho presentan expresión específica dependiendo del tipo celular o del estímulo a la que se encuentran sometidas. Otras son reguladas mediante degradación mediada por ubiquitinación o degradación mediante la ruta de las caspasas.

Las GTPasas también pueden ser fosforiladas en residuos específicos, esta modificación posttraduccional puede influir en su interacción con los GDIs, su estabilidad en las membranas, así como sus funciones efectoras (Bustelo et al 2007).

c) GTPasas y polaridad celular en *S. cerevisiae*

La levadura de gemación *S. cerevisiae* es un buen modelo para el estudio de los mecanismos que intervienen en los procesos de polarización celular. En este tipo de levaduras se pueden distinguir dos tipos de procesos de polarización diferentes. Uno es la asimetría celular que se produce en la emergencia de la yema y que culmina con la división y separación en dos células diferentes. El otro tipo es una proyección celular que se forma como respuesta a un gradiente de feromonas generado por una célula de sexo opuesto, durante la respuesta sexual (Drubin D.G, et al 1996).

- **Señales desencadenantes el crecimiento polarizado**

La ruta para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular durante la formación de la yema comienza con una señal espacial intrínseca, procedente del ciclo celular previo, proteínas del citoesqueleto de actina y de septinas sexual (Drubin D.G, et al 1996), (poner imagen nº2).

La pérdida parcial de función en los mutantes de septinas, proteínas del citoesqueleto que se encargan de formar el anillo en el cuello existente entre la célula madre y la célula hija naciente; y que es necesario para la citoquinesis (Sanders and Field 1994). Estos datos sugieren que el ensamblaje de las septinas durante el ciclo celular previo es un componente espacial esencial para la selección del sitio de gemación durante el ciclo celular; y por lo tanto desencadenante de los procesos de asimetría que se producen en la célula. El correcto ensamblaje de anillos de septinas, es canalizado intracelularmente por las proteínas Bub3 y Bub4, ambas se encargan de

establecer un patrón de gemación axial en *S. cerevisiae*, colocalizan con las septinas (Chant et al 1995 y Herskowitz et al 1995). Así que mutaciones en BUB3 y BUB4 produce una gemación de carácter bipolar, y no una gemación de tipo aleatoria.

El citoesqueleto de actina constituye la otra señal de regulación espacial que reconocen las células para el establecimiento de la polaridad celular. La actina produce una gemación de tipo bipolar (Chant et al 1995). La actina se concentra en la punta del área de gemación y en el septo, asociándose a importantes proteínas como Rvs167, siendo ésta una de las más importantes en el proceso de gemación bipolar (Bauer 1993 y Drubin 1993).

- **Las GTPasas Rsr1 y Cdc42 como elementos canalizadores de las señales intracelulares hacia el sitio de crecimiento polarizado**

El núcleo central de este complejo de señalización consta de dos GTPasas: Rsr1 y Cdc42y se encuentran conectadas mediante el GEF Cdc24 (Bender and Pringle 1989 y Zheng 1995). Cuando se encuentran unidas a GTP; y por tanto en su conformación activa, se encuentran marcando el sitio activo de crecimiento celular. Produciendo en última instancia la polarización del citoesqueleto de actina y de septinas; y generando así una orientación de la maquinaria secretora celular hacia el sitio de crecimiento polarizado (Drubin D.G, et al 1996).

Rsr1, también llamada Bub1 es esencial para el reconocimiento de la señal espacial intracelular procedente tanto de la señalización axial y bipolar (Bender and Pringle 1989, Herskowitz 1995 y Pringle 1995). En los mutantes *rsr1*, se produce la formación de la gema, pero con un posicionamiento aleatorio de la misma.

Cdc42, es esencial para la organización de todos los componentes celulares y moléculas hacia el sitio de gemación. Mutantes para *CDC42* presentan un crecimiento isotrópico, así como un falta de polarización (Adams 1990).

Estas dos GTPasas se encuentran reguladas por la actividad de sus GEFs y GAPs. En el caso *Rsr1* su actividad se encuentra controlada por el balance existente entre Bud5 (GEF) y Bud2 (GAP). Mientras que Cdc24, el principal GEF de Cdc42, se encarga de controlar su actividad. Mutantes para *cdc24* causan fenotipos parecidos a *rsr1* y *cdc42* (Bender 1993, Chant 1991 y Park 1993).

También se conocen otras proteínas que se ensamblan al sitio de crecimiento polarizado (formación de la gema). Como es el caso de Bem1, localizando ésta en la punta de la yema (Pringle 1995); y une tanto a Cdc24 como a Rsr1 con Cdc42 (Zheng 1995), esta proteína sirve como proteína estructural para anclar otras proteínas a los sitios activos de crecimiento. Cuando Cdc42 se encuentra unido a GTP; y por tanto en su conformación activa, éste se une y activa a las quinasas Cla4 y Ste20 (Cvrckavá 1995, Simon et al 1995a). Ambas quinasas hacen redundantes funciones durante el crecimiento mitótico y son requeridas para el mantenimiento de las septinas en el sitio de gemación (Cvrckavá 1995). Otras proteínas señalizadoras implicadas en el establecimiento de la polaridad y el crecimiento de la yema, son las GTPasa Rho (Yamochi 1994) las MAPs quinasas (Mazzoni 1993).

Es importante destacar la función que realiza la subunidad reguladora del complejo de PP2A, Cdc55 (Healy 1991); así como las dos caseín quinasas, Yck1 e Yck2 (Robinson 1993), ambas están implicadas en la regulación del ensamblaje de los filamentos de septinas que se producen en el cuello de la yema. También son proteínas dianas de Cdc42, algunas proteínas del citoesqueleto de actina como son el caso de, Sla1, Abp1, Sla2 y Rvs167 (Welch 1994). Tanto Cdc42 como moléculas efectoras asociadas pueden actuar de manera diferente sobre los sitios esenciales para la nucleación de filamentos de actina.

- **Control espacial de la ruta secretora**

La señal es mantenida en el tiempo mediante el direccionamiento de los componentes de la ruta secretora hacia el sitio de crecimiento polarizado; donde se produce un rápido proceso de crecimiento de la membrana plasmática (Drubin D.G, et al 1996).

Las vesículas son secretadas en los sitios activos de crecimiento, produciéndose una asociación del complejo Sec6-Sec8-Sec15 con la membrana plasmática de la punta de la yema, donde controla la fusión de otros elementos reguladores transportadas por las vesículas del exocisto (TerBush and Novick 1995). El control espacial de las vesículas puede darse a dos niveles: formación de vesículas cerca de las zonas de

crecimiento y localización de vesículas en los parches donde se produce la fusión vesicular.

El citoesqueleto polarizado canaliza la ruta secretora hacia la zona de gemación, propagando la señal hacia el interior del citoplasma, a través de cables citoplasmáticos de actina generando un eje entre la célula madre e hija; y con la ayuda de las miosinas. Los cables de actina y las miosinas también se encargan de organizar las mitocondrias en el citoplasma, asegurándose un reparto cuando se produce la división celular (Drubin 1993, Simon 1995b).

- **Control del desarrollo de la polaridad durante el ciclo celular y mediante feromonas**

Existen diferentes programas de polaridad celular en la célula.

Con respecto a las que se produce durante el ciclo celular podemos decir que en G1 tardía la activación de la kinasa Cdc28 por la ciclina de G1, START, desencadena la polarización de componentes celulares hacia el posible sitio gemación.

En G2 las ciclinas B inducen el cambio entre el crecimiento polarizado e isotrópico. El control del tiempo en las que se produce las distintas formas de crecimiento de una célula vegetativa, determina la forma de la yema; pudiendo determinar si una yema es redondeada, como en las células vegetativas; ovoide como en las células diploides o elongadas como en las células pseudohifales. Al final del ciclo celular, decaen los niveles de ciclina B desencadenando la repolarización de la célula hacia el cuello que se produce entre la célula madre y la célula hija, en la que se culmina con la septación (Lew R. 1995)

d) Actividad CDK y el control temporal de la polaridad celular

El crecimiento polarizado, por lo general, se encuentra coordinado con la progresión por el ciclo celular. En *S. cerevisiae*, por ejemplo, la actividad de CDK en G1 induce la emergencia de la gema y el crecimiento polarizado de la misma, mientras que la actividad de CDK en G2 se requiere para cambiar de crecimiento polarizado a crecimiento isotrópico.

En *C. albicans*, un organismo que puede crecer como levadura, como hifa o como pseudohifa, el crecimiento polarizado está también coordinado con el ciclo celular, así por ejemplo, la delección de algunas ciclinas (CLN3, CLN2 y CLN4) producen un fenotipo de filamentación. Mientras que la delección de otras como CCN1 impide el crecimiento hifal. Así mismo, la ciclina de G1, HGG1, se requiere específicamente para el crecimiento hifal (Zheng *et al* 2007). Estos datos sugieren que diferentes subcomplejos CDK-ciclina podrían estar regulando diferentes decisiones durante morfogénesis.

En otro hongo, *Ustilago maydis*, la actividad del complejo Cdk5 (pho85/pcl12) se requiere para el crecimiento polarizado (Castillo-Lluva *et al* 2007; Flor-Parra *et al* 2007).

En neuronas, el homólogo de Cdk5 se requiere para la remodelación del citoesqueleto requerida para la migración celular (Xie *et al* 2006). En un estudio reciente realizado en *S. cerevisiae* se ha demostrado que la inhibición de Cdc28 produce una rápida pérdida de la polaridad, la deslocalización de marcadores de secreción y de Cdc42. Estos resultados apuntan de nuevo a un papel de Cdk (Cdc28) en el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular (McCusker *et al* 2007).

Varios grupos han documentado que la actividad del complejo CDK se requiere para fosforilar varios GAPs de Cdc42 y a su único GEF en *S. cerevisiae*, Cdc24, así como a algunas de sus proteínas asociadas como son el caso de Boi1 o Boi2. Dos reguladores negativos de Cdc42, Bem3 y Rga2 también son fosforilados por Cdk en el momento de la formación de la gema y la expresión de una forma no fosforilable de ambas proteínas que se encargan de no producir un crecimiento polarizado (Knaus *et al* 2007 y Sopko *et al* 2007). Estos datos sugieren que Cdk fosforila a varios GAPs de Cdc42 inhibiéndolos, y al único GEF (Cdc24) y varias proteínas asociadas, activándolas (Yoshida *et al* 2008).

En *U. maydis* Cdk5 también fosforila a dos reguladores de Cdc42, la proteína adaptadora Bem1 y al Cdc24 (Alvarez-Tabares *et al* 2008). La inhibición de los GAPs y la activación de los GEFs y/o otras proteínas asociadas, conlleva a la activación de Cdc42 que a su vez activa la polarización del citoesqueleto de actina. Dado que la actividad

quinasa de Cdk oscila durante el ciclo celular, la regulación de Cdc42 mediada por Cdk podría ser el mecanismo molecular que coordina la progresión por el ciclo celular con el establecimiento de la polaridad, proporcionando así un control temporal.

Para la correcta homeostasis celular los sustratos fosforilados han de ser, o bien degradados, o bien defosforilados una vez han realizado su función. En muchos casos es el equilibrio entre una determinada proteína kinasa y una fosfatasa lo que regula espacio-temporalmente dicho proceso, así que desajustes entre estos balances de fosforilación/defosforilación hacen que se altere en balance entre las formas fosforiladas y defosforiladas de estas proteínas efectoras.

A pesar de los datos cada vez más contundentes de que la actividad kinasa de Cdk2, o de otras Cdks más especializadas dependiendo de los organismos, se requiere para controlar el crecimiento polarizado y su coordinación con el ciclo celular, aún no se conocen las fosfatasas que revierten y/o contrarrestan la fosforilación de estas kinasas.

2.3.3 La GTPasa Cdc42 como proteína central del crecimiento polarizado

La GTPasa Cdc42 es un regulador central de la polaridad celular (Etienne-Manneville et al 2004). Su función es esencial para varias actividades celulares como la polarización del citoesqueleto de actina y la secreción de vesículas a los sitios de crecimiento polarizado (Park et al 2007 y Bendezú FO, et al 2011).

En la estructura molecular de Cdc42 se pueden diferenciar 4 dominios diferentes: switch I, switch II, Rho insert y el de anclaje a membrana. El dominio switch I y switch II son las regiones por las que se producen un mayor grado de interacción con las proteínas efectoras; y por son las que presentan una mayor plasticidad estructural. El dominio Rho insert es característico la familia de las Rho GTPasa y le permite unirse a unas proteínas efectoras determinadas. El dominio de anclaje a la membrana, el cual se encuentra en la región C-terminal de la misma, este sufre una isoprenilación la cual le permite su unión a la membrana. También cabe destacar en la estructura

tridimensional de la proteína los 4 sitios implicados en la hidrólisis del GTP (Feltham *et al* 1997 y Finegold *et al* 1991).

a) Mecanismos de regulación de Cdc42

Cdc42 cicla entre dos estados, uno activo (unido a GTP) y otro inactivo (unido a GDP). Proteínas tipo GEF promueven el intercambio de GDP por GTP activando a Cdc42, mientras que proteínas tipo GAP promueven el cambio reverso promoviendo su inactivación. Cdc42 también requiere para su función proteínas adaptadoras o estructurales como son Scd2 o Hob3 (Coll *et al.*, 2007; Rincon *et al.*, 2007); y un anclaje a la membrana plasmática mediante una cola de residuos isoprenilados, para su completa activación (Finegold *et al* 1991).

En *S. cerevisiae*, mientras que la expresión de alelos inactivos de CDC42 resulta en un defecto de polarización, la expresión de alelos hiperactivos conlleva a la formación de múltiples gemas (Caviston *et al* 2002). En *S. pombe* la inactivación de Cdc42 presenta un fenotipo no polarizado dando lugar a células redondas que son incapaces de crecer (Mille *et al* 1994). Se conocen dos reguladores tipo GEF de Cdc42 que son Scd1 y Gef1 y un solo GAP, Rga4 (Chang *et al* 1994, Coll *et al* 2003 y Fukui *et al* 1998). Mientras la inactivación de Scd1 produce la no polarización del crecimiento (Chang *et al* 1994), así como defectos en endocitosis (Murray *et al* 2001). Scd1 localiza en las puntas y en la zona de división; así como en el spindle en células mitóticas (Chang E, *et al* 200). La delección de Gef1 presenta defectos de establecimiento del crecimiento bipolar y en citoquinesis, se localiza en la región de división y en los extremos (Coll *et al* 2003). También es importante señalar que se requiere la presencia de proteína estructural Scd2, sobre la que se anclan otras proteínas que regulan y reconocen a Cdc42, la falta de esta proteína también produce una falta de crecimiento polarizado en las células (Fukui Y, *et al* 1988.). Rga4 es la única proteína GAP descrita hasta el momento para Cdc42. La delección de Rga4 presenta células con defectos de polaridad y un diámetro celular superior a un silvestre (Nakano *et al* 2001, Tatebe H, *et al* 2008). Rga4 localiza en las membranas laterales, estableciendo un dominio de no crecimiento y excluida de las zonas activas de crecimiento activo en los extremos de la célula. Esta exclusión se debe a la interacción física que establece la kinasa Pom1 con

el regulador Rga4, excluyéndolo del polo donde se esté produciendo en crecimiento polarizado. También presenta una localización en la región medial cuando las células entren en mitosis (Tatebe H, *et al* 2008).

También se Por tanto, el estado de activación de Cdc42 tiene un impacto directo sobre el estado de polarización celular.

3. Fosfatasas

3.1 Características y Clasificación

La fosforilación es la modificación posttraduccional más común que se da en la propagación de señales (Mann M. *et al* 2003). Indicando que el mecanismo de fosforilación/defosforilación es el principal control es la respuesta de causas intra y extracelulares, ya que son procesos rápidos, se producen muchos de ellos del orden de segundos, no se requiere de que una nueva proteína sea sintetizada o degradada; y puede ser fácilmente revertidos. La fosforilación juega un papel muy importa en multitud de procesos, entre los que podemos destacar, migración celular, apoptosis, diferenciación, metabolismo , tráfico de orgánulos celulares, entre otros muchos procesos (Graves, J.D. *et al* 1999; Manning, G. *et al* 2002 y Mannig, G. *et al* 2002). Así que alteraciones en el balance de fosforilación de proteínas produce graves alteraciones, como puede ser el cáncer, la diabetes así como enfermedades neurodegenerativas o inflamatorias (Tonks N.K. *et al* 2006; Easty, D. *et al* 2006 y Gee, C.E. *et al* 2005).

Las fosforilaciones que ocurren mayoritariamente en las células eucariotas ocurren en residuos de serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr). Está estimado el porcentaje de fosforilación que recae en cada uno de estos residuos a lo largo de todo el proteoma de humanos, 86,4%, 11,8% y 1,8%, respectivamente (Olsen JV, *et al* 2006). Este dato nos hace indicar que el las kinasas que realizan los procesos de fosforilación constituyen una extensa familia en las células eucariotas, llegando a constituir el 2% de todo el genoma (Caenepeel, S. *et al* 2004 y Zhu, H. *et al* 2000). El genoma humano codifica para 518 kinasas, de las cuales 428 se conocen que o se predicen por comparación de secuencias, que realizan las fosforilaciones en residuos de serina y

treonina. Mientras que los 90 miembros restantes son miembros que pertenecen a la familia de las tirosinas kinasas (Manning, G. *et al* 2002 y Alonso, A. *et al* 2004). En contraposición a este elevado número de proteínas kinasas encontramos un bajo número de proteínas fosfatasas. En humanos encontramos unas 200 proteínas fosfatasas que realizan todas las reacciones opuestas.

La clasificación mostrada en la figura es un compendio de todo lo que aparece en la literatura. En dicha clasificación se estableció una agrupación en 6 familias diferentes, acorde del dominio catalítico que presentaban en las diferentes anotaciones de InterPro que encontramos para las diferentes proteínas fosfatasas (1). Dentro de cada una de estas familias, se volvieron a subdividir en diferentes clases acorde a la preferencia de sustratos que éstas presentaban (2) y las anotaciones encontradas en la literatura (3); y entre paréntesis se indica el número de miembros que la componen. Siguiendo este procedimiento se generó una lista con 211 dominios con actividad catalítica fosfatasa, distribuidos en 199 proteínas diferentes (F. Sacco, *et al* 2012).

Estos 211 dominios de fosfatasas se agruparon en 6 familias diferentes, agrupadas en función de la similitud de la secuencia que presentaban dichos dominios. Así que se pueden identificar 6 grandes familias.

- PTP (protein-tyrosine phosphatase domain)
- PPP (serine/threonine-specific protein phosphatase domain)
- PPM (protein phosphatase 2C-like domain)
- HAD (haloacid dehalogenase-like hydrolase domain)
- LP (Lipoprotein que se encuentra seguido por uno de los tres siguientes dominios: phosphatidic acid phosphatase, inositol monophosphatase o inositol polyphosphate-related phosphatase)
- NUDT (NUDIX hydrolase domain)

3.2 La proteína fosfatasa de tipo 2A: PP2A

PP2A es una proteína fosfatasa de tipo 2A, es una de las mayores serina/treonina fosfatasas de todas las células eucariotas; y muy conservadas desde el punto de vista evolutivo.

Esta se encuentra implicada en multitud de procesos entre los que cabe destacar; progresión del ciclo celular, citoquinesis, respuesta a estrés y procesos de morfogénesis (Janssens V, et al 2001; Shimanuki M, et al 1193 y Lin FC, et al 2005). También tiene un papel fundamental en la organización del citoesqueleto (Aranda-Orgilles et al, 2008), así como en la formación de adhesiones focales que le permiten a la célula establecer interacciones con la matriz extracelular (Basu et al., 2007 y Gushiken et al 2008). PP2A también se encarga de regular la adhesión célula-célula y esto es esencial para el establecimiento de barreras que impidan la difusión de los dominios específicos de membrana y la compactación de las células de un tejido.

Mutaciones en diferentes subunidades reguladoras del complejo de PP2A están asociadas a múltiples tipos de cáncer, debido a la alteración que se produce en la adhesión celular, lo que induce a las células cancerosas a abandonar el tumor y colonizar otros tejidos (Wang et al 1998). Además de regular las adhesiones celulares y al citoesqueleto de actina, PP2A también regula el citoesqueleto de MTs mediante la defosforilación de varias MAPs (Microtubule Associated Proteins), como Tau o MAP2 (Goedert et al 1992; Gong et al 2008 y Silverstein et al 2002).

Otra de las funciones que desempeña PP2A en la célula es regular la maquinaria de entrada en mitosis a través de la defosforilación del regulador universal Cdc25 (Kinoshita *et al* 1993 y Pal *et al* 2008). Además PP2A actúa como fosfatasa de quinasas regulando, por tanto, la cinética de activación/inactivación de cascadas de proteínas quinasas. Un ejemplo de esta regulación lo encontramos en la ruta de señalización mitogénica ERK en células animales donde la inactivación de la ruta tras un estímulo mitogénico dependiente de PP2A; y su falta de función conlleva a la transformación celular (Millward *et al* 1999).

3.3.1 Mecanismo de acción del complejo de PP2A

PP2A es un complejo holoenzimático y heterotrimérico que se encuentra constituido por una subunidad catalítica (C), una estructural (A) y una subunidad reguladora (B); la cual le confiere al complejo especificidad de sustrato y presenta una localización subcelular diferenciada. Diferentes asociaciones de las subunidades C con

las B, proporcionan al complejo de PP2A diferente especificidad de sustrato (Janssens V, et al 2001; Shimanuki M, et al 1993; Lin FC, et al 2005 y Hombauer H, et al 2007).

En las células humanas, el complejo de PP2A se encuentra codificada por una extensa familia de miembros integrantes llegando a constituir hasta 96 combinaciones de holoenzimáticas diferentes (Janssens V, et al 2008). Además, una tercera parte de los complejos de PP2A formados, se encuentran en estado de dímero entre la subunidad catalítica, C y la subunidad estructural A (PP2AD) (Kremmer E, et al 1997). La mayoría de los complejos de PP2A formados, son complejos heterotriméricos, consistentes en una subunidad estructural (A), una subunidad catalítica (C) y una subunidad reguladora (B) variable. Tanto la subunidad estructural (A) como la subunidad catalítica (C) se encuentran codificadas por dos genes diferentes respectivamente, produciendo dos isoformas diferentes, α y β . Aunque ambas isoformas presente una secuencia muy parecida tanto en la subunidad A como C, no presentan funciones redundantes entre ellas (Götz J, et al 1998; Gu P, et al 2012; Ruediger R, et al 2011 y Sablina AA, et al 2007).

En el caso de las subunidades reguladoras (B), encontramos 4 tipos diferentes que se encuentran codificadas por un total de 15 genes diferentes, dando lugar a más de 23 isoformas diferentes y que se pueden agrupar en 4 familias diferentes. PR55/B o B55 que se encuentra codificada por 4 genes diferentes (PPP2R2A – PPP2R2B), PR61/B' o B56 codificada por 5 genes (PPP2R5A –PPP2R5E), PR72/B'' codificada por 3 genes (PPP2R3A – PPP2R3C) y PR93/PR110/B''' codificada por otros 3 genes (STRN, STRN3 y STRN4). Alguno de estos genes presentan un splicing alternativo o alteraciones en la traducción que hacen tener un mayor número de isoformas diferentes para la subunidad reguladora de tipo B (Janssens V, et al 2008; Dagda RK, et al 2003; Zwaenepoel K, et al 2008 y Jin Z, et al 2009). La composición final del complejo heterotrimérico, siendo la subunidad reguladora de tipo B la que proporciona al complejo especificidad de sustrato y localización subcelular diferenciada que proporciona un grado mayor en la regulación de la actividad fosfatasa del complejo (Virshup DM, et al 2009; Shi Y, et al 2009; Slupe AM, et al 2011 y Janssens V, et al 2001).

Toda esta variedad de subunidades reguladoras confieren al complejo variedad en la formación de complejos heterotriméricos; y son capaces de realizar multitud funciones fisiológicas. Podemos señalar como la subunidad PR55/B es importante en la regulación de la mitosis (Wurzenberger C, et al 2011 y Barr FA, et al 2011) y apoptosis (Janssens V, et al 2012), señalización extracelular (Eichhorn PJ, et al 2009) y defosforilación de la proteína Tau en el cerebro (Götz J, et al 2010). Mientras que la subunidad PR61/B' tiene otras dianas diferentes en los procesos de meiosis y mitosis (Wurzenberger C, et al 2011 y Barr FA, et al 2011); y en los de apoptosis (Janssens V, et al 2012) a las presentadas por la subunidad de tipo B. También esta subunidad de tipo B participa en procesos de desarrollo (Yang J, et al 2010); y participa en el control de algunas proteínas esenciales en desarrollos tumorales como son el caso de Wnt/c-myc y Akt (Janssens V, et al 2001; Eichhorn PJ, et al 2009; Yang J, et al 2010; Janssens V, et al 2005; Arroyo JD, et al 2005; Arnold HK, et al 2008 y Westermarck J, et al 2008). La subunidad PR72/B'' participa en la señalización de factores de crecimiento epidérmicos (Zwaenepoel K, et al 2010), síntesis de ADN (Janssens V, et al 2001) y señalización neuronal (Walaas SI, et al 2011). Por último, la subunidad de tipo B''' en la señalización de la ruta Hippo (Ribeiro PS, et al 2010).

A estos mecanismos de regulación que confiere la especificidad de sustrato proporcionado por las subunidades reguladoras de tipo B, tenemos que añadir las modificaciones posttraduccionales que se producen en una serie de residuos, altamente conservados, en uno de los extremos de la subunidad catalítica; y que son determinantes para el correcto ensamblaje del complejo. En concreto es una metilación reversible en el extremo C-terminal realizada por la enzima metiltransferasa, LCMT1 (codificada por el gen LCMT1) y revertido por una metilesterasa PME-1 (codificada por el gen PPME-1). Además, las fosforilaciones realizadas en los residuos Thr304 y Try307, posiblemente realizada por una kinasa dependiente de ciclina (CDK) y por una Src o una RTK, respectivamente. Este tipo de modificaciones pueden afectar a la asociación que se establece el dímero PP2A_D con la subunidad reguladora (B). Estos procesos de fosforilación son revertidos mediante procesos de autodefosforilación por parte del complejo.

Para alcanzar una completa activación del complejo de PP2A se requiere la unión de un activador del complejo PTPA (*Phosphotyrosyl Phosphatase Activator*), al dímero que formaría la subunidad catalítica es estructural y así proporcionar el ensamblaje y la actividad adecuada al complejo de PP2A (Hombauer H, *et al* 2007; Cayla X, *et al* 1990; Longin *et al* 2004; Van Hoof *et al* 2005; Janssens *et al* 1998) y Fellner T, *et al* 2003). La función reguladora de la PTPAs se encuentra conservada a lo largo de toda la evolución, desde levaduras hasta humanos (Fellner T, *et al* 2003).

3.3.2 Estructura y activación del complejo de PP2A por parte del activador PTPA

ESTRUCTURA DE PTPA

La proteína PTPA de humanos está constituida por 323 Aas. La secuencia y estructura de esta proteína se encuentra altamente conservada en la gran mayoría de las especies. Este activador presenta una estructura bastante compacta, proporcionada por las estructuras en α -hélices que presenta la estructura secundaria de la proteína. En el caso de humanos se encuentra constituida por 17 α -hélices y 4 láminas- β . En la estructura terciaria de la misma puede reconocerse 3 dominios diferentes: central, superior y de conexión. El dominio central se encuentra comprendido por dos láminas- β ($\beta 2$ y $\beta 3$) y por 6 α -hélices consecutivas ($\alpha 3$ - $\alpha 8$), las cuales se encuentran dispuestas en dos capas. La $\alpha 3$ y $\alpha 4$ se encuentran constituyendo la capa externa; mientras que la $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ y $\alpha 8$ constituyen la capa interna, la cual se encuentra en contacto con los otros dos dominios. Parte de la región C-terminal constituye el dominio superior, el cual se encuentra formado por 5 α -hélices consecutivas ($\alpha 11$ - $\alpha 15$); las cuales son conectadas con el dominio central mediante el dominio de conexión. Como su nombre indica el dominio de conexión se encuentra constituido por elementos procedentes de la región N-terminal ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$), central ($\alpha 9$ y $\alpha 10$) y la región C-terminal ($\alpha 16$, $\alpha 17$ y $\beta 4$), (Y. Chao *et al*, 2006). También es importante destacar otras dos estructuras que se pueden observar en la estructura tridimensional de la proteína PTPA. Una de ellas es un hendidura que se produce entre los dominios centrales y superior; y la otra es un bolsillo aminoacídico cargado

negativamente que se produce entre el dominio central y el de conexión (Chao Y, *et al* 2006).

MAPEO FUNCIONAL DE LAS DIFERENTES REGIONES DE PTPA

PTPA es una ATPasa o también se puede definir como una peptidil-prolina isomerasa. Se encuentra altamente conservada en la gran mayoría de las especies eucariotas superiores. Tras comprobar la secuencia proteica de PTPA en unas cuantas especies se puede ver que 68 Aas son invariables en todas ellas (Figura nº2). La posición de los mismos son representados en la estructura tridimensional que presenta la proteína tras el plegamiento proteico (Figura nº3). En estudios posteriores se ha caracterizado la función de algunos de esos residuos conservados mediante la realización de mutaciones puntuales en algunos de ellos; y posteriormente analizar el comportamiento del activador en experimentos *in vitro* e *in vivo*. En particular esos residuos se encuentran localizados alrededor del bolsillo aminoacídico que presenta la proteína entre los dominios centrales y de conexión (Figura nº3). Los análisis realizados sugieren que dicho bolsillo presenta un importante papel en el funcionamiento de PTPA y que la superficie contigua podría estar implicada en la unión con la subunidad catalítica de PP2A (Chao Y, *et al* 2006).

a) Superficie de contacto entre PTPA y PP2A

El activador PTPA preferentemente se une al dímero de PP2A A-C (Cayla *et al*, 1990 y Van Hoof *et al* 1994). Como se describió anteriormente el dímero de PP2A A-C forma un complejo estable con el activador PTPA en un wildtype, independientemente de la presencia de ATP o Mg²⁺ (Chao Y, *et al* 2006).

5 mutantes puntuales de este activador (V209D, E270A, V281D, G90D y M294D) presenta una interacción reducida o nula con el complejo dimérico. El posicionamiento de estas mutaciones sobre la estructura proteica, nos describe un área de interacción con PP2A que se encuentra entre el dominio superior y el de conexión (Chao Y, *et al* 2006).

b) La actividad ATPásica de PTPA

La actividad ATPásica parece depender de la interacción producida con el dímero PP2A A-C. Esta actividad puede ser bloqueada por la presencia de ácido akadaico, el cual es conocido por ser un potente inhibidor de la subunidad catalítica de PP2A (Van Hoof *et al* 1994 y Bialojan *et al* 1988). Para comprender un poco mejor el papel que presentan algunos de estos residuos tan conservados, se analizaron unos mutantes puntuales en 18 de ellos. En 10 de ellos se muestra una actividad ATPásica comprometida o es prácticamente indetectable (R148L, D150A, H155A, A204D, G205D, V209D, E270A, V281D, G290D y M294D). Estas mutaciones pueden agruparse en dos grupos diferentes (Fig. 5D). El primero de ellos está constituido por 5 mutaciones (V209D, E270A, V281D, G290D y M294D) en el que parece que no se produce interacción con el complejo dimérico. Sugiriendo esto que la interacción entre PTPA y PP2A A-C es requerida para la actividad ATPásica.

Mientras que el otro grupo de mutaciones (R148L, D150A, H155A, A204D y G205D) no afecta a la interacción con el complejo dimérico PP2A A-C. Este último grupo de mutaciones se encuentra localizado del bolsillo aminoacídico entre el dominio central y el de conexión. El análisis realizado demostró que la unión de PTPA con PP2A es necesaria, pero no suficiente para que se lleve a cabo una actividad ATPásica; y que unos cuantos residuos del bolsillo de PTPA contribuyen directamente a que se produzca dicha actividad. El análisis estructural de PTPA nos sugiere que en ese bolsillo estructural se pueda producir la unión del ATP necesaria para este proceso (Chao Y, *et al* 2006).

3.2.3 Mecanismo de regulación de PP2A

La regulación del complejo de PP2A se puede clasificar en dos tipos diferentes: Aquella que es realizada mediante modificaciones posttraduccionales y el otro tipo es aquella en la que se produce mediante la asociación con otras proteínas.

a) Mediante modificaciones posttraduccionales

FOSFORILACIÓN

La subunidad catalítica del complejo de PP2A es una de las proteínas más conservadas, en concreto un extremo de la región C-terminal TPDYFL (304-309) del mismo (Janssens V, *et al* 2001). Esta modificación posttraduccional en esta región pueden promover interacciones con las subunidades reguladoras de tipo B; contribuyendo o interfiriendo en el ensamblaje del complejo holoenzimático (Janssens V, *et al* 2008). Tanto las fosforilaciones que se producen en el residuo Thr304 como la que se produce en el residuo Tyr307 están asociadas a procesos de inactivación de PP2A (Schmitz MH, *et al* 2010 y Chen J, *et al* 1992). Mientras que la fosforilación en el residuo de Thr304 puede estar inhibiendo selectivamente el ensamblaje con la subunidad PR55/B, mientras que la fosforilación producida en Tyr307 selectivamente afecta a la interacción producida con la subunidad PR61/B' (Janssens V, *et al* 2008).

Los cambios más dinámicos en el ensamblaje del complejo holoenzimático se producen cuando se incrementan la fosforilación de las subunidad catalítica de PP2A.

CARBOXIMETILACIÓN

Otra de las modificaciones posttraduccionales que se producen en la subunidad catalítica (C) ocurre en la misma región terminal del extremo C-terminal donde se producen las fosforilaciones, en concreto es una metilación en el residuo Leu309. Esta modificación por la enzima LCMT1 (en humanos), cuya actividad es dependiente de S-adenosilmetionina (De Baere I, *et al* 1999); y es revertida por la enzima metilesterasa PME-1 (Ogris E, *et al* 1999). Deficiencia de LCMT1 en las células causa apoptosis (Lee JA, *et al* 2007 y Ortega-Gutiérrez S, *et al* 2008); y la delección de ambas enzimas muestra un fenotipo de letalidad (Lee JA, *et al* 2007 y Ortega-Gutiérrez S, *et al* 2008), sugiriendo que estas enzimas realizan funciones indispensables. Una gran cantidad de estudios realizados en diferentes modelos, han intentado poner de manifiesto la importancia que tiene el proceso de metilación de la subunidad catalítica para el correcto ensamblaje del complejo así como para la actividad fosfatasa del mismo. Concluyendo que la metilación es un requisito indispensable para la unión de la subunidad PR55/B al PP2AD (Janssens V, *et al* 2008). Mientras que para la asociación de la subunidad estructural (A), PR61/B', PR72/B'' y B''' con la subunidad catalítica no se requiere una metilación de la misma (Janssens V, *et al* 2008).

La activación y expresión de LCMT1 podría ser regulada por cambios en el metabolismo de la homocisteína, el cual podría verse afectado por la entrada directa de folato, vitamina B6 y B12 (Vafai SB, *et al* 2002). Por lo tanto, deficiencias en esas vitaminas podrían producir un incremento de los niveles de homocisteína, produciendo una disminución de la metilación de PP2A; disminuyendo así el ensamblaje con la subunidad PR55/B, contribuyendo de esta manera al desarrollo de enfermedades como el Alzheimer (Vafai SB, *et al* 2002; Sontag E, *et al* 2007 y Sontag JM, *et al* 2008) y el cáncer (Israel M, *et al* 2011).

b) Asociaciones con otras proteínas: formación de complejos holenzimáticos

INTERACCIÓN DE PME-1 Y PTPA CON LA ESTRUCTURA DE PP2A

PTPA, se encuentra codificada por el gen PPP2R4 en humanos; fue originalmente purificada e identificada como una enzima dependiente de ATP/Mg²⁺ para la realización de su actividad. Esta descrita como un regulador positivo encargado de controlar la actividad fosfotirosil fosfatasa de PP2A *in vitro* (Cayla X, *et al* 1994). Se requiere que el regulador PTPA y la subunidad catalítica (C) interaccionen para poder alcanzar la máxima actividad fosfatasa en el complejo de PP2A (Fellner T, *et al* 2003). Consistente con esta importancia, un knockdown en células de mamíferos para PTPA, parece mostrar una deficiencia en el estado de activación de PP2A (Sablina AA, *et al* 2010). Se ha visto en células de mamíferos que PTPA promueve la actividad pSer/Thr fosfatasa un complejo inactivo de PP2A; y este complejo inactivo fue copurificado junto con la enzima PME-1 (Longin S, *et al* 2004). Tanto PTPA como PME-1 son parte de un complejo mecanismo de activación y biogénesis de PP2A. Esto ha sido demostrado en levaduras, donde se requiere la unión de PTPA para la generación de una subunidad catalítica (C) activa y funcional, capaz de interaccionar con la subunidad estructural (A). En todo este proceso también interviene la regulación realizada por la enzima PME-1 (Hombauer H, *et al* 2007), la cual se une específicamente a la fracción inactiva de la subunidad catalítica (Ogris E, *et al* 1999 y Longin S, *et al* 2004). Datos cristalográficos sugieren que la interacción que se produce entre la subunidad

catalítica de PP2A y la enzima PME-1, produciendo una reorganización estructural que produce la activación de PME-1; y por otro lado promueve el desplazamiento de los iones metálicos del sitio activo de la subunidad catalítica (Xing Y, *et al* 2008). Sugiriendo así que PME-1 puede actuar inactivando a PP2A.

En levaduras se han realizado estudios más detallados para determinar cómo es el mecanismo de acción de PTPA sobre PP2A. Se observó como en cepas en las que se han eliminado PTPA, se observa un decrecimiento de la actividad de PP2A; y las subunidades catalíticas se encontraban hipometiladas, debido a la asociación que se produce entre PME-1 y la subunidad catalítica del complejo. También se ha comprobado como una delección adicional para PME-1, es estas cepas en las que se había eliminado PTPA, se observa cómo se produce una restauración de los niveles de metilación, pero no de la actividad (Hombauer H, *et al* 2007 y Fellner T, *et al* 2003). *In vivo* la subunidad catalítica (C) cuando es sintetizada de novo lo hace en una conformación inactiva (Hombauer H, *et al* 2007 y Fellner T, *et al* 2003), la cual es estabilizada por la unión de PME-1, independientemente de la actividad esterasa que ésta presenta.

También se observa en levaduras como en ausencia de PTPA la subunidad catalítica (C) presenta una conformación alterada, caracterizada por una reducción de la actividad Ser/Thr fosfatasa y un incremento de la actividad Tyr fosfatasa (indicativo de una reducción en la especificidad de sustrato), reduciendo la estabilidad proteica e incrementando la dependencia de iones metálicos para la realización de su función (Fellner T, *et al* 2007). Hasta el momento no existen evidencia de que PTPA *in vivo* actúe promoviendo la actividad tirosil fosfatasa de PP2A.

α 4 ES UN IMPORTANTE REGULADOR DE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE PP2A C

La proteína α 4 es conocida como IGBP1 (immunoglobulin- α -binding protein 1) o Tap42 en levaduras (phosphatase 2A-associated protein of 42 kDa); y constituye un complejo estable con la subunidad catalítica, independientemente de la subunidad estructural y de la reguladora (Di Como CJ, *et al* 1996; Murata K, *et al* 1997 y Inui S, *et al* 1998). La interacción que se produce entre α 4-PP2A no depende del estado de metilación de la subunidad catalítica (Chung H, *et al* 1999; Wu J, *et al* 2000 y Yoo SJS,

et al 2008). Además, se producen interacciones de $\alpha 4$ con algunas fosfatasa parecidas a PP2A, como son el caso de PP4 y PP6 (Nanahoshi M, *et al* 1999 y Chen J, *et al* 1998); y de Tap42 en levaduras con algunas fosfatasa parecidas a PP2A como son el caso de Sit4, Pph3 y Ppg1 (Di Como CJ, *et al* 1996 y Wang H, *et al* 2003). Se estima que el 2% de todas las subunidades catalíticas de levaduras, PP2A C, se encuentran unidas a Tap42; y que aproximadamente el 10% de todas las proteínas Tap42, se encuentran unidas a PP2A C (Di Como CJ, *et al* 1996).

En levaduras, la interacción de Tap42 con PP2A C es abolida por un mecanismo de fosforilación de Tap42 mediado por la ruta de rapamicina (TOR). Esta disociación con la subunidad catalítica se produce por la acción del complejo TOR-1 (Yang G, *et al* 2006).

EL REGULADOR TIPRL1 PARTICIPA EN LA BIOGÉNESIS DE PP2A

Tip41 (phosphatase 2A-associated protein of 42 kDa-interacting protein) fue descubierta en levaduras como una proteína que competía con la interacción de Tap42 con Sit4 (en humanos es el ortólogo de PP6) (Jacinto E, *et al* 2001). Tip41 muestra interacciones con diferentes subunidades reguladoras parecidas a las que constituyen el complejo de PP2A, entre las que se incluyen las propias subunidades catalíticas del mismo, Pph21/22; así como otras diferentes entre las que destacamos Sit4, Pph3 y Ppg1 (Gingras AC, *et al* 2005). En células de mamífero, TIPRL1 (o también llamado Tip41 o TIP) no se requiere la unión con Tap42 para unirse a las subunidades catalíticas de PP2A o de otras fosfatasa parecidas como son el caso de PP4 o PP6 (Gingras AC, *et al* 2005; Smetana JHC, *et al* 2007 y McConnell JL, *et al* 2007); y esta asociación es insensible a rapamicina (Smetana JHC, *et al* 2007 y McConnell JL, *et al* 2007). TIPRL1 es expresado ubicuamente como una proteína inhibidora tanto de la subunidad catalítica que se encuentre en su estado libre, como la que se encuentre formando un dímero con la subunidad estructural (Smetana JHC, *et al* 2007 y McConnell JL, *et al* 2007).

En levaduras se estima que de la cantidad total de Tip41 un 60% de las mismas se encuentran unidas a PP2A C (Ghaemmghami S, *et al* 2003).

3.3 Mecanismo de acción de PP2A en *S. cerevisiae*.

El complejo heterotrimérico de PP2A en *S. cerevisiae* se encuentra constituido por una subunidad estructural TPD3, dos subunidades catalíticas PPH21 y PPH22; y dos subunidades reguladoras CDC55 y RTS1.

Para entender el ensamblaje y regulación del complejo heterotrimérico de PP2A, es importante la interacción física que se producen entre RRD2 (es el nombre que recibe en *S. cerevisiae* el regulador de tipo PTPA), la subunidad estructural TPD3 y estos dos a la subunidad catalítica. El dímero formado por RRD2/TPD3 interacciona preferentemente con subunidades catalíticas desmetiladas e inactivas, que se encuentra unida formando un complejo PPH21-PPE1. Esta interacción entre ambas produce cambios específicos en la subunidad catalítica que desencadena una activación y una especificidad de sustrato del complejo de PP2A (Fellner T, *et al* 2003). La enzima PPE1 está controlando la interacción que se produce entre la subunidad catalítica y el complejo formado por RRD2/TPD3, a través del control que se produce sobre el estado de metilación de la subunidad catalítica. Previniendo así la formación de prematuras subunidades catalíticas activas y controlando de esta manera el ensamblaje del complejo holoenzimático (ver modelo, figura nº7).

Por otro lado la función que realiza la enzima PPM1 es un requisito indispensable para la formación de un complejo con las subunidades reguladoras (B), (Wei H, *et al* 2001 y Wu J, *et al* 2000). La enzima PPE1 regula el ensamblaje del complejo holoenzimático con la subunidad reguladora (B), mediante el mantenimiento del equilibrio entre las fracciones metiladas y desmetiladas del complejo dimérico A-C.

PPE1 regula el ensamblaje de PP2A con la subunidad reguladora de tipo B, esto es producido mediante el desplazamiento realizado entre los complejos diméricos de PP2A A-C entre las fracciones metiladas y las desmetiladas existentes en la célula. PPE1 es requerida para la formación de un complejo estable entre la subunidad catalítica (C) y TPD3-RRD2; y contrarrestar así la prematura metilación de la subunidad catalítica (C) que aún no se encuentra activada por el complejo formado por TPD3-RRD/PTPA. Defectos en la biogénesis de la subunidad catalítica (C), como consecuencia de la delección de alguno de los genes implicados en su proceso como pueden ser TPD3 o RRD2, produce acúmulos de complejos de PPE1 y subunidad catalítica (C) en su

conformación de baja actividad. Así que PPE1 para constituir un mecanismo de vigilancia que previene la prematura generación de subunidad catalítica (C) activa, en ausencia de la proteína estructural TPD3 o un prematuro ensamblaje del complejo en ausencia del activador esencial RRD/PTPA. PPE1 parece lograr dicho cometido por dos vías diferentes, mediante competición con el activador RRD2 por la unión con la subunidad catalítica (C); y más importante aún es dejando a la subunidad catalítica (C) en un estado de desmetilación y de este modo previniendo la prematura metilación que podría si no desencadenar la completa activación de subunidad catalítica (C) y promover un complejo de asociación con la subunidad de tipo B.

De esta manera una deleción de PPE1 en un fondo *tpd3Δ* supera el bloqueo en la maduración de la subunidad catalítica (C) dependiente de PPE1, a pesar de la incapacidad que tienen esas células para formar el complejo holoenzimático. Mientras que la delación de PPE1 en un fondo *rrd1Δ/rrd2Δ* se incrementa drásticamente los niveles de complejos heterotriméricos con CDC55, a pesar de que subunidad catalítica (C) se encuentre en su conformación inactiva. PPE1 constituye la primera etapa en la biogénesis de la subunidad catalítica (C), interaccionando con la recién sintetizada subunidad catalítica (C) y haciendo que esta se encuentre en una conformación de baja actividad.

RRD/PTPA se encarga de regular la biogénesis de la subunidad catalítica (C). De esta manera podemos ver que una pérdida de la proteína RRD2 conlleva a la generación de subunidades catalíticas de los complejos de PP2A y SIT4 con una actividad catalítica reducida. Así que RRD/PTPA puede jugar un papel en la generación de la conformación adecuada que requieren estas subunidades catalíticas. RRD/PTPA está descrito que presenta una actividad peptidil-prolil cis/trans isomerasa (PPIase) (Jordens J, *et al* 2006); y que se encuentra estimulada su función por la presencia de ATP/Mg²⁺, el cual podría ser responsable de propiciar el energía necesaria que se requiere para el cambio a la conformación activa de la subunidad catalítica (C). También es importante señalar aquí la función que desempeña la proteína SSB2, ribosome-associated chaperone, ya que esta posee una actividad ATPásica y juega un papel bastante importante en el plegamiento de las nuevas proteínas sintetizadas. Se

ha descubierto que forma un complejo con la subunidad estructural TPD3 (Krogan NJ, *et al* 2006). Podría esperarse que la energía necesaria para que PTPA catalizase el cambio en el plegamiento de la subunidad catalítica proviniese de la hidrólisis del ATP a través de la asociación que hace SSB2 con la subunidad estructural TPD3.

La activación que se produce de la subunidad catalítica dependiente del activador RRD2 es producida por el ensamblaje que se produce de la subunidad reguladora de tipo B, al reconocer el complejo formado por RRD2:TPD3:C como potencial sustrato de las subunidades de tipo B fosforiladas. El proceso es completado cuando la metilación de la subunidad catalítica desestabiliza la interacción de RRD2; y al mismo tiempo se estabiliza la interacción con las subunidades reguladoras de tipo B.

3.4 Elementos constituyentes del complejo de PP2A en *S. pombe*

Mucho de los elementos integrantes del complejo de PP2A en *S. pombe* se descubrieron y se le asignó una función mediante la comparación de secuencias con otros organismos modelos como es el caso de *S. cerevisiae*. El complejo de PP2A en la levadura de fisión se encuentra constituido por una subunidad estructura (A), Paa1. Es el único elemento del complejo cuya delección hace que las células no sean viables. También encontramos dos subunidades catalíticas (C), Ppa1 y Ppa2. La primera de ellas es la minoritaria y presenta una localización nuclear, mientras la otra presenta una localización tanto nuclear como citoplasmática (Kinoshita K, *et al* 1996).

Las subunidades reguladoras son las que le proporcionan especificidad de sustrato y tienen una localización subcelular diferencia entre ellas. Estas se pueden dividir en subunidades reguladoras de tipo B, Pab1. Esta subunidad reguladora se localiza en el citoplasma y participa en el mantenimiento y establecimiento de la polaridad celular regulando la forma celular (Kinoshita K, *et al* 1996); y se encarga de regular el proceso de citoquinesis, siendo un regulador negativo de la cascada de señalización de inicio de la septación (Kinoshita K, *et al* 1996 y Lahoz A, *et al* 2010).

También encontramos en *S. pombe* dos subunidades de tipo B', Par1 y Par2 (Jiang W, *et al* 2000). La primera de ellas se localiza en el citosol, el SPB y en la zona de

división. Par1 se encuentra implicada en procesos de respuesta a estrés y en el proceso de septación, siendo un regulador negativo del inicio de la cascada de iniciación de dicho proceso (Jiang W, *et al* 2001; Le Goff X, *et al* 2001 y Krapp A, *et al* 2003). La otra subunidad de tipo B' está formada por la proteína Par2, la cual tiene una localización diferente al otro miembro integrante de las reguladoras de tipo B'. Acumulándose en las zonas activas e crecimiento, en los extremos y en la zona de división, pero describiéndose para ambas las mismas funciones celulares (Jiang W, *et al* 2000 y Jiang W, *et al* 2001)

Mediante análisis de homología de secuencias también se encontró otros elementos implicados en la regulación del complejo de PP2A, como es el caso de los reguladores de tipo PTPAs. En *S. pombe* hay dos tipos de proteínas reguladoras pertenecientes a esta clase, Ypa1 e Ypa2 (Goyal A, *et al* 2012 y Bernal M, *et al* 2012). Ypa2 o Pta2, el otro nombre por el que le conoce, participa en la regulación de la citoquinesis y la morfogénesis (Goyal A, *et al* 2012 y Bernal M, *et al* 2012).

II. OBJETIVOS

Objetivos

Numerosas evidencias genéticas sugieren un papel importante de la fosfatasa PP2A en la regulación de la morfogénesis en *S. pombe*, sin embargo, el mecanismo mediante el cual PP2A regula este proceso es desconocido. Por tanto el objetivo general de esta tesis ha sido:

1. La caracterización de la función de PP2A en la morfogénesis de *S. pombe*

2. Objetivos concretos:

1. Caracterización de los defectos de polaridad del mutante *pta2*, un activador de las subunidades catalíticas de PP2A.
2. Búsqueda de sustratos de PP2A mediante geles bidimensionales (2D-DIGE) e inmunoprecipitación del complejo.
3. Disección de la función de PP2A en la regulación de la ruta MOR.

III. RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

**REGULACIÓN DE LA MORFOGÉNESIS EN LA
LEVADURA DE FISIÓN MEDIANTE EL
ACTIVADOR DE PP2A PTA2.**

1.1. Caracterización de los defectos de polaridad de las deleciones simples de los genes *pta1* y *pta2*

Las proteínas tipo PTPAs (*Phosphotyrosine Phospho Activator*) fueron inicialmente propuestas como proteínas que conferían capacidad fosfotirosina al complejo PP2A. En ausencia PTPA y en experimentos *in vitro*, el complejo PP2A poseía capacidad de defosforilar pNPP (*p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt*) un pequeño sustrado usado en ensayos *in vitro* como sustrato de fosfatasas. Posteriormente se determinó que esta actividad fosfotirosina no tenía lugar sobre péptidos que contenían un residuo fosfotirosina. Estos experimentos, junto con experimentos de mutagénesis dirigida de la subunidad catalítica de PP2A, permitieron demostrar que las subunidades tipo PTPA funcionan en el correcto plegamiento de las subunidades catalíticas; y que en ausencia de este correcto plegamiento una apertura en el sitio activo de la subunidad catalítica permitía reconocer *in vitro* sustratos no específicos como el pNPP (Fellner T, *et al* 2003).

En nuestro laboratorio iniciamos la caracterización de las dos subunidades tipo PTPA presentes en el genoma de *S. pombe* que denominamos *pta1* y *pta2*. El análisis mediante microscopía DIC (*Differential Interference Contrast*) de los fenotipos de las cepas *pta1Δ* y *pta2Δ* reveló defectos en el establecimiento de polaridad celular y en el mantenimiento de la integridad celular. Ambos fenotipos fueron más penetrantes a baja temperatura.

Puesto que distintas subunidades tipo PTPA pliegan a distintas subunidades catalíticas, algunas del complejo PP2A y otras el complejo TAP42, un complejo dimérico formado por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. En primer lugar determinamos cuál de las dos subunidades era responsable de activar las subunidades catalíticas de PP2A, realizamos un experimento de inmunoprecipitación del complejo PP2A. Para ello marcamos la subunidad estructural del complejo, Paa1 (Kinoshita K, *et al* 1996) con el epítipo PK en el extremo C terminal. Esta fusión se expresó desde el locus endógeno de Paa1 y bajo el control de su propio promotor (Figura 1A). La proteína de fusión resultó ser funcional, juzgado por la ausencia de

fenotipos observables. Posteriormente se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpos frente al epítipo PK de extractos proteicos procedentes de esta cepa (Paa1-PK) y de la cepa control sin marcar (silvestre). Los extractos de ambas cepas fueron resueltos en geles de poliacrilamida-SDS de gradiente (4%-15%) que fueron teñidos con nitrato de plata para visualizar las proteínas inmunoprecipitadas (Figura 1B). Los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron por cuatriplicado y las bandas que aparecían en la cepa Paa1-PK y no en el control fueron identificadas mediante espectrometría de masas (Figura 1B y Figura 1C).

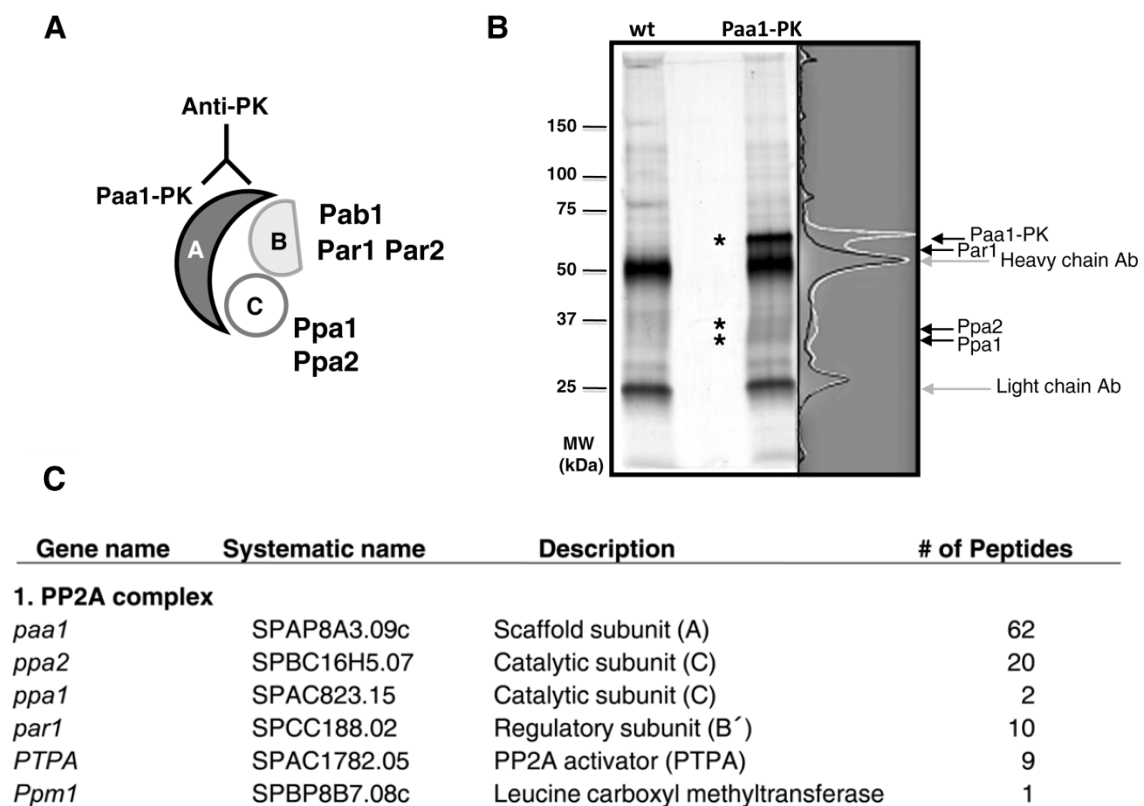


Figura 1. Identificación de proteínas asociadas con la subunidad Paa1 del complejo de PP2A.

A) Esquema de la composición del complejo de PP2A en *S. pombe*. **B)** Proteínas coimmunoprecipitadas con la subunidad estructural Paa1, marcada con el epítipo PK. Estas proteínas se resolvieron en un SDS-PAGE y se detectaron usando una tinción de plata. Se usaron dos condiciones, la calle de la izquierda era la condición no marcada y usada como control con la que se compararon las bandas que aparecían en la calle de la izquierda. **C)** Proteínas co-inmunoprecipitadas con Paa1 que forman parte del complejo de PP2A. En la tabla se indica el nombre del gen, el nombre sistemático, la descripción de la función y el número de péptidos encontrados para cada uno.

Entre las proteínas identificadas, además de la subunidad estructural Paa1, con la que habíamos realizado la inmunoprecipitación, también identificamos otros componentes del complejo de PP2A. Las subunidades catalíticas mayoritaria y minoritaria de PP2A Ppa1 y Ppa2, respectivamente (Kinoshita N, *et al* 1993); la subunidad reguladora de tipo B', Par1 (Jiang W, *et al* 2000 y Le Goff X, *et al* 2001), Ppm1, una leucina carboximetil-transferasa, que en otros organismos se requiere para el ensamblaje y a la actividad el complejo de PP2A (Wei H, *et al* 2001; Wu J, *et al* 2000 y Cayla X, *et al* 1990), y SPAC1782.05c, el ortólogo en *S. pombe* del regulador de tipo PTPA.

La comparación de la secuencia de SPAC1782.05 con el genoma de *S. cerevisiae* reveló que SPAC1782.05 era el ortólogo de RRD2/YPT2 mientras que SPAC4F10.04 estaba más emparentado a RRD1/YPT1 (Rempola B, *et al* 2000 y Van Hoof C, *et al* 2005). En *S. cerevisiae*, RRD2/YPA2 es requerido para la actividad y correcta especificidad P-Ser/P-Thr de la subunidad catalítica del complejo de PP2A; y se asocia *in vivo* con las dos subunidades catalíticas PPH21 y PPH22; así como con las subunidad estructural TPD3 (Fellner T, *et al* 2003). RRD1/YPA1 se requiere, sin embargo, para la activación de otras fosfatasas parecidas a PP2A, como es el caso de Sit4, con la cual presentan interacciones físicas y genéticas (Fellner T, *et al* 2003; Van Hoof C, *et al* 2005 y Mitchell DA, *et al* 2001).

Por tanto, la subunidad PTPA que se asocia al complejo PP2A en *S. pombe* es SPAC1782.05, que partir de ahora denominamos Pta2.

1.2. *pta1* y *pta2* son homólogos a los activadores del complejo de PP2A, RRD1/YPA1 y RRD2/YPA2, en *S. cerevisiae*

El genoma de *S. cerevisiae* contiene dos genes parálogos codificante para dos miembros de familia PTPA, RRD1/YPA1 y RRD2/YPA2 (Rempola B, *et al* 2000 y Van Hoof C, *et al* 2005). Además en *S. pombe* se ha identificado un nuevo gen relacionado con dicha familia, SPAC4F10.04, se ha encontrado por homología de secuencia al compararlas con las secuencias existentes. Este nuevo gen muestra un 36% de

identidad en su secuencia aminoacídica con respecto a la anteriormente identificada en el experimento de inmunoprecipitación, SPAC1782.05.

Haciendo un análisis de comparación de secuencia de las PTPAs en *S. pombe* con las secuencias ortólogas en *S. cerevisiae*, vemos que SPAC1782.05 guarda un mayor grado de identidad con RRD2/YPA2, mientras que SPAC4F10.04 lo guarda con RRD1/YPA1 (Figura 2A y 2B).

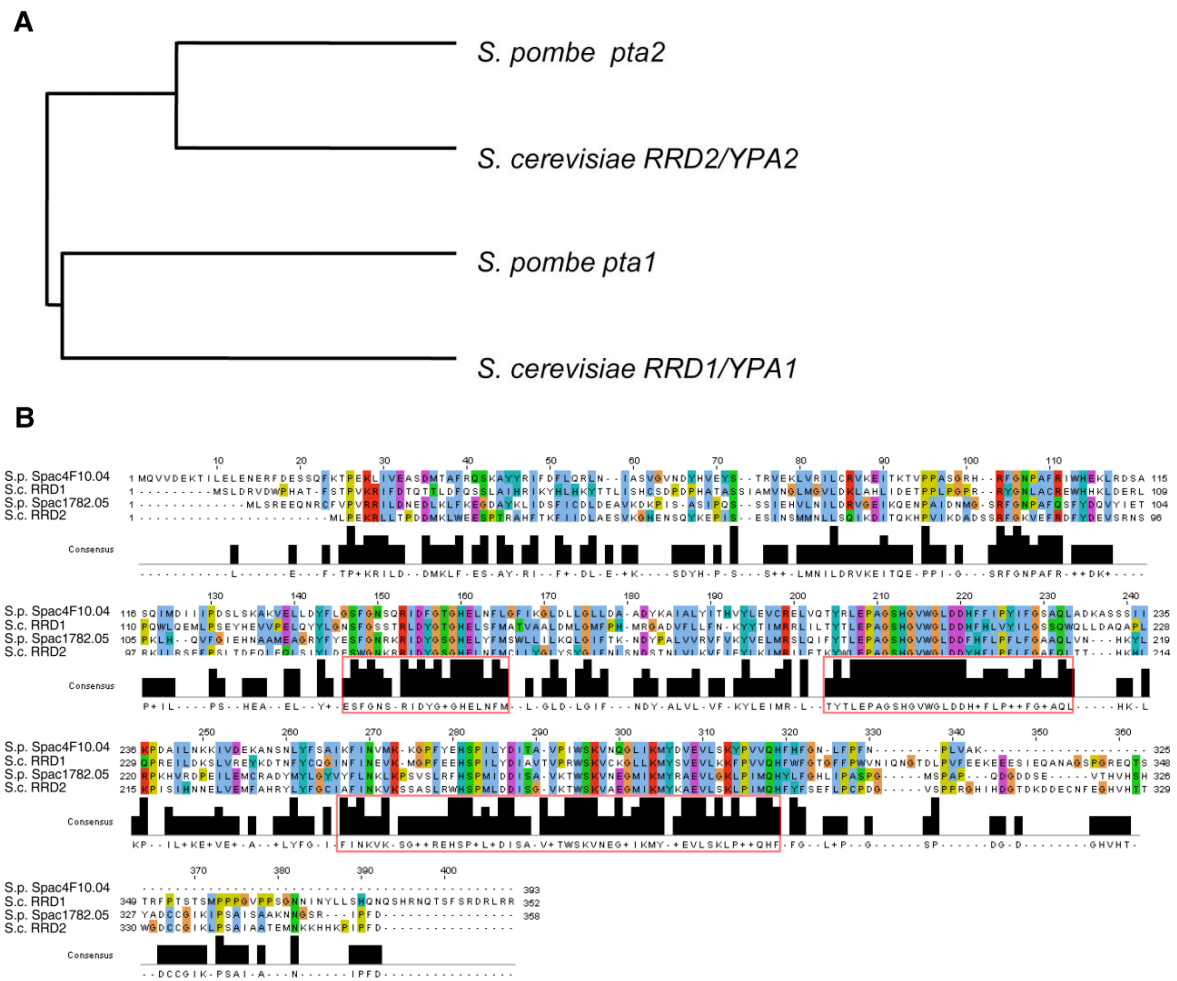


Figura 2. Los miembros la familia PTPAs de *S. pombe* son a los activadores RRD1/YPA1 y RRD2/YPA2 en *S. cerevisiae*.

A) Cladograma en el que se muestra las dos secuencias similares de los dos genes de PTPA que encontramos en los genomas de *S. pombe* y *S. cerevisiae*. **B)** Analisis de Clustal de los activadores del complejo de PP2A en *S. pombe* y *S. cerevisiae*. En los que se ha hecho un alineamiento de la secuencia proteica de Pta1 y Pta2 comparandolos con RRD1/YPA1 y RRD2/YPA2. Los regiones marcadas con un cuadrado rojo se corresponde con los tres dominios más conservados presentes en todos los miembros de la familia las PTPAs. En negro se muestran las regiones concenso entre las secuencias comparadas.

En *S. cerevisiae*, RRD2/YPA2 es requerido para la actividad y correcta especificidad P-Ser/P-Thr de la subunidad catalítica del complejo de PP2A; y se asocia *in vivo* con las dos subunidades catalíticas PPH21 y PPH22; así como con las subunidad estructural TPD3 (Fellner T, *et al* 2003). En contraposición RRD1/YPA1 para la activación de otras fosfatasa parecidas a PP2A, como es el caso de Sit4, con la cual presentan interacciones físicas y genéticas (Fellner T, *et al* 2003; Van Hoof C, *et al* 2005 y Mitchell DA, *et al* 2001).

Teniendo en cuenta el alto grado de similitud que muestra SPAC1782.05 con RRD2/YPA2; y el hecho de encontrar asociado SPAC1782.05 al complejo PP2A, sugiere que SPAC1782.05 es el ortólogo en *S. pombe* de RRD2/YPA2 y los denominamos pta2 (*Phospho Tyrosine Activator-2*) mientras que SPAC4F10.04 sería el ortólogo de RRD1/YPA1 y lo denominamos pta1.

Basados en que los defectos de morfogénesis del mutante *pta2Δ* eran más penetrantes que los de *pta1Δ* decidimos caracterizar al mutante *pta2Δ* en primer lugar.

1.3. Localización subcelular de Pta2

Para entender mejor el papel que tiene Pta2 en *S. pombe* marcamos con GFP (*Green Fluorescent Protein*) en la región C terminal de la misma y expresado bajo su propio promotor. La fusión resultante no presentaba ningún fenotipo y las células eran indistinguibles de las de un silvestre. Pta2-GFP localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, mostrando algo más de enriquecimiento en éste último (Figura 3). Resultados similares se obtuvieron cuando expresamos Pta2-GFP desde un plásmido multicopia y expresión moderada (nmt41x). Por tanto, la localización que presenta Pta2 es similar a la de otros componentes del complejo de PP2A como es el caso de la subunidad catalítica mayoritaria Ppa2, o de la subunidad de tipo B, Pab1 (Kume K, *et al* 2011; Jiang W, *et al* 2000 y Lahoz A, *et al* 2010).

Pta2 también localiza formando unos focos discretos en el citoplasma. Estos focos son muy poco intensos y su fluorescencia se desvanece rápidamente por lo que

es difícil caracterizar sus propiedades. Un análisis preliminar de estos focos sugiere se mueven en línea recta y a una velocidad aproximada de $0,7 \mu\text{m}/\text{min}$, una velocidad que del mismo orden que vesículas secretoras moviéndose por cables de actina por la acción de miosinas tipo V (ref).

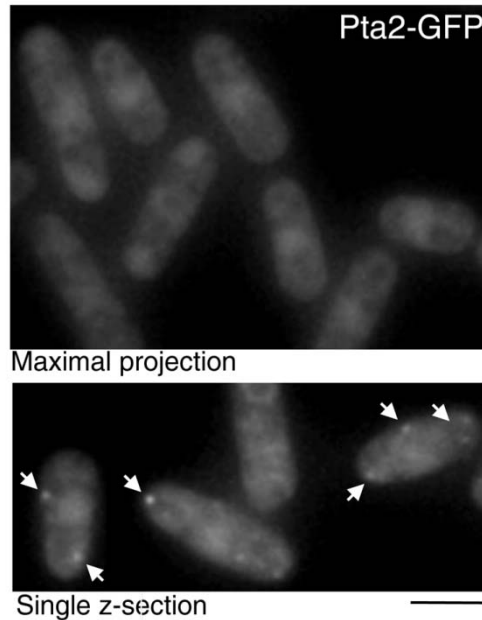


Figura 3. Localización subcelular de Pta2.

Localización citoplasmática y nuclear de Pta2-GFP y expresada bajo su propio promotor endógeno. En el panel de arriba se muestra una proyección máxima y en el inferior un único plano medial en Z. Las flechas indican la localización citoplasmática de focos discretos de Pta2. La barra de escalas representa $5 \mu\text{m}$.

Por tanto la localización de Pta2 es consistente con su posible función como regulador de PP2A. Sin embargo, la localización en focos discretos no había sido descrito con anterioridad para ningún componente del complejo PP2A, posiblemente debido a la baja intensidad que presentan. Futuros experimentos trataran de caracterizar en mayor detalle estos focos así como su posible colocalización con otros componentes del complejo PP2A, como las subunidad catalíticas. Formalmente y con los datos de que disponemos, no podemos descartar que la función de Pta2 en estos focos sea independiente de PP2A.

1.4. Caracterización del fenotipo del mutante *pta2Δ*

Para caracterizar la función de Pta2 en *S. pombe* generamos una delección del gen mediante el reemplazamiento de su ORF (*Open Reading Frame*) por el marcador *ura4⁺*. La delección resultó ser viable, pero las células presentan un morfología alterada con respecto a una cepa silvestre. Al igual que ocurre en *S. cerevisiae* la letalidad que presenta el doble mutante *rrd1Δrrd2Δ* se produce en *S. pombe* cuando eliminamos a la vez los correspondientes homólogos.

La delección de *pta2* resultó ser viable, pero las células *pta2Δ* presentaban defectos morfológicos que oscilan desde un fenotipo periforme, con células que presentan un estrechamiento de las puntas y una pérdida parcial de la polaridad, hasta células que presentan un fenotipo más redondeado de pérdida de polaridad (Figura 4).

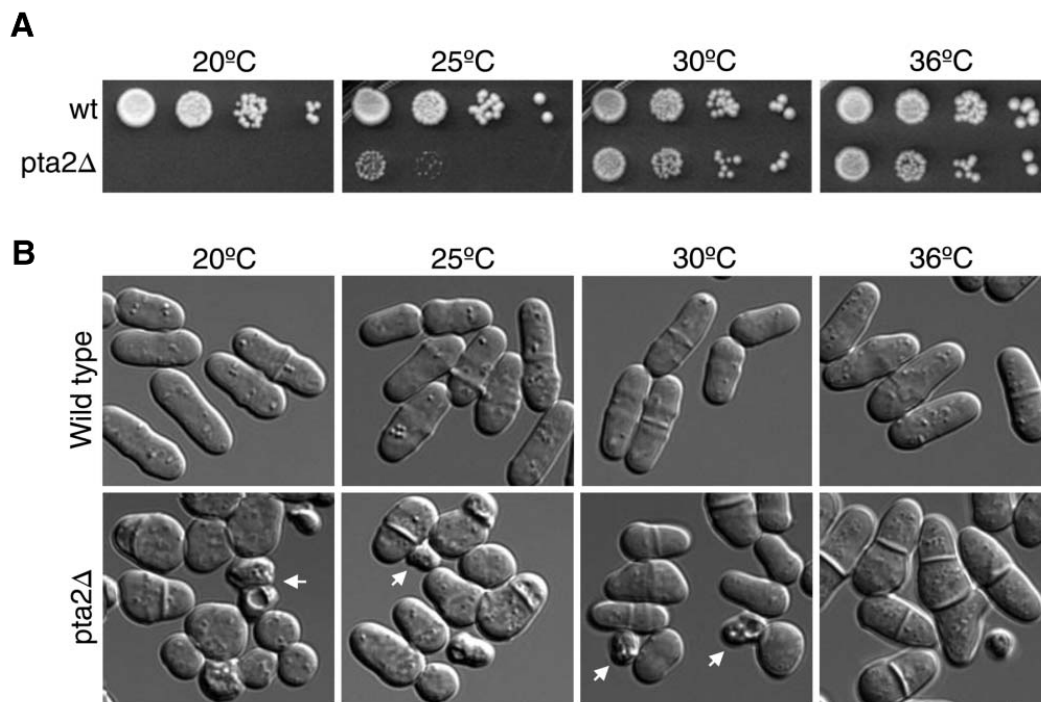


Figura 4. Fenotipo del mutante *pta2Δ* a diferentes temperaturas.

A y B) Ensayo en gota e imágenes en DIC, respectivamente, de un wildtype y un *pta2Δ* creciendo en medio rico a las temperaturas indicadas. La barra de escala representa 5 μm.

Estos fenotipos resultaron ser más penetrantes a bajas temperaturas (Figura 4A y 4B). Además de los defectos de forma, *pta2Δ* presentaba una reducción en la tasa de crecimiento (no mostrado), una alta frecuencia lisis (38% de lisis a 20°C, n=193), (Figura 5A) y una acumulación de células septadas. Mientras los defectos de morfogénesis, de viabilidad y de lisis celular eran más penetrantes a baja temperatura (Figura 4A, 4B y 5A), los defectos de separación celular aumentaban a altas temperaturas (hasta un 44% en *pta2Δ*, n=255 versus 14% del silvestre, n=221) (Figura 5A y 5B).

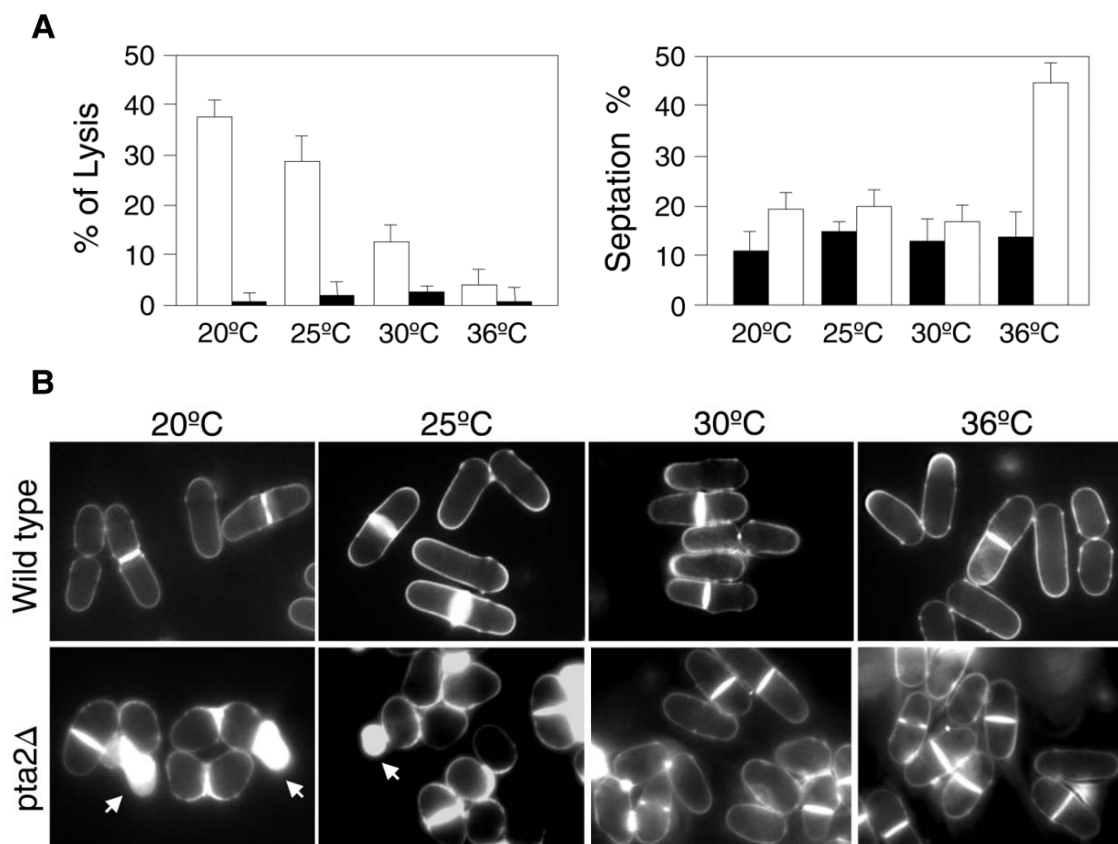


Figura 5. Cuantificación de la lisis y septación en las células de *pta2Δ*.

A) Porcentaje de células lisadas y septadas a las temperaturas indicadas, de las cepas silvestre (negro) y *pta2Δ* (blanco) **B)** Tinción de calcofluor de las células de un silvestre, en el panel superior; y de un *pta2Δ*, en el panel inferior; a las temperaturas indicadas. Las flechas indican células lisadas tras la división. La barra de escala representa 5 μm .

Para caracterizar en más detalle el fenotipo de lisis celular del mutante *pta2Δ*, determinamos, por un lado si la lisis de *pta2Δ* era suprimida por sorbitol; y por otro realizamos experimentos de video microscopía para determinar si la lisis ocurría preferentemente en algún momento del ciclo celular (muchas de las células lisadas aparecían en parejas). Los resultados mostraron que la lisis de *pta2Δ* no era suprimida por sorbitol (Figura 6A) y que esta lisis ocurría durante la contracción del anillo de actomiosina en citocinesis (Figura 6B nueva).

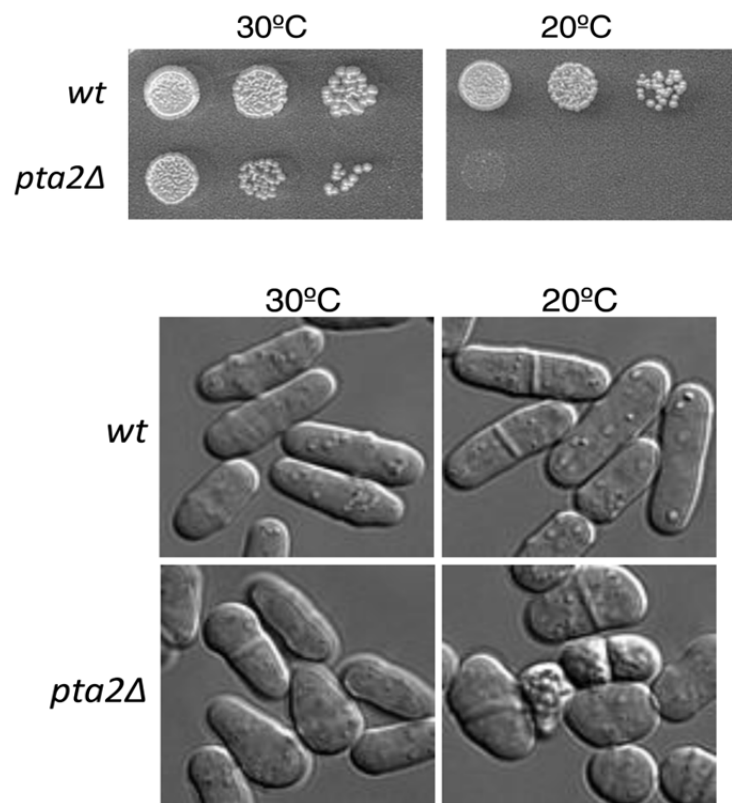


Figura 6. El fenotipo de sensibilidad al frío de *pta2Δ* no es suprimido por sorbitol.

En el panel de arriba se muestra un ensayo en gota de un wildtype y un *pta2Δ* crecidos en medio rico con 1 M de Sorbitol. En el panel de abajo se muestran unas imágenes de DIC en la misma condiciones a las que se ha realizado en ensayo de gota. La escala de barras representa 5 μm.

1.5. Pérdida parcial de polaridad en las células de *pta2Δ*

Con objeto de determinar si los defectos morfológicos que presentan las células de *pta2Δ* se debe a una desorganización del citoesqueleto, analizamos el citoesqueleto de actina y el de microtúbulos mediante tinción de faloidina conjugada con rodamina y con anticuerpos antitubulina respectivamente.

El citoesqueleto de microtúbulos (MTs) en las células de *pta2Δ* es aparentemente normal, con MTs que se distribuyen en haces a lo largo del eje longitudinal en una disposición similar a la cepa silvestre. En las células con morfología periforme y en las que presentan un fenotipo más redondeado los MTs se encuentran más desorganizados, posiblemente como consecuencia de una alteración de la forma de la célula (Daga *et al* 2007) (Figura 7).

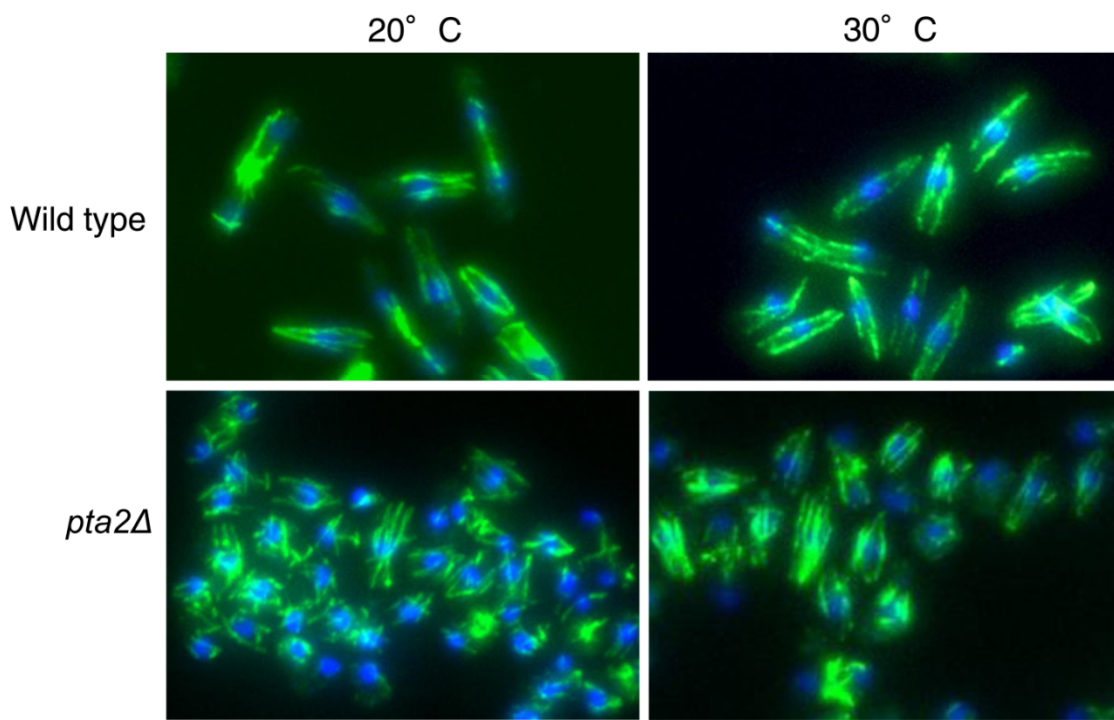


Figura 7. Citoesqueleto de microtúbulos en las células de un silvestre y un *pta2Δ*.

Inmunofluorescencia de células silvestres y de la cepa *pta2Δ* mostrando el citoesqueleto de microtubulos en condiciones de 20°C y 30°C. Las células fueron teñidas con DAPI para el marcaje del núcleo. Las imágenes mostrados son máximas proyecciones y la barra de escalas representa 5 μ m.

La organización del citoesqueleto de actina, sin embargo, aparece significativamente alterada en las células de la cepa *pta2Δ* con respecto a la cepa control encontrándose o bien, más desorganizados alrededor de todo el perímetro celular en células más redondeadas, o bien hiperpolarizados en la región que posiblemente coincide con el sitio de crecimiento, en células con morfología periforme. Ambos fenotipos coexisten en las dos temperaturas ensayadas, pero se observa más desorganización del citoesqueleto de actina a baja temperatura y más hiperpolarización a 30°C, (Figura 8A), (Marks J, *et al* 1985). El número y la intensidad de los cables de actina en la cepa *pta2*, sin embargo, fue similar a la cepa control, (Figura 8A y 8B).

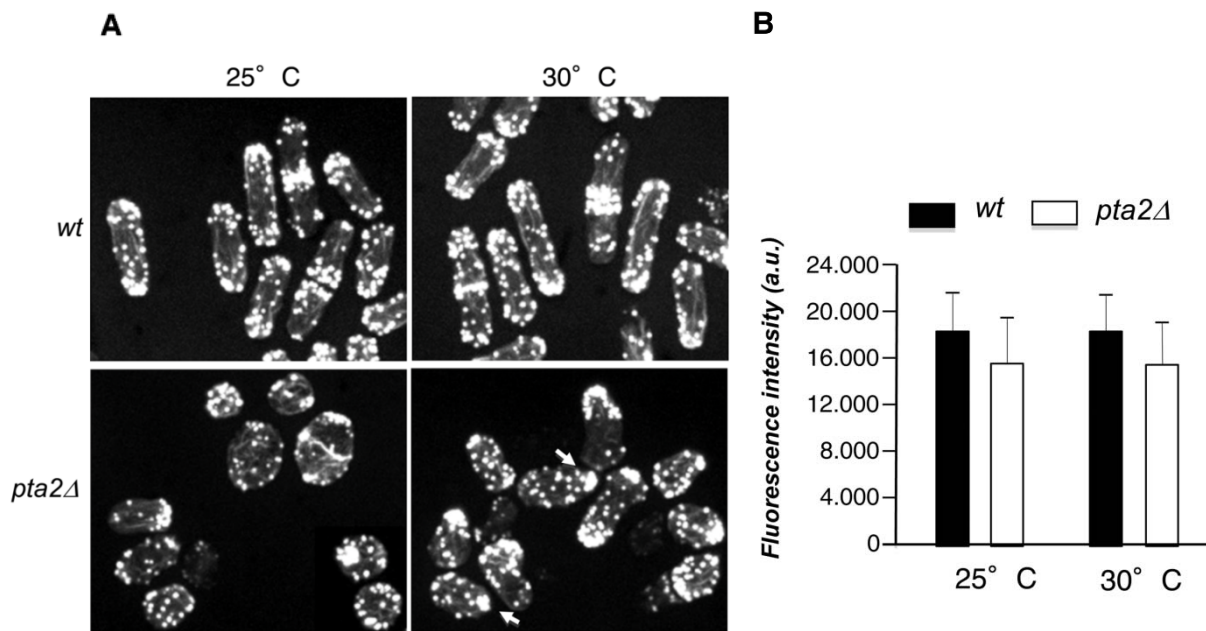


Figura 8. *pta2* es requerido para la polarización del citoesqueleto de actina.

A) Tinción de los microfilamentos de actina en la cepa *pta2* y silvestre mediante faloidina conjugada con Alexa fluor 488 a las temperaturas indicadas. La barra de escala representa 5 μ m. **B)** Cuantificación de la intensidad de los cables de actina entre ambas cepas en las mismas condiciones experimentales.

Por tanto, comprometiendo la actividad fosfatasa de PP2A mediante la delección de *pta2*, resulta en una deficiente organización del citoesqueleto de actina.

Con objeto de caracterizar los defectos de forma del mutante *pta2Δ* y determinar la causa de la desorganización del citoesqueleto de actina, analizamos la localización subcelular de factores clave para el proceso de polarización celular. Para ello se analizó en un fondo genético *pta2Δ* la localización del factor de polaridad Tea1 que marca los sitios de crecimiento, de la formina For3, responsable de nuclear los microfilamentos de actina, así como del regulador de Cdc42, Rga4 responsable de restringir el crecimiento a las puntas; y la propia localización de Cdc42 activo, que en condiciones silvestre está restringida a las puntas. La localización de Cdc42 activo se realizó mediante la expresión de la construcción CRIB-GFP. CRIB (*Cdc42 and Rac Inractive Binding*) hace referencia al dominio de las proteínas efectoras que se une a Cdc42-GTP (activo). Este dominio fue definido inicialmente en las kinasas de la familia PAK (Thompson *et al* 1998).

A la temperatura óptima de crecimiento de *pta2Δ* (30°C) tanto Tea1-GFP como For3-GFP muestran una localización polarizada y Rga4-GFP se encuentra parcialmente excluido de las puntas donde localiza Cdc42 activo (CRIB-GFP) (Figura 9). Sin embargo, a baja temperatura, donde los defectos morfogénesis en ausencia de *pta2* son más evidentes, a pesar de que la localización de Tea1 seguía siendo polarizada, la formina For3 se encontraba parcial o totalmente despolarizada, aunque es frecuente la presencia de células con For3 concentrado en un pequeño dominio aparente de hiperpolarización celular (Figura 9). Los dominios de Rga4 también estaban alterados de forma significativa, encontrándose células en las que el dominio Rga4 tapizaba o bien todo el cortex celular o la mayoría del mismo. En este último caso Rga4 queda excluida solo de un pequeño dominio, donde parece localizar For3 (Figura 9).

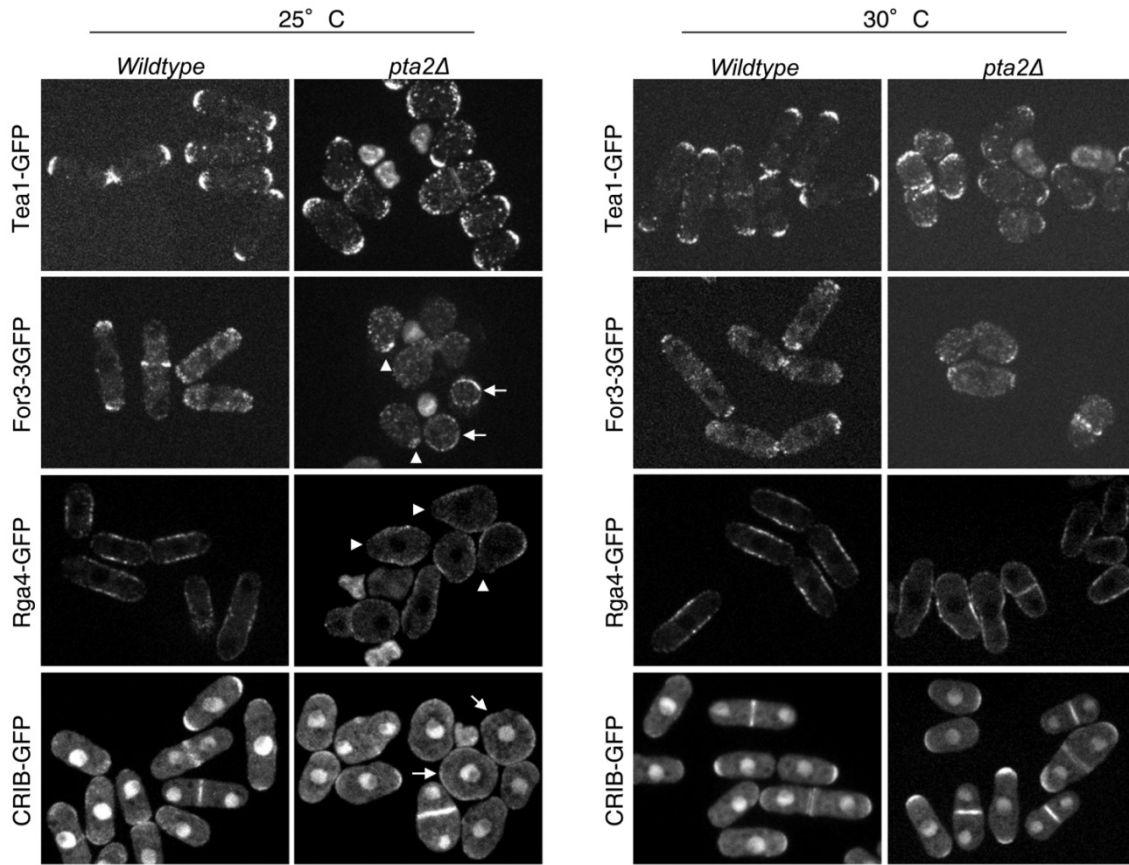


Figura 9. Localización subcelular de los marcadores de polaridad en un wildtype y en *pta2Δ*.

Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se observa la localización subcelular de algunos marcadores de polaridad fusionados a GFP en las células de un wildtype y un *pta2Δ*, crecidas a 25°C y 30°C, respectivamente. Las imágenes tomadas para Tea1-GFP, For3-GFP y CRIB-GFP son máximas proyecciones, mientras que para Rga4-GFP son imágenes en el plano medio. Las flechas blancas indican células depolarizadas, y los triángulos blancos muestran células hiperpolarizadas en un extremo. La barra de escala representa 5 μm .

Por tanto el análisis de la localización de marcadores subcelulares de polaridad, sugiere que PP2A se requiere para el correcto posicionamiento de los sitios de crecimiento, posiblemente regulando algunos de los factores que restringen el crecimiento a las puntas. En ausencia de *pta2*, y por tanto comprometiendo la función de PP2A, se produce una alteración espacial de los dominios de crecimiento.

1.6. PP2A-Pta2 el establecimiento de las zonas activas de crecimiento durante el ciclo celular

En *S. pombe* además de un control espacial del crecimiento, existe un control temporal del mismo que está coordinado con la progresión por el ciclo celular. Después de cada división las células crecen de forma monopolar hasta NETO, donde se inicia el crecimiento bipolar. Para determinar si PP2A también tiene una función en el control temporal de la morfogénesis, analizamos el patrón de crecimiento del mutante *pta2Δ* mediante vídeo microscopía DIC a 30°C. Se puede observar como dicha temperatura la mayoría de las células se encuentran polarizadas (Figura 4B y 5B).

A diferencia del patrón característico de la cepa silvestre (Mitchison JM, *et al* 1985) (Figura 10A), las células de *pta2Δ* presenta un patrón de crecimiento alterado, en el que una de las células hijas crece de manera monopolar por el extremo viejo, mientras que otra célula hija crece de manera bipolar desde el comienzo del ciclo celular (Figura 10A, 10B y Vídeo S1, S2). Este comportamiento distinto entre las dos células hijas se observó en el 76% de las divisiones de las células *pta2Δ* analizadas (n=41 células), en el 24% de las divisiones restantes, ambas células hijas crecieron de manera monopolar mayoritariamente por el extremo viejo (Figura 10B).

Análisis de linajes celulares de la cepa *pta2Δ* mostró que el 100% (n=17) de la descendencia de las células monopolares presenta un patrón bipolar/monopolar, mientras que cuando la célula progenitora creció de forma bipolar, sólo el 50% (n=16) de la descendencia presenta el patrón mayoritario, bipolar/monopolar (Figura 10C). En el 100% de las células analizadas (n=84) la célula bipolar correlacionó con la presencia de la marca (scar) de una división previa. Este fenotipo solo se ha descrito hasta el momento en el mutante *for3Δ*, que carece de cables de actina (Feierbach *et al* 2000). La presencia de células con crecimiento bipolar desde el inicio del ciclo celular también ha sido descrito en ausencia del regulador de Cdc42, Rga4, en este caso o una o las dos células hijas crecen de forma bipolar desde el inicio (Das *et al* 2009).

Sorprendentemente, las células monopolares bipolares entran en mitosis con diferente tamaño. Las células bipolares se dividen con un volumen un 15% superior al de las células hermanas que han crecido de manera monopolar ($115 \pm 10 \mu\text{m}^3$, $n=21$ para las células bipolares; y $97 \pm 14 \mu\text{m}^3$, $n=14$ para las células monopolares. Figura 10D). Siendo éste el primer ejemplo descrito hasta el momento en la levadura de fisión, en que las dos células hijas entran en mitosis con un tamaño diferente después de una división simétrica.

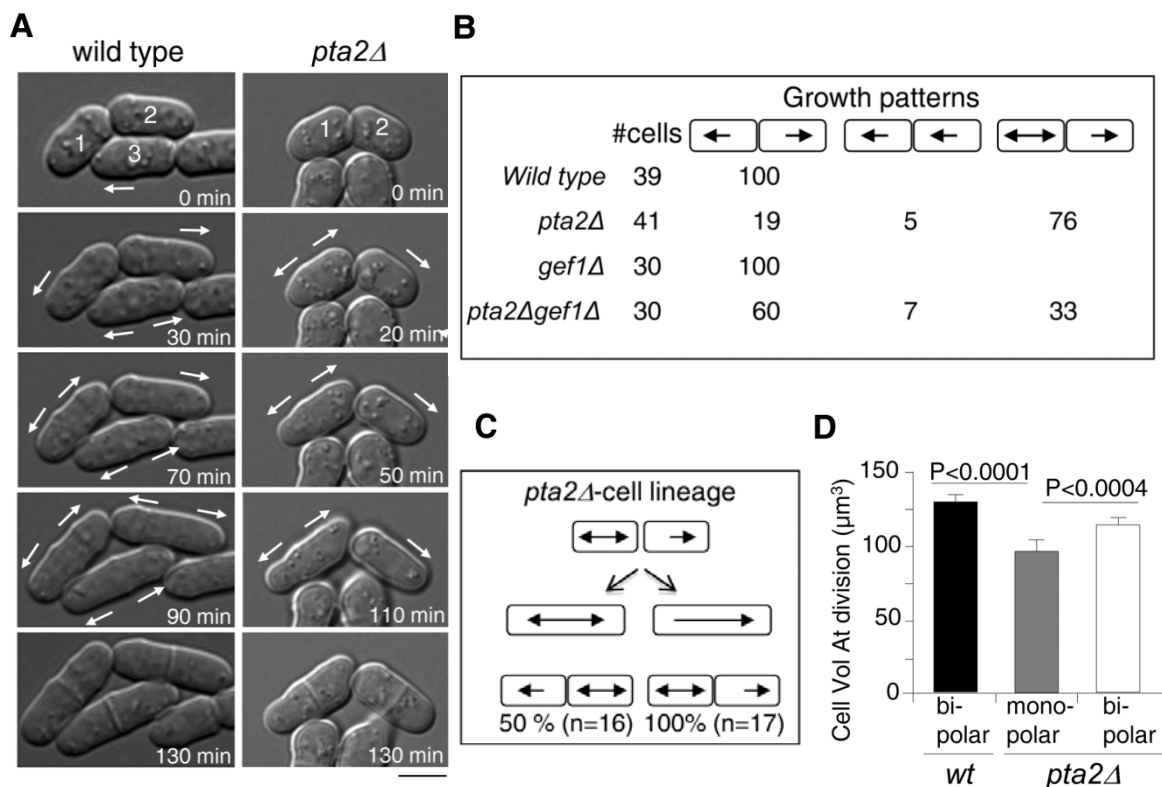


Figura 10. Las células *pta2Δ* presentan cambios en el patrón de crecimiento.

A) Imágenes en DIC de video-microscopía de células de silvestres y de *pta2Δ*. Las imágenes fueron tomadas cada 10 minutos a 30°C en medio rico. Las fechas indican la dirección del crecimiento celular. **B)** Representación esquemática de varios patrones de crecimiento tras la división y el porcentaje de células que muestra cada patrón en las cepas indicadas. **C)** Representación esquemática del linaje que presentan los dos tipos celulares que presenta la cepa *pta2Δ*. **D)** Gráfica en la que se muestra el tamaño de entrada en mitosis de un silvestre, de las células monopolares y de las bipolares de *pta2Δ*, crecidas a 30°C en medio rico. La barra de escala representa 5 μm .

Con objeto de determinar si la diferencia en el tamaño de entrada en mitosis de las células monopolares y bipolares del mutante *pta2Δ* se debía a una alteración en el tiempo de entrada en mitosis o a una descoordinación entre la tasa de crecimiento y el

ciclo celular, analizamos el tiempo medio de un ciclo celular, así como la tasa de crecimiento de ambos tipos celulares. Este análisis puso de manifiesto que las células bipolares presentan una tasa de crecimiento de $0,041 \pm 0,003 \mu\text{m min}^{-1}$, (n=10), las células monopolares crecen a una tasa de $0,029 \pm 0,005 \mu\text{m min}^{-1}$, (n=10) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 11B y 11C). El tiempo de entrada en mitosis, sin embargo, fue similar en ambas tipos células, $161 \pm 38 \text{ min}$, (n=21); en las monopolares y $148 \pm 29 \text{ min}$, n=10, en las bipolares ($p < 0,5$) (Figura 11A).

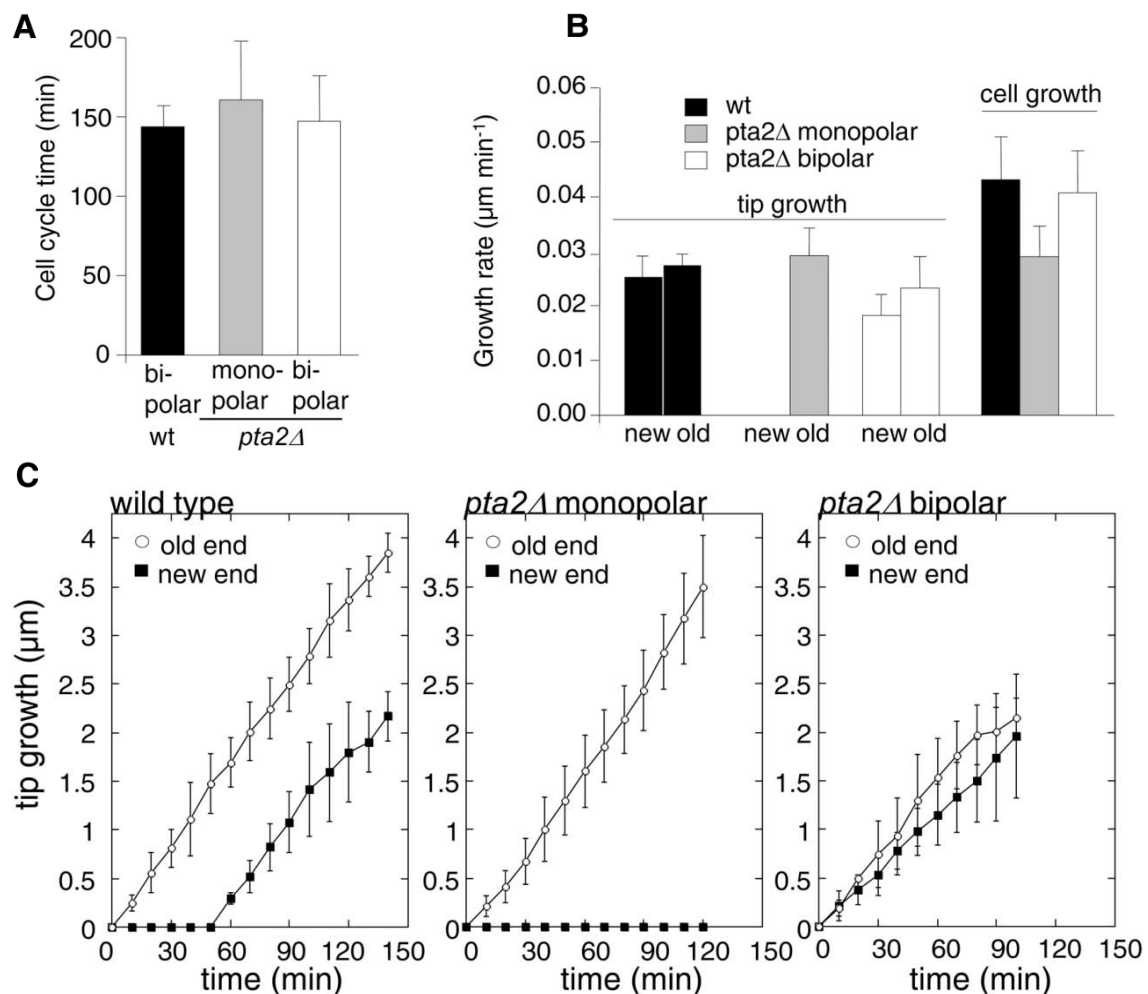


Figura 11. Cinética y velocidad de crecimiento de las células de *pta2Δ*.

A) Gráfica de barras en la que se muestra la duración del ciclo celular en célula silvestres y en células monopolares y bipolares de la cepa *pta2Δ*. **B)** Representación gráfica de la tasa de crecimiento de cada una de las puntas de células de un silvestre wildtype, en las y de células monopolares y bipolares de la cepa *pta2Δ*. **C)** Representación de las cinéticas de crecimiento de cada una de las puntas. Las mediciones se realizaron a partir de imágenes de video microscopía realizada a temperatura constante de 30°C y en medio rico (YES).

La prematura entrada en mitosis de las células de *pta2Δ* (Figura 10A y 10D) nos recuerda al fenotipo tanto de la subunidad catalítica como a la subunidad reguladora de tipo B de la fosfatasa PP2A (Jimenez J, *et al* 1994 y Kinoshita N, *et al* 1990).

Es conocido la implicación de PP2A en la regulación de la entrada en mitosis a través de la regulación de la fosfatasa Cdc25 tanto en *S. cerevisiae* como en organismos superiores (Clarke PR, *et al* 1993 y Pal G, *et al* 2008). En *S. pombe* tanto la delección de la subunidad catalítica, como de la subunidad reguladora *pab1*, adelantan la entrada en mitosis y son sintéticos letales en ausencia de la quinasa Wee1 (Jimenez J, *et al* 1994 y Kinoshita N, *et al* 1990), sugiriendo que esta función de regulación de mitosis está también conservada en este organismo. El adelanto de la entrada en mitosis del mutante *pta2Δ* es consistente con una función activadora de Pta2 sobre PP2A. Para determinar si *pta2* también interacciona genéticamente con *wee1* construimos el doble mutante *pta2Δ wee1-50* (Figura 12), siendo *wee1-50* una alelo termosensible de esta quinasa. En condiciones restrictivas el doble mutante resultó ser sintético letal (Figura 12A). Mediante video microscopía pudimos determinar que esta letalidad se debía aparentemente por una prematura entrada en mitosis (Figura 12B).

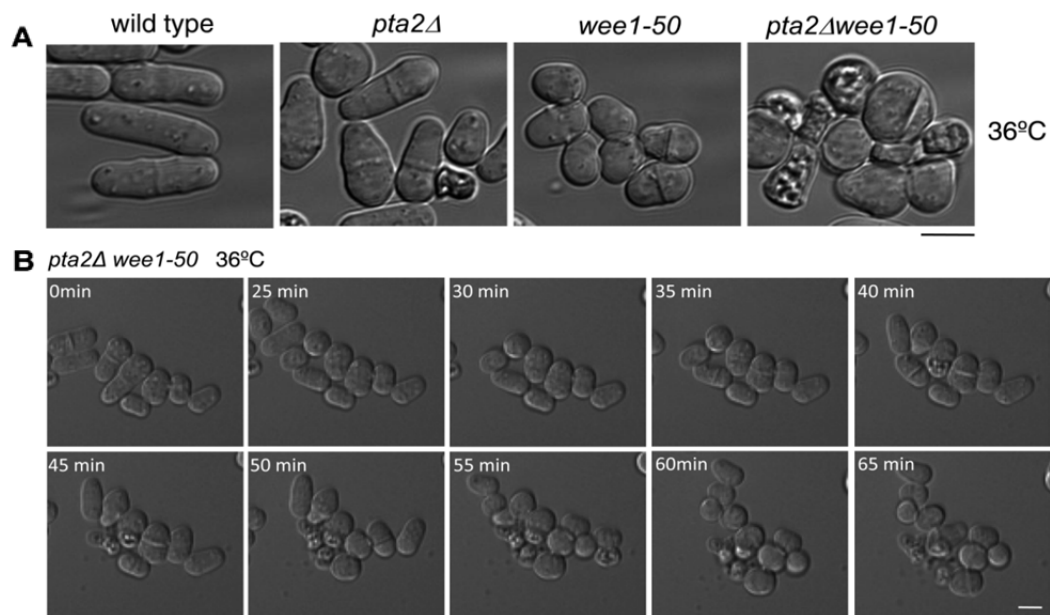


Figura 12. Letalidad sintética de la cepa *pta2Δ wee1-50* a 36°C.

A) Imágenes en DIC de las cepas indicadas incubadas 6 horas a 36°C. **B)** Representación de un time-points en el que cepa *pta2Δwee1-50* es incubada a 36°C desde tiempo cero. Las imágenes fueron capturadas a intervalos de 5 minutos a una temperatura constante de 36°C. La barra de escala representa 5 μm en A y B.

En resumen, la delección de *pta2* presenta defectos de morfogénesis, una desregulación de la entrada en mitosis y defectos de citocinesis y lisis celular. Como se ha mencionado anteriormente, es conocida la implicación de PP2A en el control temporal tanto de la entrada a la mitosis, como de la citocinesis (Jimenez J, *et al* 1994 y Kinoshita N, *et al* 1990, Lahoz *et al* 2010 y Goyal A, *et al* 2012). Sin embargo, la función molecular de PP2A en morfogénesis aún se desconoce. Por ello, decidimos centrar el trabajo en el estudio de la función de PP2A en la morfogénesis de *S. pombe*.

1.7. Interacciones genéticas entre Pta2 y los factores de polaridad celular

El control espacial del ensamblaje de microfilamentos de actina depende de factores de polaridad depositados por los MTs (Mata J, *et al* 1997). Puesto que el citoesqueleto de MTs presentaba una disposición aparentemente normal en la cepa *pta2Δ*, determinamos si los defectos de morfogénesis de *pta2* eran aditivos a la ausencia de los factores de polaridad Tea1 y Tea4, depositados en las puntas por los MTs y que desencadena la activación de For3 produciendo la nucleación de los filamentos de actina (Martin SG, *et al* 2005). En ausencia de estos factores, *S. pombe* crece de manera monopolar (Mata J, *et al* 1997; Tatebe H, *et al* 2005 y Martin SG, *et al* 2005), (Figura 13A), pero mantienen la forma cilíndrica.

Para comprobar si los defectos que presenta *pta2Δ* en el establecimiento de la polaridad celular son aditivos o epistáticos a la delección de *tea1* y *tea4*, se generan dobles mutantes de dichos genes en un fondo *pta2Δ*. En ambos casos, los dobles mutantes fueron viables, pero presentaban graves defectos de crecimiento y una pérdida casi total de polaridad (Figura 13A y 13B).

El proceso de polarización celular requiere además de la función de los citoesqueleto de actina y MTs, de la ruta de morfogénesis (MOR). Esta ruta está gobernada por una serie de quinasas asociadas a la membrana y su función se requiere para la correcta activación de Cdc42, un regulador universal de la morfogénesis. Puesto que la deficiencia de PP2A resultó ser deletérea tanto en combinación con

defectos de factores de polaridad Tea1 y Tea4, como en ausencia de cables de actina. Quisimos determinar si la función de PP2A podría ocurrir mediante la regulación de Cdc42 o alguno de sus reguladores (Figura 13C)

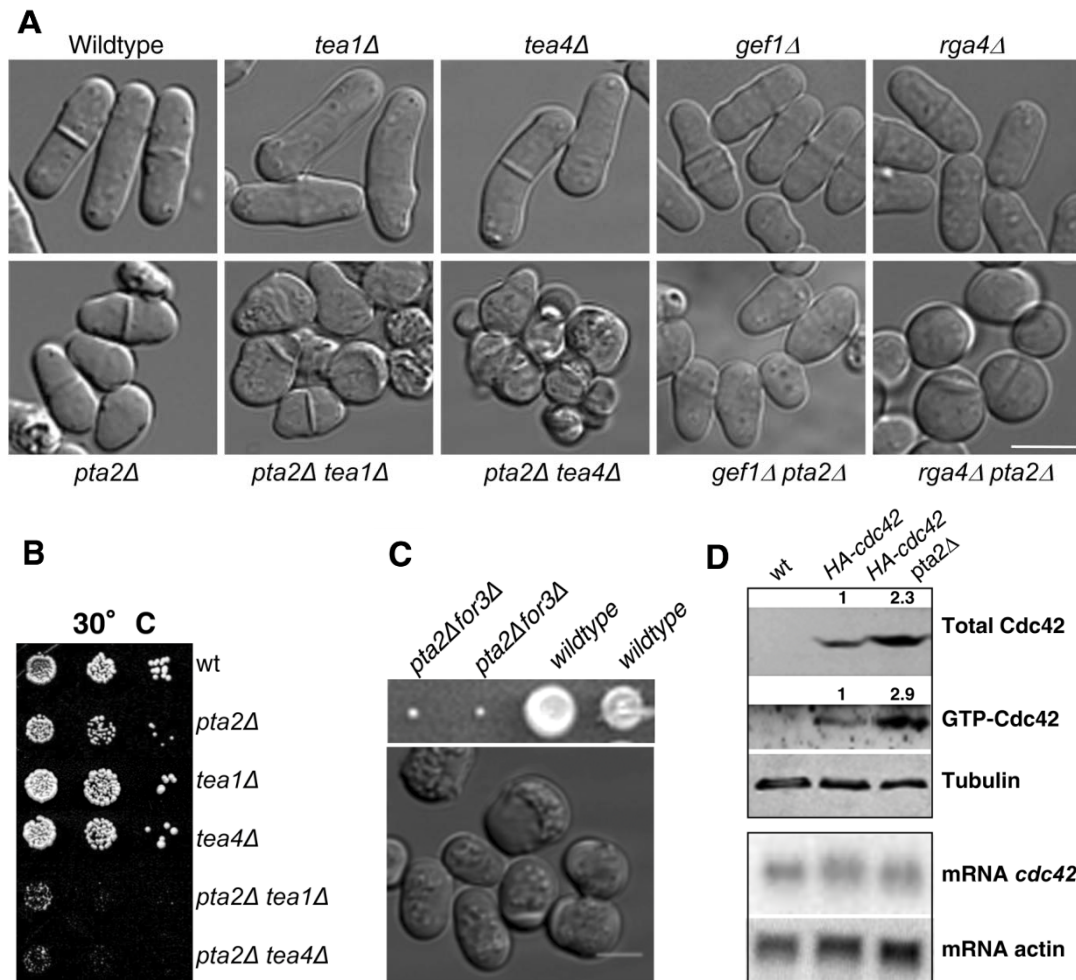


Figura 13. La deficiencia de PP2A-pta2D es aditiva a los factores de polaridad *tea1* y *tea4* Los defectos de la polarización celular en las células de *pta2Δ* son aditivos a la delección de algunos factores de polaridad.

A) Imágenes de DIC en las que se observa el fenotipo de los parentales y los dobles mutantes crecidos a 30°C en medio rico. **B)** Ensayo en gota de los parentales y los dobles mutantes indicados. **C)** En la parte superior, se muestran los cuatro productos meióticos procedentes del cruce *pta2Δ* y *for3Δ*. En la parte inferior, se observa el fenotipo de las microcolonias que forman los dobles mutantes *pta2Δfor3Δ*. **D)** En la parte superior, se muestra un Western blot con los extractos totales de un wildtype, en la que no tiene marcado nada, como control negativo, de HA-Cdc42 y un *pta2Δ* HA-Cdc42. El GTP cuando se encuentra unido a Cdc42 presenta una gran afinidad por la construcción GST-CRIB, que la expresamos en bacterias para realizar el ensayo de afinidad. Se utilizó un anticuerpo anti-HA para detectar la cantidad de Cdc42, tanto total como la fracción unida a GTP. Se utilizó anti-tubulina como control de carga. Los números indican la cantidad relativa que presentan las bandas comparadas con respecto al control HA-Cdc42. En la parte inferior, se muestra un Northern blot en los que se observan los niveles de RNAm de Cdc42 y de Actina, como control de carga, en los mismos fondos genéticos en los que se ha realizado el Western blot. La barra de escala representa 5 μm.

1.8. PP2A regula los niveles Cdc42

Cdc42 es el factor clave en el proceso de polaridad celular, y mutantes de *S. pombe* en *cdc42* en presentan una morfología anormal (Miller PJ, *et al* 1994 y Etienne-Manneville S, *et al* 2004; Arellano M, *et al* 1996; Martin SG, *et al* 2007 y Rincón SA, *et al* 2009). Cdc42 es una GTPasa, y su actividad está regulada en *S. pombe* por los GEFs Gef1 y Scd1 y por el GAPs Rga4 y Rga6 (Pilar Pérez comunicación personal). En su forma activa, Cdc42-GTP activa a la formina For3 que ensambla cables de actina requeridos para dirigir el tráfico intracelular de vesículas hacia los sitios de crecimiento y por otro lado participa en el anclando de las vesículas del exocisto transportadas por los propios cables de actina (Bendezu FO, *et al* 2011 y Estravis M, *et al* 2011 *ref cerevisia*, Chang F, *et al* 2003; Tatebe H, *et al* 2008; Das M, *et al* 2007 y Rincon S, *et al* 2007).

Para determinar si los defectos de morfogénéticos de PP2A eran aditivos o epistáticos a la deficiencia de los reguladores de Cdc42, Gef1 y Rga4, se realizaron dobles mutantes entre *pta2Δ* y la delección simple de ambos reguladores. Mientras el doble mutante *pta2Δgef1Δ* presentaba un fenotipo similar a la delección simple de *pta2Δ*, el doble mutante *pta2Δrga4Δ* presentaba una pérdida total de la polaridad celular (Figura 13A). El análisis del patrón de crecimiento del doble mutante *pta2Δgef1Δ* reveló sin embargo una cierta supresión del fenotipo de crecimiento bipolar después de la división (Figura 10A) sugiriendo que parte de los defectos en el establecimiento de la polaridad celular podría estar mediada por una desregulación de Cdc42. Ni *gef1Δ* ni *rga4Δ* suprimieron, por otro lado la sensibilidad que presenta *pta2Δ* a baja temperatura.

Decidimos entonces cuantificar los niveles de Cdc42 totales y activo en la cepa *pta2Δ* en una cepa silvestre. Los niveles de Cdc42 activo se pueden determinar mediante un ensayo de inmunoprecipitación del dominio PBD fusionado a GST expresado en bacterias. Este dominio une preferentemente la forma activa de Cdc42 (Bernad V, *et al* 1999). Tanto los niveles de Cdc42 totales como activo estaban incrementados en la cepa deficiente en actividad PP2A (Figura 13D). Para determinar si este incremento en los niveles totales de Cdc42 ocurrían a nivel transcripcional

realizamos un northern blot para determinar los niveles de ARNm de Cdc42 en una cepa *pta2Δ* relativo a una cepa silvestre. El resultado de este experimento no mostró cambios significativos en los niveles de ARNm en un *pta2Δ* en comparación con los de un silvestre (Figura 13D). Este resultado fue verificado mediante PCR cuantitativa (dato no mostrado).

CAPÍTULO 2:

BUSQUEDA DE SUSTRATOS DE LA FOSFATASA

PP2A

Nuestros datos genéticos y bioquímicos sugieren una función de PP2A en morfogénesis, posiblemente regulando a Cdc42 o a alguno de sus reguladores. En este segundo capítulo describimos las dos aproximaciones complementarias que hemos usado para buscar sustratos de PP2A a nivel proteómico, que puedan estar relacionados con los defectos de morfogénesis descritos en el capítulo anterior. En la primera estrategia usamos geles bidimensionales para identificar cambios en el proteoma de mutantes de PP2A, para ello, comparamos los proteomas de una cepa silvestre, de una deleción de *pta2*; y de *pab1-4*, una mutación puntual de la subunidad reguladora tipo B de PP2A. En la segunda identificamos, mediante inmunoprecipitación, proteínas que interaccionan con el complejo PP2A. En ambos casos usamos espectrometría de masas para identificar las proteínas de interés.

2.1. 2D-DIGUE

2.1.1. Análisis proteómico de los mutantes de PP2A mediante 2D DIGUE

Para analizar cambios en el proteoma en condiciones de deficiencia de función PP2A, se recogieron extractos proteicos solubles de una condición silvestre y de dos mutantes independientes del complejo de PP2A, *pta2Δ* y *pab1-4*. Siendo Pta2 un activador de la subunidad catalítica de PP2A y Pab1 una subunidad reguladora tipo B, cuya deficiencia presenta, como *pta2Δ*, defectos en morfogénesis. Las tres condiciones experimentales se compararon dos a dos mediante la técnica 2D-DIGE. Esta técnica consiste en un marcaje diferencial de todas las proteínas totales de un extracto y su posterior separación mediante geles bidimensionales. En la primera fase se produce una separación de las proteínas en función de su punto isoelectrico (pI) y en la segunda en función de su masa. En total se corrieron 6 geles independientes, cada uno de ellos conteniendo dos condiciones experimentales marcadas con un fluoróforo diferente Cy3 y Cy5; y un marcaje con Cy2 usado como control interno para todos los geles. El control Cy2 se realiza mezclando equitativamente todas las réplicas biológicas de todas las condiciones experimentales ensayadas (Tabla M1, ver apartado de Materiales y

Métodos). Por tanto, cada proteína detectada en el gel es comparada con su correspondiente control interno en las cuatro réplicas biológicas realizadas (Figura 14).

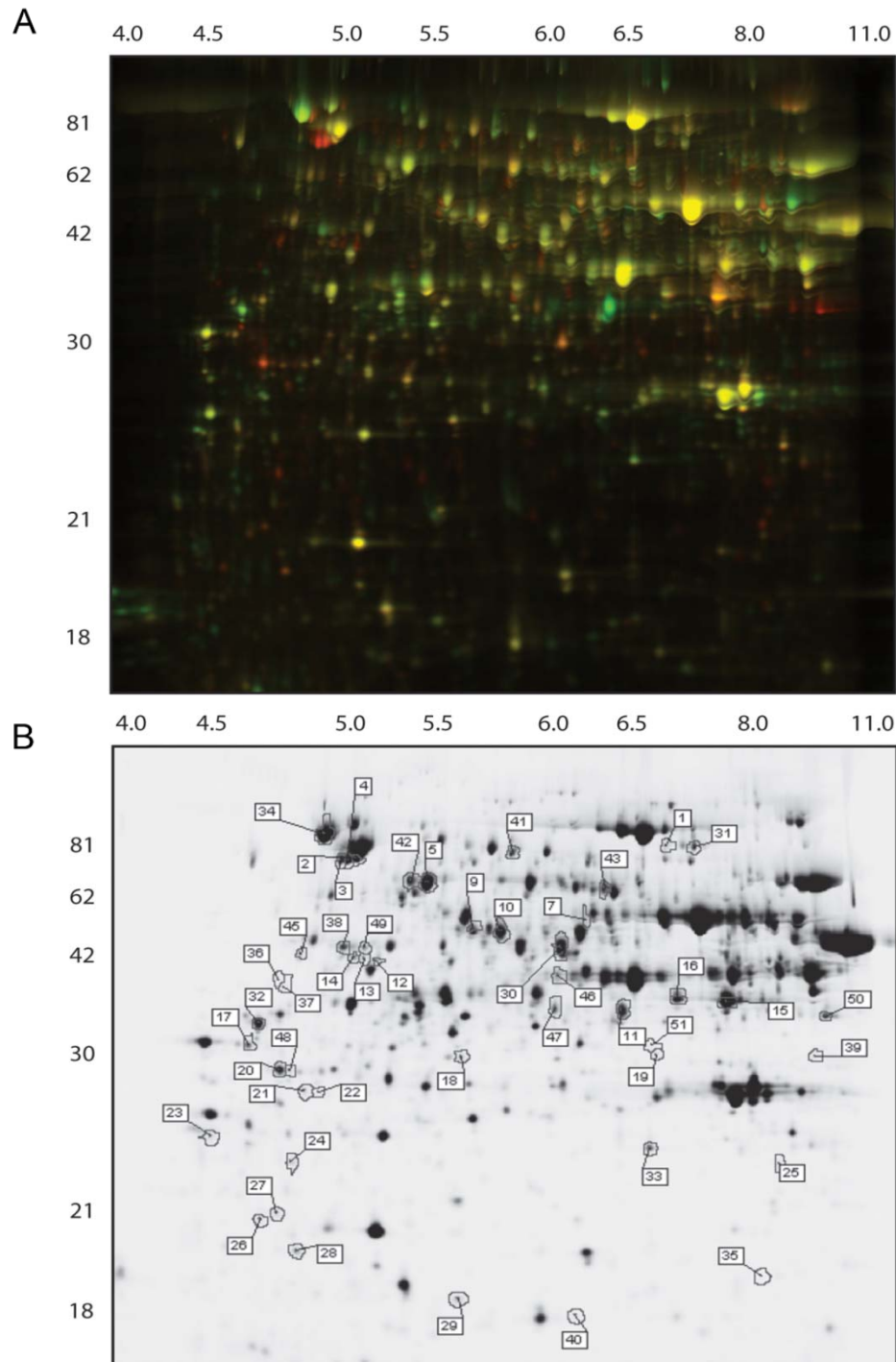


Figura 14. Cambios detectados dependientes de la actividad de PP2A en el proteoma de *S. pombe* mediante análisis de 2D-DIGE.

A) Extractos proteicos y resueltos en un gel 2D procedentes de las células de una cepa silvestre marcado con Cy3 (verde) y de la cepa *pab1-4* marcado con Cy5 (rojo) **B)** Tinción de plata del mismo gel. Los números encuadrados, marcan aquellos spots que presentan una diferencia de al menos dos veces entre la cepa control silvestre y los mutantes de PP2A. Los pesos moleculares y el punto isoeléctrico aproximados se encuentran indicados en la parte la izquierda y en la parte superior de la figura respectivamente.

Empleando esta metodología, se detectaron 2174 péptidos diferentes (spots) de manera reproducible en todos los geles. Aunque cada spot detectado no tiene que representar una proteína, (muchos pueden corresponder a isoformas de una misma proteína o incluso a subproductos de degradación, ver más adelante) el número total de puntos detectados representa alrededor del 40% del proteoma de *S. pombe* (Lackner D. H, *et al* 2012 y Wood V, *et al* 2002), (Figura 15A).

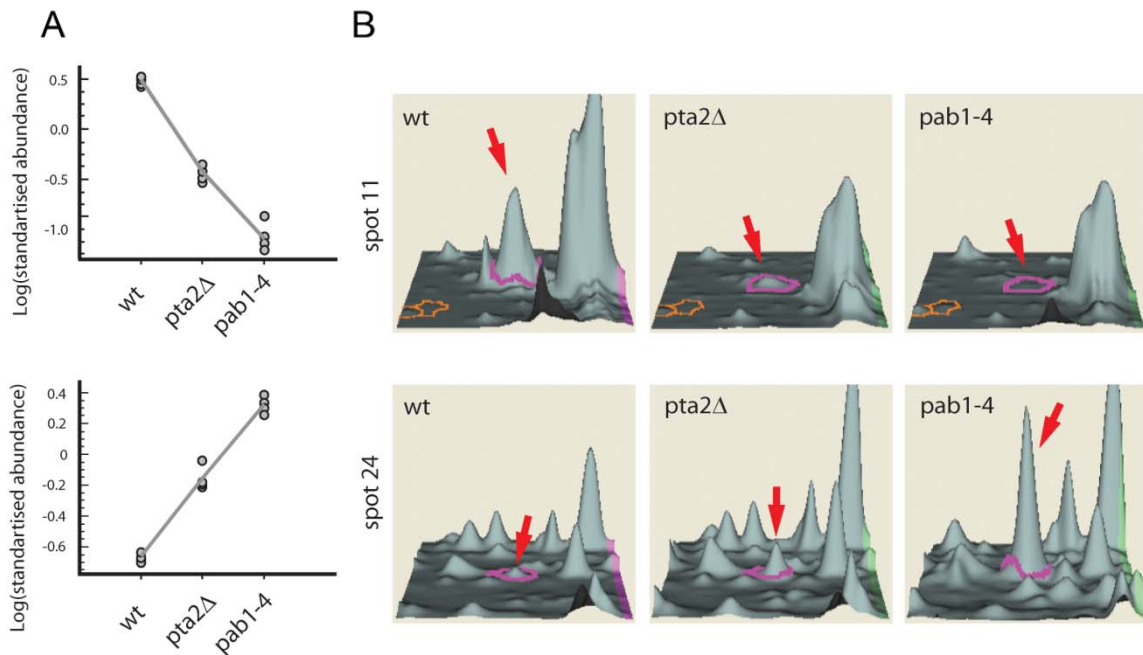


Figura 15. Ejemplos de spots que cambiaron su abundancia relativa entre el wildtype y los mutantes de PP2A.

A) La representación de la abundancia relativa de la proteína para cada réplica biológica en cada una de las cepas muestra una elevada reproducibilidad entre geles independientes **B)** Representación tridimensional de la densidad de los spots muestra un decrecimiento para el spot 11 y un incremento para el spot 24, como muestran las flechas rojas.

El análisis del nivel de significación estadística de las diferencias entre las distintas cepas analizadas se realizó con el software DeCyder, y se seleccionaron aquellos spots que mostraban un cambio en la abundancia de la proteína de al menos dos veces entre la condición silvestre y uno o ambos mutantes de PP2A con $p < 0.05$ (Figura 15B). Posteriormente, 55 de los spots marcados por el programa Decyder y que fueron bien detectados mediante la tinción de plata se enviaron para su identificación por espectrometría de masas.

2.1.2 Identificación proteica

Los spots fueron analizados usando MALDI-MS; y se logró identificar satisfactoriamente 43 spots de los 55 enviados, que correspondían a 27 proteínas diferentes (Tabla I). En 42 spots se identificaron una sola proteína en cada uno de ellos, con una buena puntuación MASCOT (Tabla I). En algunos spots, se identificaron una segunda proteína, pero el bajo grado de puntuación MASCOT mostrado en estos casos sugería una posible contaminación por las proteínas adyacentes en el gel. Los spot nº 6, 17, 20, 28 y 45 parecen mostrar un perfil de proteínas que han sufrido proteólisis, puesto que su *pI* y peso molecular no se corresponden con los predichos para la proteína identificada.

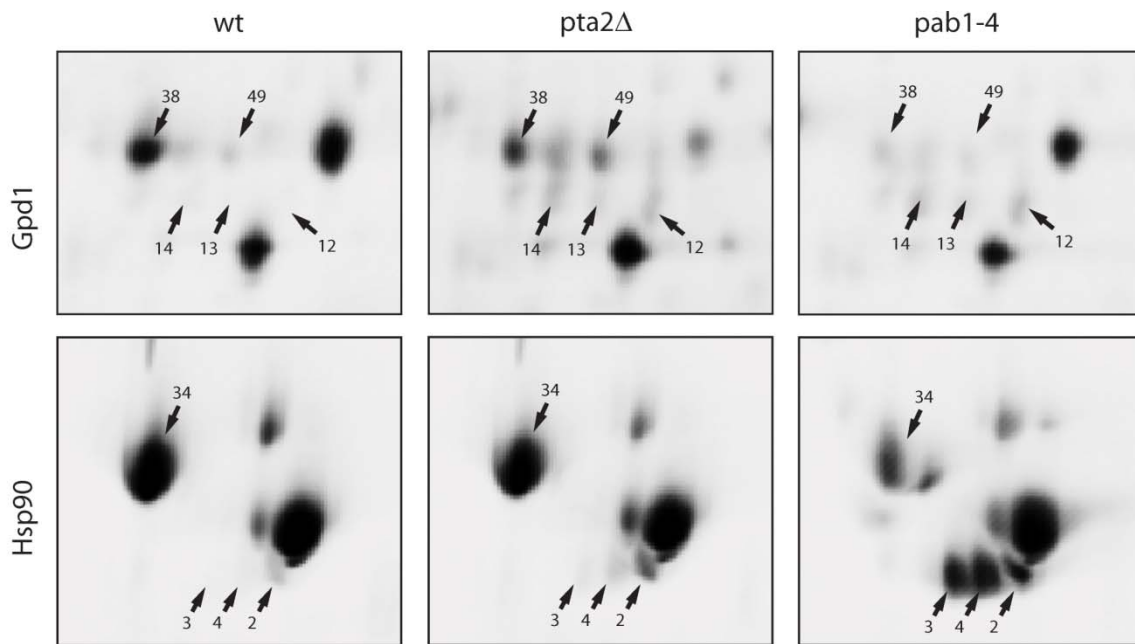


Figura 16. Ejemplos de spot que presentan un patrón similar al que presentan las fosfoproteínas.

Cambios compatibles con una alteración del patrón de fosforilación de las proteínas en los mutantes de PP2A. El panel superior estos spots son de la proteína Gpd1, mientras que en el panel inferior se muestran para Hsp90. Los números de los spots se encuentran indicados en los geles así como las condiciones en las que se observan cada uno de ellos.

Por ejemplo, se sabe que la fosfoproteína Sks2, una chaperona ribosomal cuyo ortólogo en *S. cerevisiae* se une al complejo de PP2A, (Gong Y, *et al* 2009 y Krogan N, *et al* 2006), se encontró presente en dos spots diferentes, (41 y 6), siendo el segundo un producto de degradación. En ambos mutantes de PP2A, el spot nº 41 decreció en intensidad mientras que el nº 6 incrementó, sugiriendo que PP2A participa en la degradación de Sks2. También se observó como 6 de las 27 proteínas estaban presentes en diferentes spots, sugiriendo la presencia de modificaciones posttraduccionales. En algunos de esos casos, spots adyacentes mostraban el mismo nivel cambio de intensidad pero en dirección opuesta; siendo este patrón característico de proteínas fosforiladas (Figura 16). De hecho, 4 de las 6 proteínas presentes en múltiples spots son fosfoproteínas conocidas en *S. pombe*, (Wilson-Grady J. T, *et al* 2008).

Por otro lado, en los correspondientes ortólogos de *S. cerevisiae* de 7 de las 27 proteínas totales identificadas en el experimento de 2D-DIGE se ha demostrado una interacción física y/o genética con componentes del complejo de PP2A. En 4 de ellas una interacción física con PP2A también ha sido demostrada en *S. pombe*, (Singh N. S, *et al* 2011). También es importante señalar que 12/27 proteínas identificadas son fosfoproteínas descritas en *S. pombe*, (Singh N. S, *et al* 2011). En conjunto estos datos validan nuestros resultados (Tabla III).

Cabe destacar también que la mayoría de los cambios proteicos (24/27 proteínas y 33/43 spots) fueron comunes en ambos mutantes del complejo de PP2A, y mostraron el mismo cambio relativo cuando lo comparamos con la condición silvestre: 18 spots decrecieron y 21 spots se vieron incrementados en abundancia relativa en ambos mutantes con respecto al control. Mientras que sólo 4/43 spots cambian en la dirección opuesta en ambos mutantes de PP2A (Figura 16, Figura 17 y Tabla I). En 25/43 spots, los cambios más significativos con respecto a la cepa control fueron observados en el mutante *pab1-4* (Figura 15A, Figura 15B y Tabla I). Únicamente se observó que hay tres proteínas, una en el mutante *pab1-4* y dos en el mutante *pta2Δ*, que no experimentaban variaciones en ambas condiciones mutantes con respecto al silvestre (Figura 17 y Tabla I).

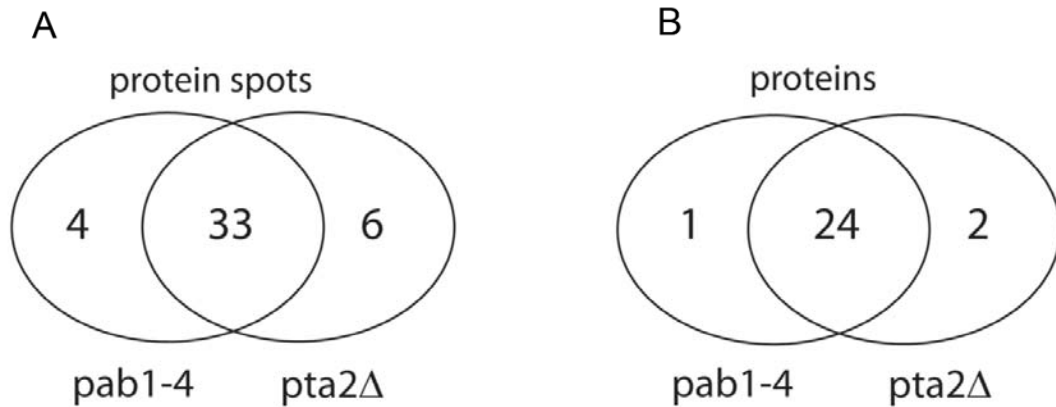


Figura 17. Cambios comunes en el proteoma en los dos mutantes de PP2A.

A) Solapamiento entre las listas de spots identificados. **B)** Solapamiento entre las lista de proteínas que presentan cambios de más de dos veces en los mutantes con respecto al wildtype

Entre las proteínas identificadas algunas de ellas están implicadas en el metabolismo del carbono entre las que se pueden incluir la glicerolaldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Tdh1), la hexoquinasa 1, la fructosa-bifosfato aldolasa (Fba1) y la piruvato descarboxilasa. Algunos spots en los que fueron identificadas estas proteínas presentaban de 2 a 10 veces menos cantidad relativa de proteína en uno de los mutantes de PP2A, sugiriendo un decrecimiento en la producción de energía (Tabla I). También se encontraron disminuciones de 1.5 a 3 veces en los mutantes de PP2A para algunas enzimas responsables de la síntesis de aminoácidos, como son el caso de la asparagina sintetasa y la homocitrato sintasa (Tabla I). Los niveles de enzima responsable de la biosíntesis de tiazol (Thi2), responsable de la producción de vitamina B1 se encontraban reducidos de 8 a 35 veces en ambos mutantes del complejo de PP2A (Tabla I).

También es importante destacar los cambios presentes en los múltiples spots identificados de Hsp90. Estos cambios son consistentes con la posibilidad de fosforilaciones en Hsp90 en ambos mutantes de PP2A (Figura 16 y Tabla I). Una distribución similar podemos encontrar para la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Gpd1), (Figura 16 y Tabla I), responsable de la síntesis de glicerol requeridos para la osmoregulación (Aiba H, *et al* 1995 y Ohmiya R, *et al* 1995); y la

piruvato decarboxilasa que regula la fermentación (Hohmann S, *et al* 1991). Todos estos datos sugieren la implicación de PP2A en estos procesos.

2.1.3. Comparación entre los cambios observados en 2D-DIGE y los niveles de expresión del ARNm

Algunos de los cambios en la abundancia de determinadas proteínas en los mutantes de PP2A relativo a la cepa silvestre mediante 2D-DIGE era consistente con una redistribución de una proteína entre dos o más spots adyacentes, sugiriendo un cambio en su modificación posttraducional, posiblemente por fosforilación (Figura 16 y Tabla I). En otros spots los cambios se producen en un único spot; y podrían deberse a cambios a nivel transcripcional o a nivel de degradación proteica. Para determinar si los cambios en la abundancia relativa entre los mutantes de PP2A y la a una cepa silvestre ocurrían a nivel transcripcional, analizamos mediante RT-PCR los niveles de ARNm de varios de los genes cuyos productos mostraron diferencias. Para ello se eligieron 6 genes que se encontraban presentes en múltiples spots (*wos2*, *hsp90*, *rad24*, *gpd1*, *fba1* y SPAC1F8.07c, que codifica para la piruvato decarboxilasa). Los cultivos para la extracción de ARN fueron preparados en las mismas condiciones que se usaron para la extracción de proteínas en el experimento de 2D-DIGE. Las PRC se hicieron por triplicado y se normalizaron a los niveles usando como control el ARNm de la actina, (Figura 18).

Cabe destacar que 5 de los 6 genes comprobados por RT-PCR mostraron cambios de menos de 2 veces en los niveles de ARNm en los mutantes de PP2A comparados con un wildtype (Figura 18). Mientras que los niveles de ARNm para Gpd1 decrecieron 2,5 veces en el mutante *pab1-4* (Figura 18). Estos datos junto con la evidente redistribución que se producen entre los spots de algunas proteínas (Figura 16 y Tabla I), sugieren que los cambios detectados en el 2D-DIGE entre los mutantes de PP2A y la cepa silvestre no se deben a cambios globales del transcriptoma en los mutantes de PP2A y podrían representar por tanto, cambios de movilidad y en la estabilidad debido a fosforilación.

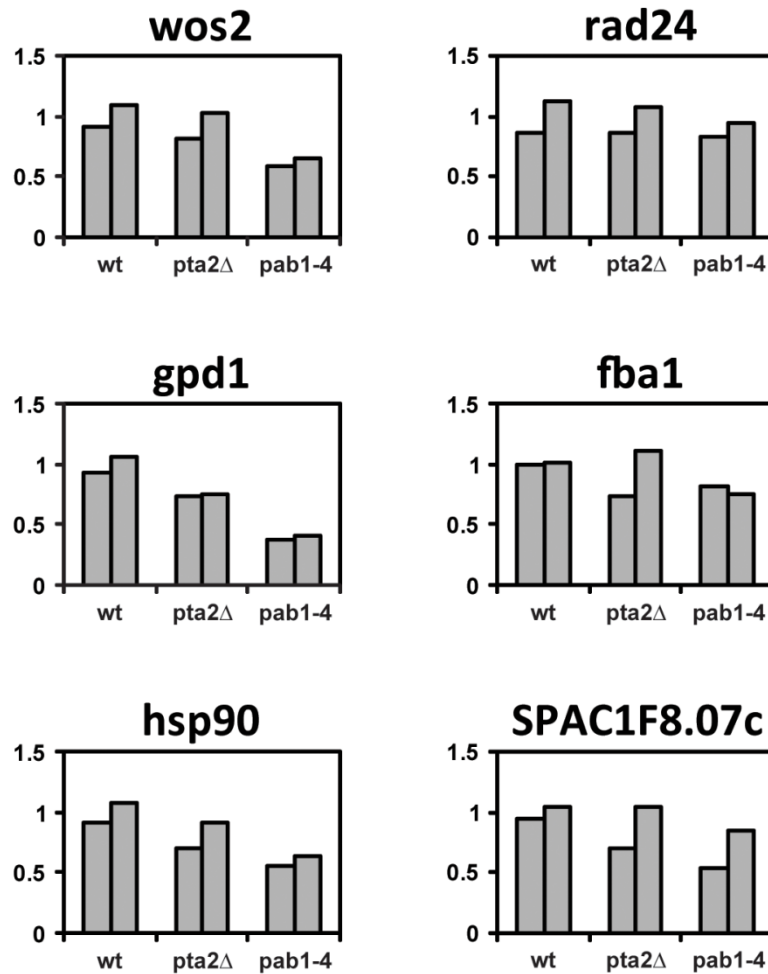


Figura 18. Niveles de ARNm determinados por RT-PCR de los genes indicados en una cepa wildtype y en los mutantes de PP2A pta2D y pab1-4.

Los niveles de ARNm de cada gen fueron normalizados con respecto a los niveles de ARNm de la actina en cada cepa y los cambios observados en los mutantes de PP2A se representan relativos a la cepa silvestre. Se muestran dos repeticiones biológicas para cada cepa.

2.1.4 Regulación de los niveles de glicerol por PP2A

Algunas evidencias sugieren que PP2A podría estar implicado en la regulación de los niveles celulares de glicerol. La movilidad de Gpd1 en los geles 2D se encontraba alterada en ambos mutantes de PP2A (Figura 16). Además, Gpd1 se ha identificado como una proteína de unión al complejo de PP2A (Singh N. S, *et al* 2011); y sus niveles de ARNm están significativamente disminuidos en el mutante *pab1-4*, (Figura 18). Una de las características de los dos reguladores de PP2A usados en este estudio es que presentan una reducida tasa de crecimiento con respecto a una cepa silvestre. Aunque esta reducción de la tasa de crecimiento podría explicarse por la desregulación de algunos de los procesos en los que PP2A parece implicado, como por ejemplo, la producción de energía, decidimos explorar la posibilidad de que esta reducción se deba a una desregulación de la producción de glicerol. Se ha descrito que la producción de glicerol está relacionada con la capacidad de producir suficiente presión de turgencia requerida para el crecimiento.

Para determinar si la concentración de glicerol estaba alterada en los mutantes de PP2A se midieron los niveles de glicerol intracelular en una cepa silvestre y en los mutantes *pta2Δ* y *pab1-4* (Figura 19). Mientras las células de *pta2Δ* mostraban un incremento de más de 2 veces en el contenido intracelular de glicerol con respecto a la cepa silvestre, las células de *pab1-4*; presentaban una reducción del 50% (Figura 19A). Sin embargo, ambos mutantes eran sensibles a un elevado estrés salino (Figura 19B).

Por tanto estos resultados sugieren un papel de PP2A en la regulación de los niveles de glicerol. La función de PP2A en la respuesta al estrés osmótico no se encuentra probablemente relacionada con la producción de glicerol. Tampoco parece plausible que la producción de glicerol sea la causa de la baja tasa de crecimiento de los mutantes de PP2A usados puesto que en ambos casos cambian de forma proporcional con respecto a la cepa silvestre, pero lo hacen en dirección opuesta.

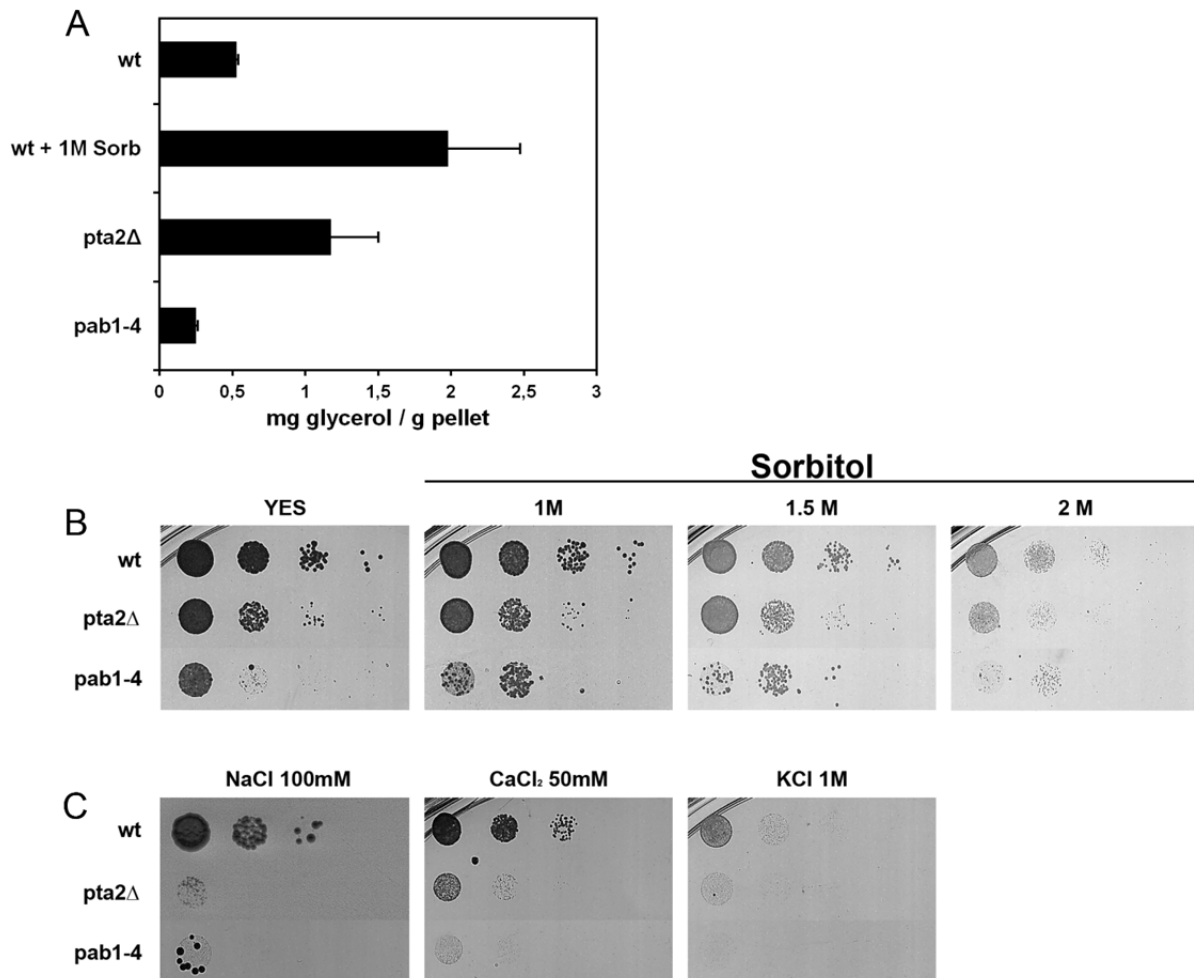


Figura 19. Concentración intracelular de glicerol y ensayo de sensibilidad al estrés osmótico en *S. pombe*

A) Mediciones de la concentración intracelular de glicerol en YES a 30°C en un wildtype, un *pta2Δ* y *pab1-4*. Como control se ha utilizado una cepa wildtype crecida en YES a 30°C en presencia de 1 M de sorbitol. **B, C)** Ensayo en gota del crecimiento celular experimentado en YES a 30°C así como en presencia y ausencia de sorbitol y de diferentes concentraciones de sales.

2.2. Análisis de proteínas asociadas al complejo PP2A mediante Inmunoprecipitación

Como una aproximación complementaria al análisis 2D-DIGE, purificamos el complejo de PP2A mediante inmunoprecipitación para identificar posibles sustratos de esta fosfatasa.

Este experimento se realizó en paralelo con el experimento descrito en el capítulo 1 y que nos permitió purificar la mayoría de las subunidades catalíticas y reguladoras de PP2A (Bernal M, *et al* 2012). En este caso, después de inmunoprecipitar las proteínas usando el anticuerpo anti-PK se trataron de cortar y enviar a secuenciación la mayoría de las bandas que aparecían de forma diferencial en la cepa Paa1-pk y no en la cepa control sin marcar. Después del análisis de espectrometría de masas de todas las proteínas co-inmunoprecipitadas con Paa1-PK (Tabla II) se identificaron además otras 55 proteínas diferentes (Tabla II).

Un análisis usando la herramienta Gene Ontology (GO) permitió agrupar las proteínas identificadas en distintos procesos celulares entre los que se incluye el ciclo celular, el metabolismo de las moléculas de pequeño tamaño, la producción de energía, y la traducción citoplasmática, entre otros (Figura 20). De las 55 proteínas identificadas 35 son fosfoproteínas (64%) y 20 proteínas (sin incluir los componentes del complejo de PP2A) estaban descritas que presentaban una interacción física y/o genética con el complejo de PP2A en *S. cerevisiae* o *S. pombe* (Tabla IV), (Singh N. S, *et al* 2011). Además, hay un solapamiento significativo entre las proteínas que presentan cambio de movilidad/abundancia en el gel 2D con aquellas identificadas junto a PP2A en el experimento de inmunoprecipitación. Así que de las 27 proteínas identificadas mediante 2D-DIGE, 4 de ellas eran comunes a las identificadas mediante el ensayo de inmunoprecipitación con Paa1-PK y otras 6 proteínas fueron identificadas en el ensayo de inmunoprecipitación con Paa1-TAP descrito en Singh N. S, *et al* 2011.

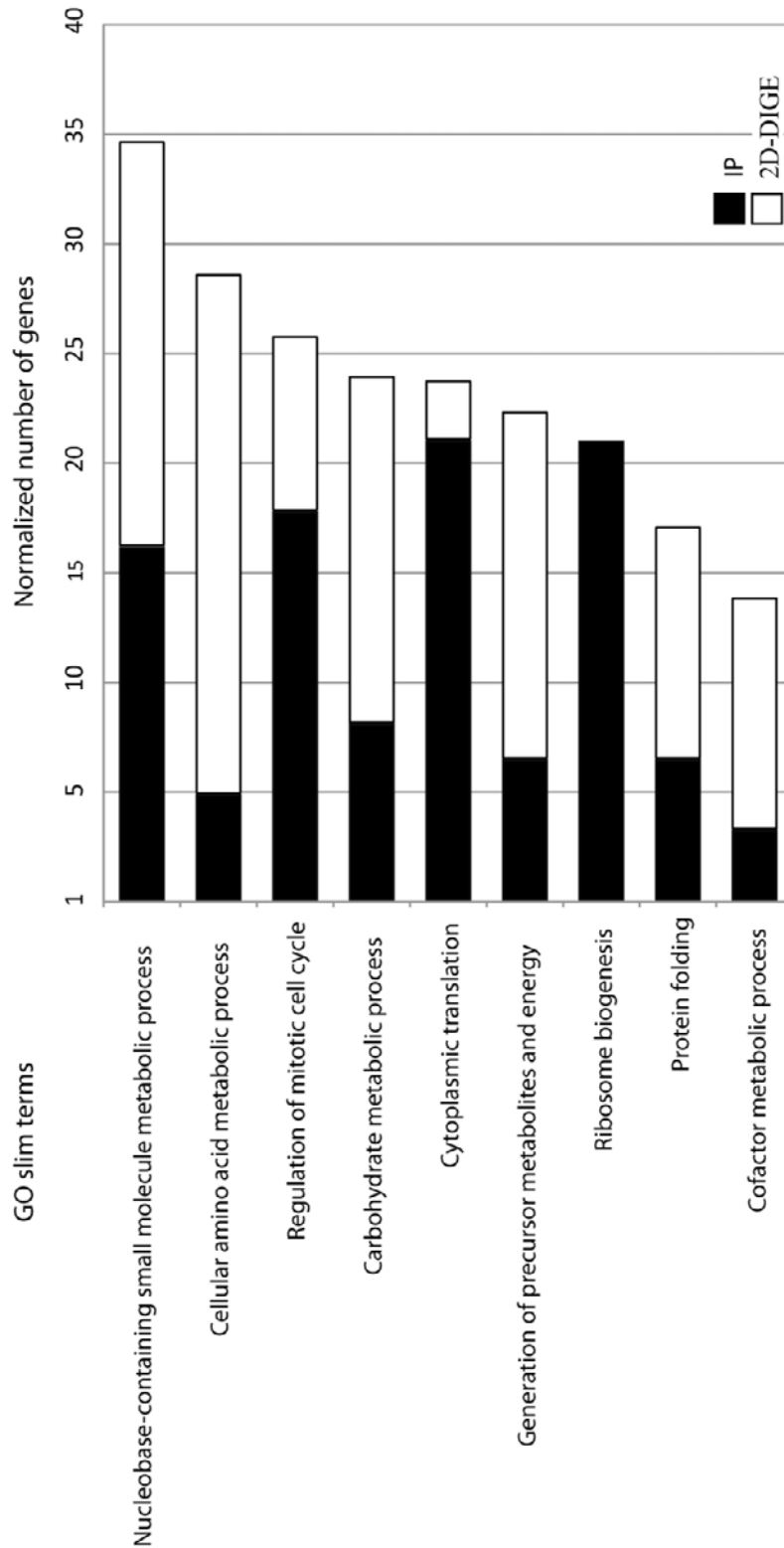


Figura 20. Representación de los términos GO de las proteínas asociadas al complejo PP2A.

Agrupación del enriquecimiento de los términos GO en las proteínas identificadas en los experimentos de 2D-DIGE e inmunoprecipitación. Las barras representan el número de proteínas normalizadas en cada experimento correspondiente para cada término GO específico

Además 3 de las 6 proteínas identificadas en ambos experimentos participan en la producción de energía, categoría GO más representativa de las proteínas identificadas en el experimento de 2D-DIGE (Figura 20). Los posibles sustratos de PP2A identificados en el experimento de inmunoprecipitación aparecen numerosas proteínas implicadas en la regulación de ribosomas. Esta categoría GO no se encontró en el experimento de 2D-DIGE, posiblemente debido a baja abundancia en el proteoma de *S. pombe*.

Sorprendentemente, entre los sustratos identificados en el experimento de inmunoprecipitación se identificaron proteínas relacionadas con la ruta de morfogénesis (MOR) en *S. pombe*. Entre los que se encuentran Mor2, una proteína estructural de la ruta MOR, Pmo25, una kinasa que se asocia con Nak1 (Orb3) para activarla; y Rga4, un regulador de tipo GAP de la GTPasa Cdc42.

CAPÍTULO 3:

CONTROL ESPACIAL DE LA POLARIDAD POR LA RUTA MOR Y PP2A

Breve Introducción

Los datos presentados en el capítulo 1 demostraban que PP2A regulaba la estabilidad o el reciclaje de Cdc42 y su falta de función incrementaba tanto los niveles totales de Cdc42 como los niveles de Cdc42 activo (GTP-Cdc42). En los experimentos de inmunoprecipitación del complejo PP2A encontramos varias proteínas asociadas al complejo cuyas funciones están relacionadas con la morfogénesis, como son Pmo25, Mor2 y Sts5 (Orb4). Tanto Pmo25 como Mor2 son dos componentes del módulo de quinasas que componen la ruta MOR y que actúan por encima de la NDR-quinasa Orb6 y Cdc42 (Das M, et al 2009). Sts5 se requiere para la correcta localización del citoesqueleto de actina requerido para el crecimiento polarizado. Sts5 fue aislado como un mutante hipersensible (*sts5-7*) al inhibidor de proteínas quinasas, estaurosporina (Toda T, et al 1993, Hirata D, et al 1996). Mutaciones en Ppe1, una proteína fosfatasa similar a 2A, muestra el mismo fenotipo que *sts5*, ambos genes son epistáticos, y funcionan en la misma ruta (Shimanuki, et al 1993). Mutaciones en la proteína quinasa, Ssp1 suprimen tanto a *sts5-7* como a *ppe1Δ*, sugiriendo un papel antagónico de esta quinasa a la ruta controlada por *sts5* y *ppe1* (Hirata et al 1996) (Matsusaka, et al 1995).

Puesto que los mutantes *pta2Δ* como *pab1-4* presentan defectos de morfogénesis, defectos de separación celular y sobretodo una pérdida de polaridad tras la división. Fenotipos que están asociados a la falta de función de la ruta MOR, decidimos explorar la posibilidad de que PP2A regule la actividad de esta ruta de señalización.

3.1 Los defectos de PP2A-*pta2Δ* en morfogénesis son aditivos a defectos de la ruta MOR, y a defectos en los mecanismos de secreción polarizada.

Con objeto de determinar la relación funcional de PP2A con la ruta MOR realizamos dobles mutantes entre el alelo termosensible de *orb6*, *orb6-25*, y dos mutantes de PP2A, *pta2* y *pab1*. Los dobles mutantes *pta2Δorb6-25* y *pab1-4orb6-25* germinaban, pero solo llegaban a formar microcolonias cuyas células presentaban una morfología redondeada y septada (Figura 21A), el fenotipo característico de la falta de función de Orb6 y de la ruta MOR. Este fenotipo contrasta con el observado en el doble mutante *pta2Δrga4Δ*, que pierde completamente la polaridad, pero es viable; sugiriendo que la letalidad de los dobles mutantes *pta2Δorb6-25* y *pab1-4orb6-25* podría deberse a defectos en secreción. En *S. cerevisiae* el ortólogo de Orb6, Cbk1, regula el crecimiento polarizado mediante asociación y fosforilación de Sec2 un Gef1 de la GTPasa Rab4. Tanto Sec2 como Rab4 localizan en vesículas secretoras destinadas al exocisto (Kurischko, *et al* 2008 e Itzen, *et al* 2007).

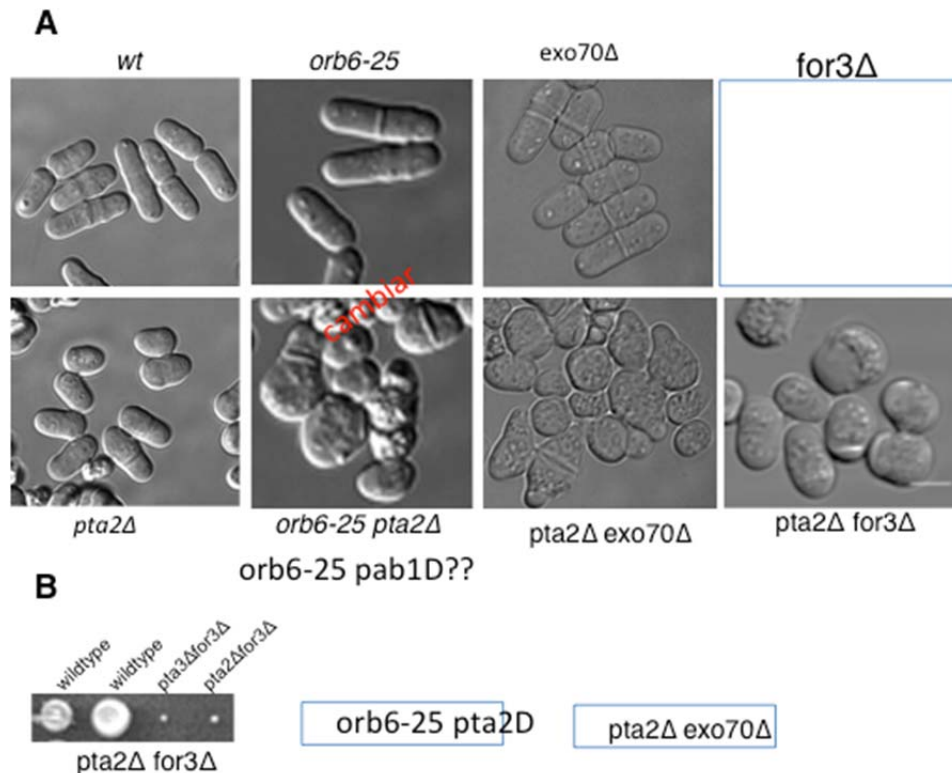


Figura 21. Los defectos de PP2A-*pta2Δ* en morfogénesis son aditivos a defectos de la ruta MOR, y a defectos en los mecanismos de secreción polarizada. **A.** Imágenes de DIC de las cepas indicadas. **B.** Imágenes de la segregación de los dobles mutantes indicados

Para probar esta idea, realizamos un doble mutante entre *pta2Δ* y la delección de *exo70*, un componente no esencial del exocisto que junto con Sec3 se requieren para localizar y anclar otras subunidades del exocisto a la membrana plasmática; y que su ausencia se compromete parcialmente la secreción (Bendezu FO, *et al* 2012). Sorprendentemente, *pta2Δ* presentó una fuerte interacción genética negativa con *exo70Δ*, el doble mutante crecía en forma de microcolonias y presentaban células con graves defectos de polaridad similar a la falta de función de MOR (Figura 21A).

La interrupción de los cables de actina y en mutantes del exocisto conducen al crecimiento polarizado sugiriendo que los cables de actina son también esenciales para la viabilidad celular cuando se compromete la secreción (Bendezu FO, *et al* 2012).

Para determinar si PP2A también resulta esencial para la viabilidad celular en ausencia de cables de actina, generamos el doble mutante *pta2Δ for3Δ*. La delección de Pta2 fue sintético letal en combinación con la delección de la formina For3 (Figura 21B). Las células del doble mutante germinaban y formaban microcolonias de células no polarizadas.

En conjunto estos datos muestran que tanto comprometiendo la ruta MOR, como la secreción a nivel de exocisto o el transporte vesicular a través de la interrupción de los microfilamentos de actina la función de PP2A es esencial para la viabilidad celular.

Es posible que PP2A participe en la ruta MOR a varios niveles, aguas arriba de Orb6, regulando positivamente al módulo de quinasas de la ruta MOR o al propio Orb6. Con menos actividad MOR se comprometería parcialmente la secreción que resultaría letal comprometiendo la ruta secretora o nivel del exocisto o de cables de actina. Es posible también un modelo en el que PP2A actúe aguas debajo de Orb6, revirtiendo el estado de fosforilación de alguna de sus dianas. Alternativamente PP2A podría estar regulando la ruta MOR a varios niveles. Puesto que PP2A-*pta2Δ* presenta elevados niveles de Cdc42, esta cepa puede ser más sensible a perturbaciones de la secreción y por tanto los datos genéticos proporcionados lo tomamos con cierta cautela.

3.2 PP2A regula es estado de fosforilación de Gef1.

Además de la función de Orb6 en la regulación de la secreción, esta NDR quinasa controla el crecimiento polarizado mediante la fosforilación y reclutamiento de Gef1 a los sitios de crecimiento (Das M, *et al* 2009). En ausencia de Orb6 Gef1 no se retiene en los sitios de crecimiento y se extiende por toda la membrana lo que resulta en la activación de Cdc42 ectópica, dando lugar a un crecimiento isotrópico. Aunque aún no se ha publicado, se ha propuesto que Gef1 fosforilado es reconocido por la proteína 14-3-3 Rad24 para formar un complejo inactivo, de esta forma se mantendría siempre un pool de Gef1 activo en los sitios de crecimiento para regular a Cdc42 y promover el crecimiento polarizado. En ausencia de Rad24 se produciría una desregulación de la localización de Gef1 que explicaría los defectos de falta parcial de polaridad que presenta la delección de *rad24* (Figura 22A) (Fulvia Verde, comunicación personal).

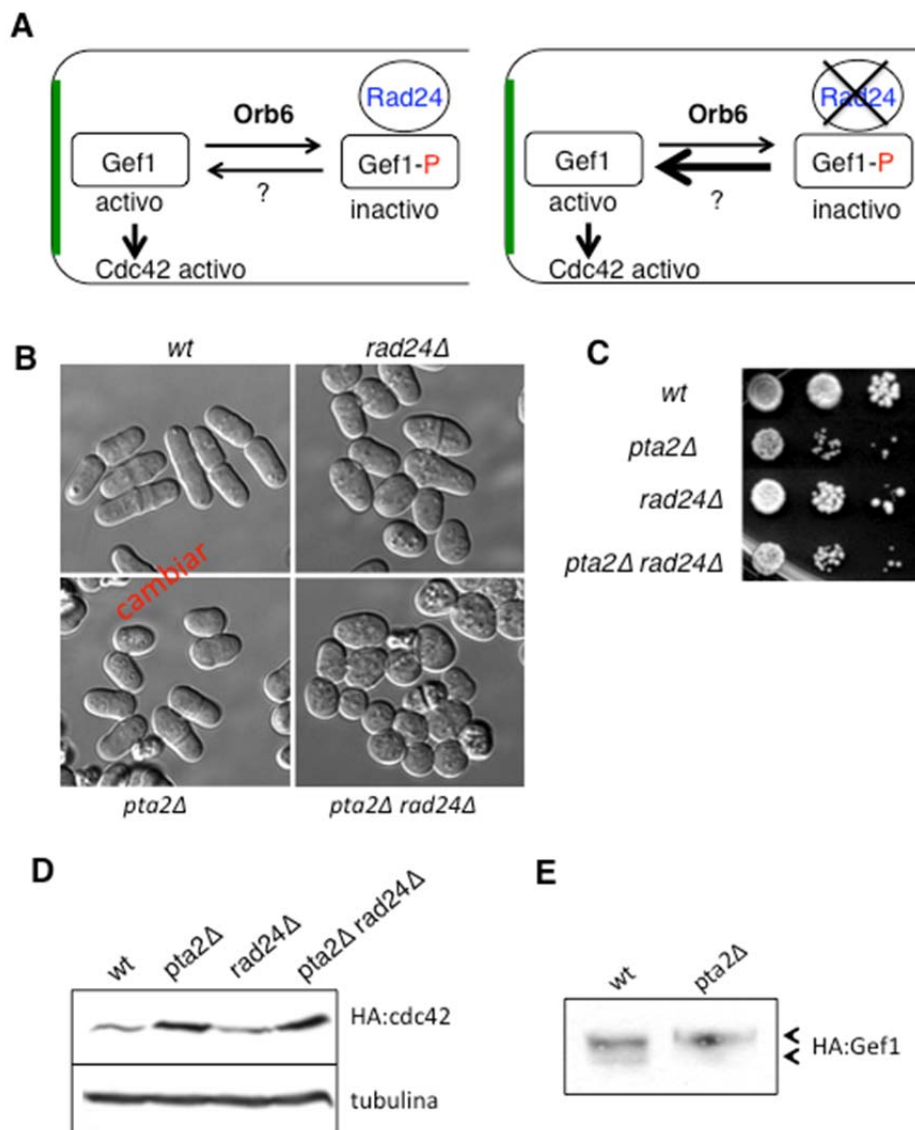


Figura 22. PP2A- es aditivo a la delección de *rad24* y regula el estado de fosforilación de Gef1. **A.** Representación esquemática de la función de Rad24 en la regulación de Gef1. **B.** Imágenes de DIC de las cepas indicadas. **C.** Ensayo de sensibilidad en gota de las cepas indicadas **D.** Western blot mostrando los niveles totales de Cdc42-HA en las cepas indicadas. **E.** Western blot mostrando el cambio de movilidad de Gef-HA en el mutante *pta2Δ* relativo a la cepa control.

Para determinar una posible función de PP2A en la ruta MOR a través de la regulación de Gef1, analizamos el estado de fosforilación de esta proteína comprometiendo la actividad de PP2A mediante la delección de *pta2*. Para ello expresamos el alelo Gef1-HA en una cepa delecionada en *pta2* y se prepararon extractos totales de la cepa Gef1-HA y de la cepa *pta2Δ* Gef1-HA que fueron resueltos en geles de SDS-PAGE. Sorprendentemente, en la cepa *pta2Δ* solo aparecía una variante de las dos que presenta la cepa control silvestre, la que migraba a mayor peso molecular y que posiblemente corresponde con la forma fosforilada Gef1 (Figura 22E). De acuerdo al modelo propuesto anteriormente en el que Rad24 se une a esta forma fosforilada Gef1 para inactivarlo, en ausencia de Rad24 se perdería esta inhibición dando lugar a defectos de polaridad.

Para probar esta hipótesis construimos un doble mutante entre *pta2Δ* y la delección de *rad24*. El doble mutante *pta2Δ rad24Δ* era viable pero las células perdían completamente la polaridad (Figura 22B y C). Asumiendo como cierta la hipótesis de que Rad24 regula el reciclado de Gef1 en los sitios de crecimiento, pretendimos determinar si una desregulación de Gef1 podría dar lugar una alteración en los niveles de Cdc42, como observamos en el mutante de PP2A-*pta2Δ*. Para ello analizamos los niveles totales de Cdc42 en la cepa *rad24Δ cdc42-HA* usando los respectivos controles. Este experimento mostró que la cepa *rad24Δ* presenta niveles normales de Cdc42. además la delección de *rad24* no suprimía el exceso de Cdc42 del mutante PP2A-*pta2Δ* (Figura 22D), sugiriendo que la desregulación de los niveles de Cdc42 que presentan los mutantes PP2A-*pta2Δ* y PP2A-*pab1-4* ocurre por un mecanismo independiente de Rad24.

En conjunto, estos datos sugieren que PP2A podría regular el correcto posicionamiento de los sitios de crecimiento a través de la regulación del estado de fosforilación de Gef1. Sin embargo mientras que la delección de Gef1 suprime parcialmente el fenotipo de pérdida de polaridad tras la inactivación de la quinasa orb6 mediante el alelo orb6-AS (Das et al 2009), la delección de gef1 no mejora el fenotipo morfogenético del mutante de PP2A pta2 Δ , sugiriendo que la función de PP2A en morfogénesis no se puede explicar exclusivamente por la desregulación del estado de fosforilación de Gef1 observado en el mutante PP2A-pta2 Δ .

3.3 PP2A presenta una alteración en la arquitectura y dinámica de los nodos de Rga4.

En los experimentos de inmunoprecipitación, además de los reguladores de la ruta MOR *pmo25* y *Mor2*, encontramos asociado a PP2A y el regulador de *Cdc42*, *Rga4*. En el capítulo 1 se describió que comprometiendo la actividad general de PP2A mediante la deleción de *pta2* los dominios *Rga4*-GFP estaban alterados (Figura 14).

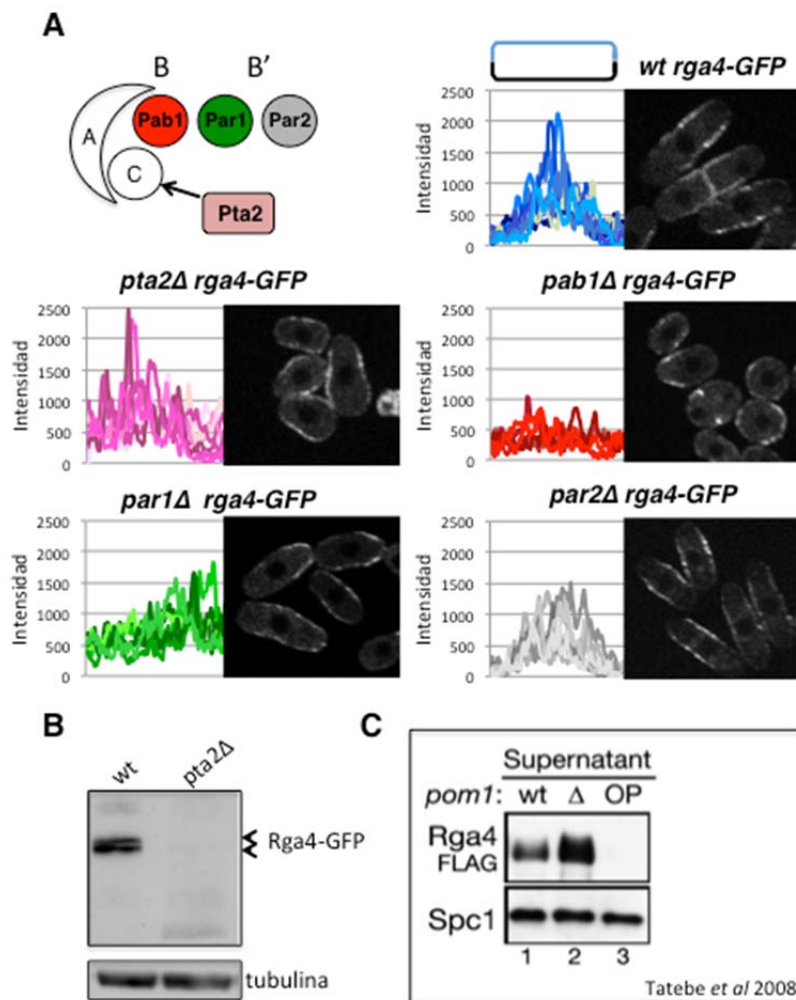


Figura 23. Análisis del dominio de *Rga4* en la cepa silvestre y en los distintos mutantes del complejo PP2A. **A.** Representación esquemática del complejo PP2A mostrando las subunidades, estructural (A), catalítica (C) fosfoactivadora (*Pta2*) y las reguladoras B y B', *pab1*, *Par1* y *Pa2*. Análisis de la intensidad de *Rga4* en la cepa control y los mutantes indicados. **B.** Western blot mostrando los niveles de *Rga4* en la cepa silvestre y el mutante *pta2Δ*. **C.** Figura extraída del Tatebe et al 2008, mostrando la ausencia de señal *Rga4*-FLAG en condiciones de sobreexpresión de la quinasa *Pom1*.

Para explorar la posibilidad de que PP2A esté regulando a Rga4, realizamos un estudio cuantitativo de la intensidad y localización de Rga4 en *pta2Δ* y en los mutantes de cada una de las subunidades reguladoras de PP2A (*pab1Δ*, *par1Δ* y *par2Δ*). Para ello se expresó el alelo Rga4-GFP en los distintos fondos genéticos de PP2A y se midió la intensidad a lo largo del perímetro celular de cada cepa. En la cepa silvestre Rga4 se localiza en un dominio central excluido de los sitios de crecimiento (Figura 23).

En el mutante *pta2* esta localización se encuentra parcialmente alterada, el dominio central no está tan bien definido y presenta menor intensidad, un fenotipo que se agrava aún más en la delección de *pab1* (Figura 23A). En estas células el dominio de Rga4 se extiende por casi todo el cortex lateral y la intensidad media esta reducida más de un 50% relativo al control silvestre (Figura 23A). En cuanto a los mutantes de subunidades tipo B', mientras la delección de la subunidad B' mayoritaria *par1* el dominio Rga4 se extendía por una de las puntas dando lugar a células monopolares, la delección de *par2* no mostró alteración alguna en cuanto a la distribución e intensidad de Rga4 en el dominio lateral (Figura 23A).

Para determinar si PP2A está regulando el estado de fosforilación de Rga4 analizamos en extractos totales los niveles de Rga4-GFP en la cepa. Mientras que en una cepa silvestre pudimos observar varias bandas de Rga4-GFP consistente con que es una fosfoproteína, cuando comprometemos la función de PP2A general mediante la delección de *pta2*, fuimos incapaces de detectar la proteína Rga4-GFP mediante westerblot. A pesar de que la proteína estaba presente en la célula como muestran las imágenes de fluorescencia (figura 23A, *pta2Δ*). El grupo de Kaz Shiozaki ha demostrado que Rga4, fue también indetectable mediante western blot cuando se sobreexpresaba la proteína quinasa Pom1 (en este caso marcada con el epítipo FLAG) (Figura 23C) (Tatebe *et al* 2019), sugiriendo que la forma fosforilada de Rga4 o bien es muy insoluble o es extremadamente sensible a proteolisis impidiendo su detección mediante western.

Puesto que en *S. pombe* Rga4 previene el crecimiento ectópico de en el dominio lateral una desregulación de esta proteína podría explicar al menos en parte, los defectos morfogénicos que presentan los mutantes de PP2A *pta2Δ* y *pab1-4*, decidimos realizar un análisis exhaustivo de la distribución arquitectura y dinámica de Rga4.

3.4 Análisis de la distribución de Rga4 en el cortex lateral de una cepa silvestre de *S. pombe*.

Para estudiar la dinámica del dominio de Rga4 realizamos experimentos de video microscopía in vivo en secciones únicas transversales y sagitales de *S. pombe* como se esquematiza en la figura 24A). Como se ha descrito previamente (Tatebe et al 2008), la proteína Rga4 localizaba asociada a cortex celular en forma nodos discretos distribuidos por región central de célula y excluido de las puntas (Figura 24B).

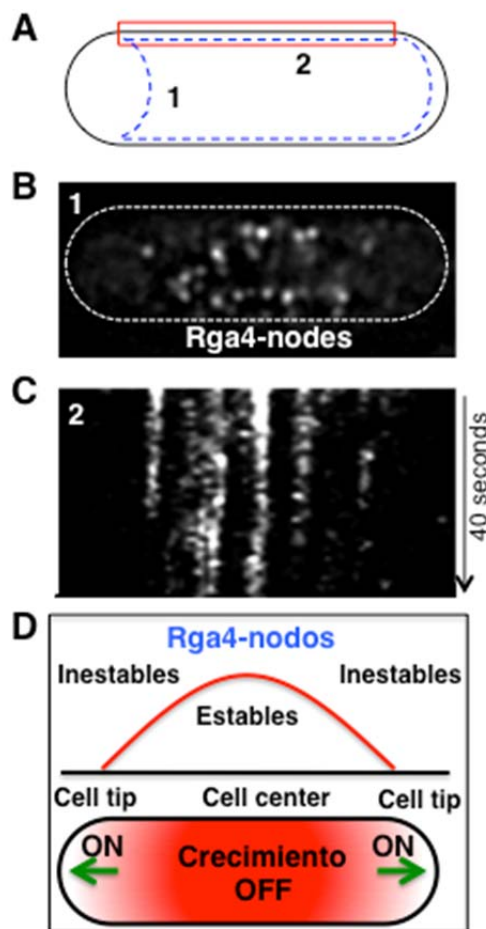


Figura 24. Análisis del dominio nodular de Rga4 en la cepa silvestre. **A.** Representación esquemática de una célula de *S. pombe*, donde 1 y 2 indican la sección mostrada en B y C respectivamente. **B.** Imagen sagital de la región nodular de Rga4. **C.** Quimograma de una sección media del cortex lateral de Rga4. **D.** Representación esquemática de los dominios donde los nodos Rga4 son estables e inestables.

En una imagen transversal se puede observar que los nodos de Rga4 son bastantes estables en la región central, permaneciendo en una misma posición aproximada durante todo el periodo de filmación (1min) (Figura 24C). Los nodos sin embargo desaparecían rápidamente (1-2 segundos) cuando se aproximaban a puntas de crecimiento (video 6). A pesar de que un mismo nodo permanecía en una misma posición por periodos de minutos su comportamiento era muy dinámico y que la señal de Rga4-GFP fluctuaba entre nodos anexos sugiriendo que los nodos están permanentemente intercambiando material entre ellos (Figura 25A, asteriscos t=22''-28''-31'').

En ocasiones se pudo observar como un nodo de Rga4 desaparecía de una posición pero reaparecía unos segundos después en la misma posición aproximada, sugiriendo que los nodos están anclados a una estructura reticular a la que se pueden asociar y disociar de forma dinámica (Figura 25, asteriscos t=22-24'', 27''-33'' 43''-45''). Mientras que una proyección en la que se promedia la intensidad de una región nodular determinada durante el periodo de filmación de 1 minuto, muestra la estabilidad de los nodos en el tiempo, una proyección de máxima intensidad refleja el comportamiento de transferencia lateral de material entre nodos anexos (Figura 25 C, D).

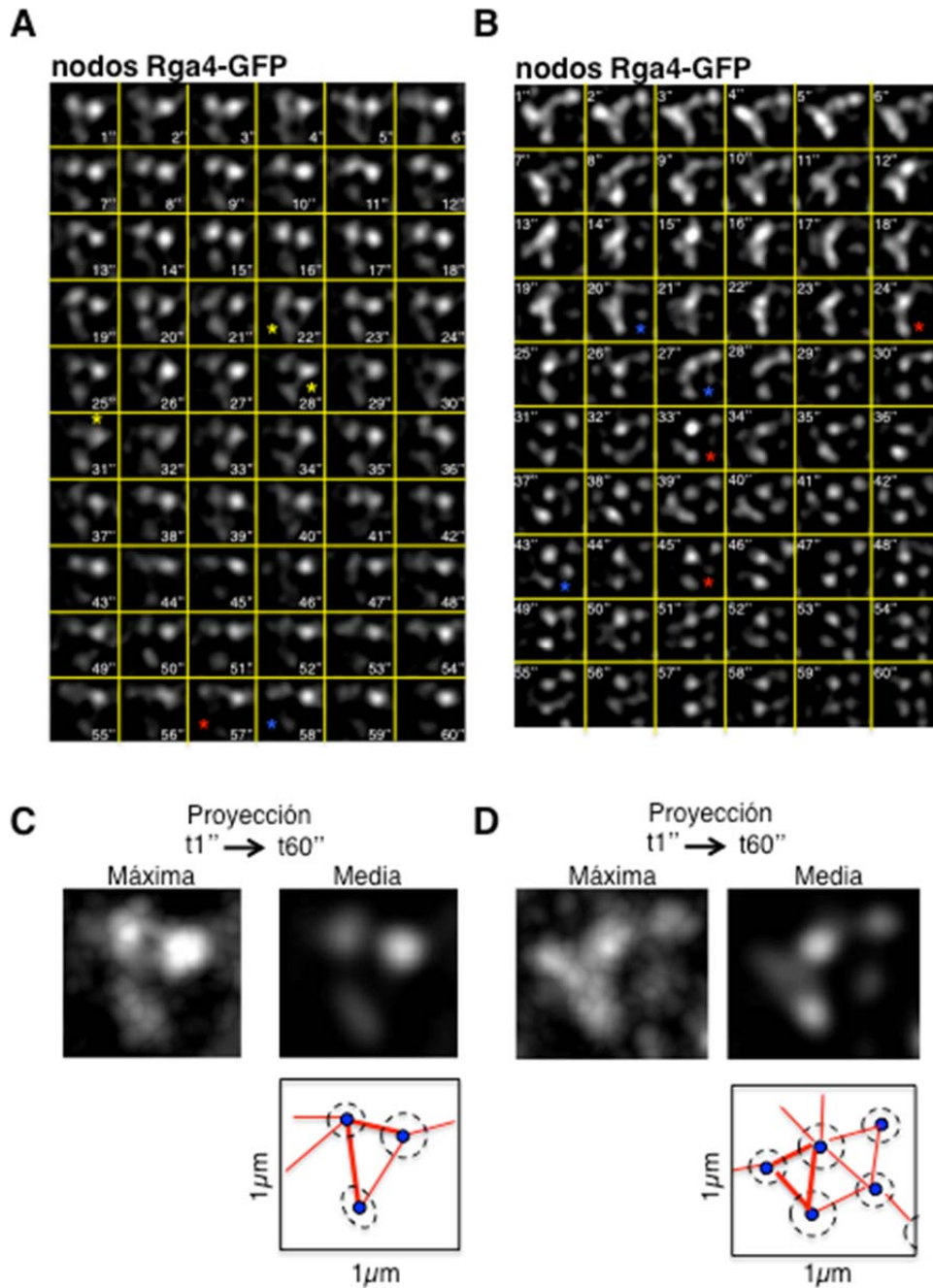


Figura 25. Análisis del comportamiento de varios nodos de Rga4 en la cepa silvestre. **A.** Imágenes dos ejemplos de una conexión entre 3 o 4 nodos de Rga4 en la cepa silvestre. Los asteriscos amarillos indican intercambio de material entre nodos anexos. Los asteriscos azules y rojos en las imágenes de la derecha indican nodos que desaparecen transitoriamente y reaparecen después de varios segundos. **C.** Proyecciones promedio y máxima de la región mostrada en el ejemplo A y B respectivamente. Abajo, se muestra una representación esquemática de la conexión entre nodos anexos en la que las líneas de más intensidad representan mayor intercambio entre nodos.

Una vez analizado el comportamiento de Rga4 en la cepa silvestre realizamos el mismo análisis en la cepa *pab1-4*, el mutante de PP2A que mostraba un fenotipo más penetrante de alteración del dominio nodular de Rga4.

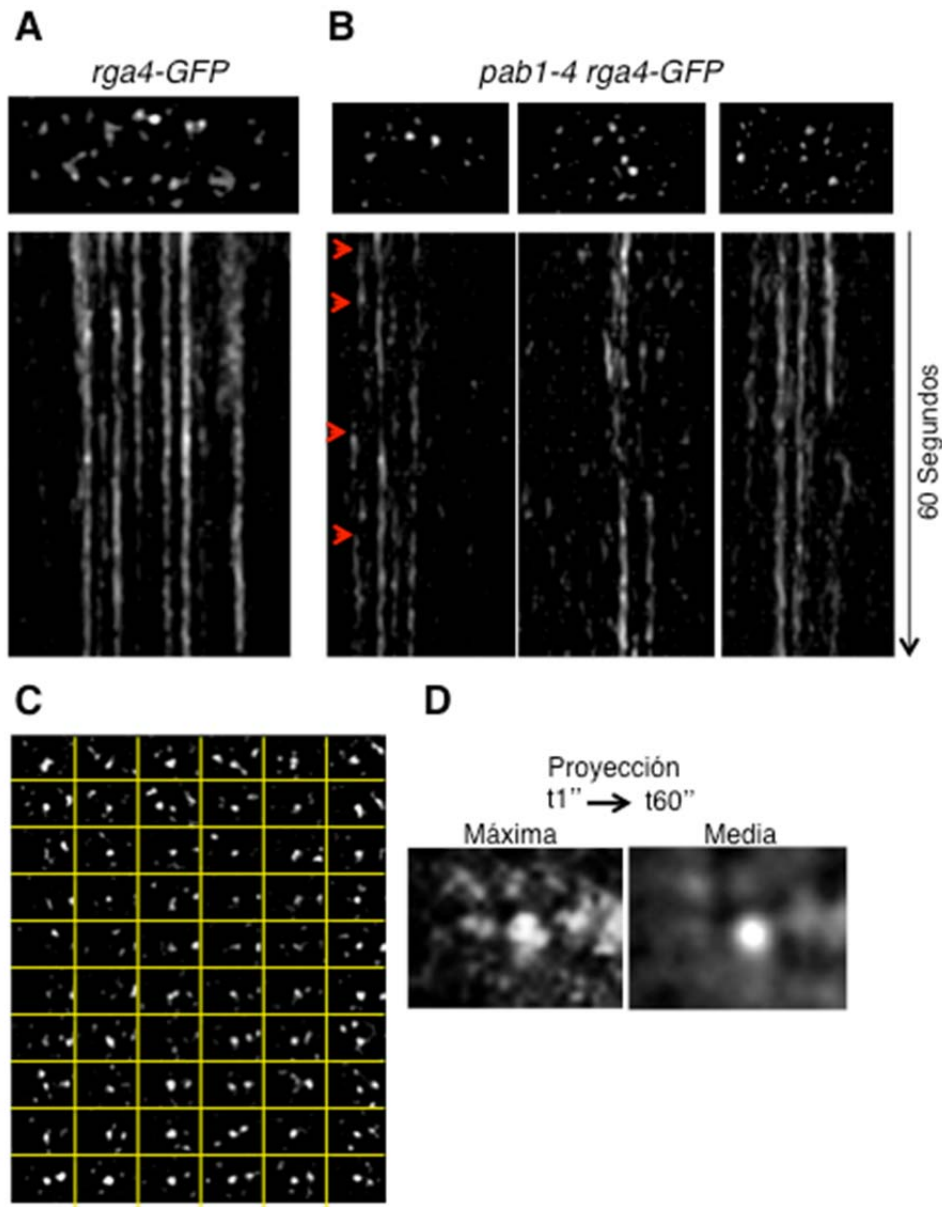


Figura 26. Análisis del comportamiento de varios nodos de Rga4 en la cepa PP2A-*pab1-4*. **A.** Imágenes del dominio de Rga4 en la cepa silvestre. **B.** Imágenes del dominio de Rga4 de tres células independientes de la cepa *pab1-4*, Las flechas indican la inestabilidad de los nodos **C.** Análisis del comportamiento de varios nodos de la cepa *pab1-4*. **C.** Proyecciones promedio y máxima de la región nodular mostrada en C.

Las células *pab1-4 rga4-GFP* fueron filmadas por un periodo de 1 minuto a intervalos de un segundo en un plano sagital. El mutante *pab1-4* presentaba, en general, un menor número de nodos que la cepa silvestre (Figura 26 A, B). Los nodos del mutante presentaban una dinámica de fusión y fisión como habíamos descrito en la cepa silvestre, pero mientras que en ésta los nodos de Rga4 permanecían estables en una misma posición durante todo el periodo de filmación, en el mutante *pab1-4* los nodos presentan un comportamiento más inestable y tendían a desensamblarse con mayor frecuencia (Figura 26 B). En muchas ocasiones un nodo desaparecía por completo de una posición determinada reapareciendo en la misma posición después de varios segundos, sugiriendo que en *PP2a- pab1-4* el componente de membrana al que se asocia Rga4 no está alterado sino la asociación de Rga4 al mismo (Figura 25 B flechas).

Para analizar en mayor profundidad el comportamiento de los nodos de Rga4 en la cepa silvestre y el mutante *pab1-4* analizamos la dinámica de asociación-disociación de Rga4 a los nodos mediante experimentos de FRAP. El experimento de FRAP se realizó en 10 células de cada condición, en un único plano y se analizó la dinámica de recuperación de la fluorescencia a intervalos de 1 segundo por un periodo de un minuto. Puesto que Rga4 localiza además de en el dominio lateral en el sitio de división, analizamos la cinética de FRAP en ambas regiones. En la cepa silvestre la recuperación de la fluorescencia en la región lateral fue alrededor del 50% más lenta que en el sitio de crecimiento (Figura 27 A,B). Sin embargo, el mutante *pab1-4* presentó una recuperación alrededor del 50% más rápida de la fluorescencia en ambas regiones comparadas con la cepa silvestre (Figura 27 C,D), sugiriendo que en el mutante *PP2A-pab1-4* las propiedades de asociación-disociación a la membrana están alteradas.

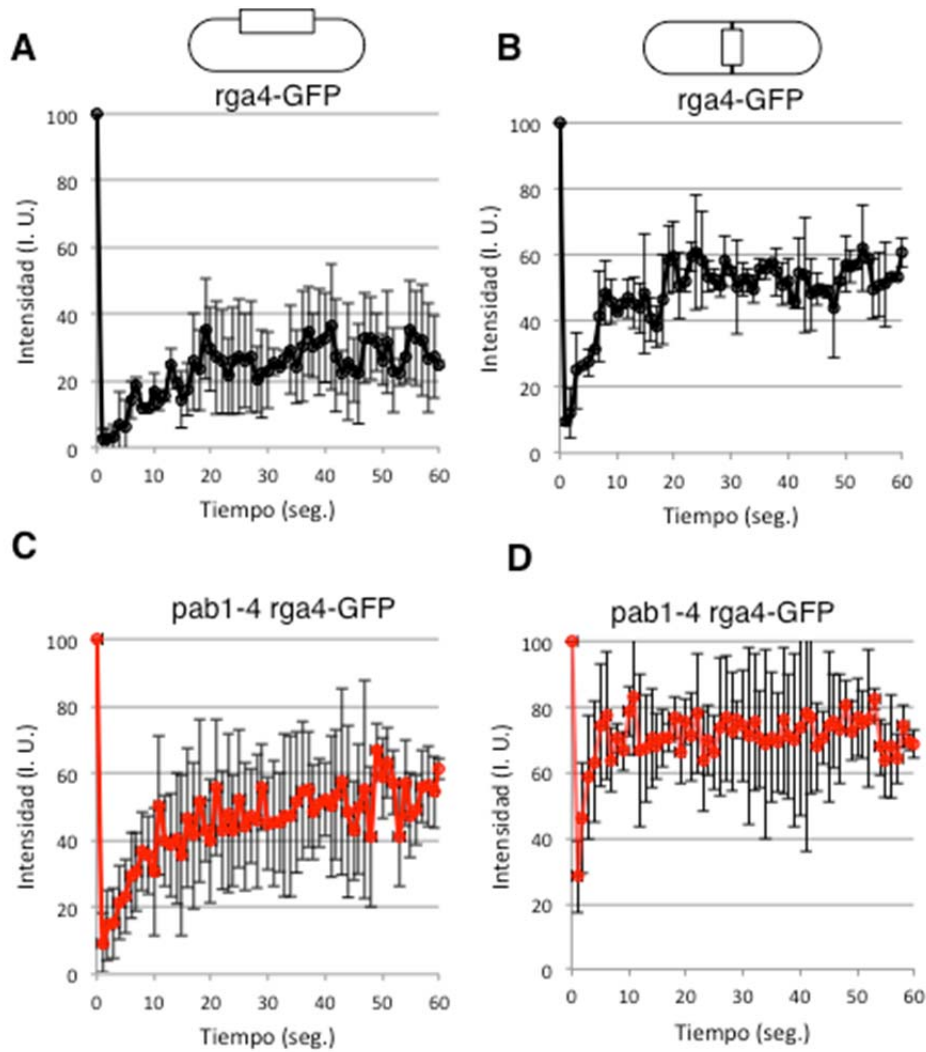


Figura 27. Análisis mediante FRAP de la dinámica de asociación disociación del cortex de Rga4-GFP. **A-B.** Cinética de FRAP del dominio cortical de Rga4-GFP durante interfase y durante division respectivamente. **C-D** Cinética de FRAP del dominio cortical de Rga4-GFP durante interfase y durante division respectivamente en mutante *pab1-4*.

Aunque Rga4 no se ha descrito como una diana de la ruta MOR, posee 4 sitios consenso de fosforilación de la quinasa NDR Orb6, lo que sugiere que Rga4 podría ser una diana de esta quinasa. Para comprobar esta hipótesis expresamos el alelo Rga4-GFP en el mutante termosensible *orb6-25* y analizamos la arquitectura y dinámica del dominio nodular de Rga4 tras inactivar a *orb6* a 36°C. Mientras que a 25°C el dominio de Rga4-GFP era indistinguible de la cepa control silvestre, tras inactivar la ruta MOR, se observó que el dominio lateral de Rga4 se desensamblaba casi completamente perdiendo progresivamente su arquitectura (Figura 28A). Esta desorganización del

domino nodular de Rga4 correlacionaba con un incremento del diámetro celular (Figura 28B). Estos datos sugieren que Rga4 podría ser una nueva diana de Orb6.

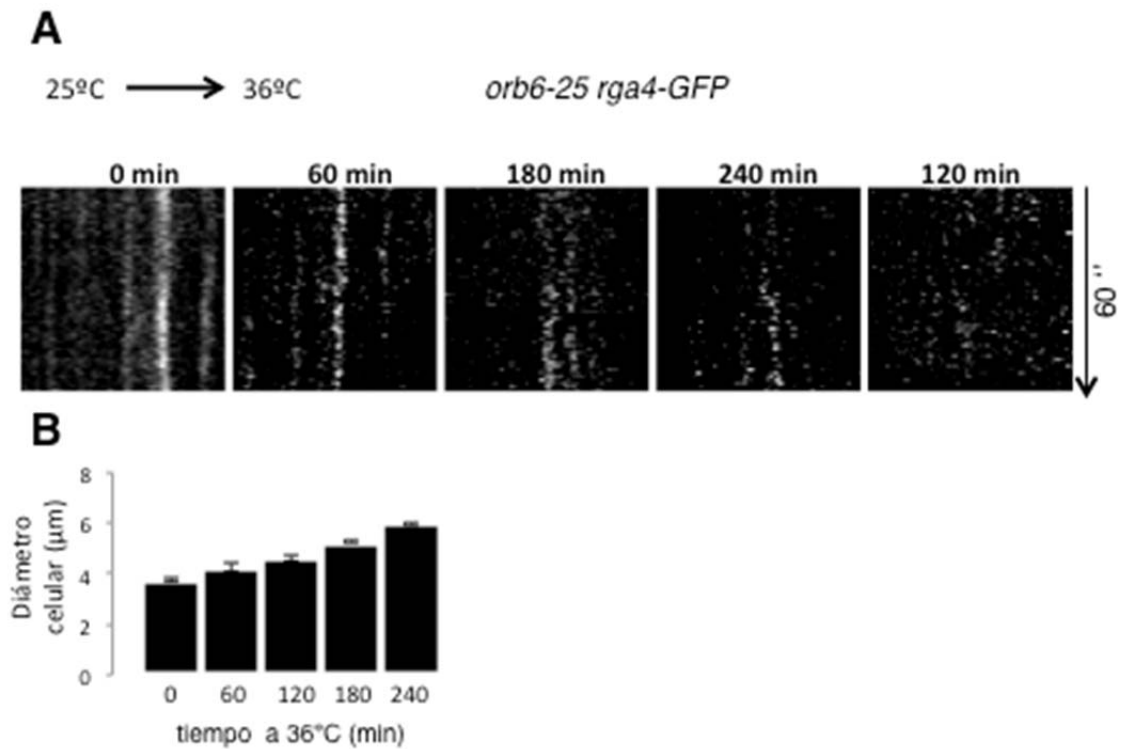


Figura 28. Análisis del dominio nodular de Rga4 en la cepa *orb6-25*. **A.** Imagen sagital de la región nodular de Rga4 del mutante *orb6-25* a 36°C en los tiempos indicados. **B.** Diámetro celular de la cepa *orb6-25 rga4-GFP* a 36°C a los tiempos indicados.

En conjunto, estos datos sugieren que PP2A podría ser o bien, un regulador positivo de la ruta la ruta MOR, como sugerían nuestros datos genéticos, o bien, o un regulador positivo de Rga4. Es posible también que la función de PP2A ocurra a los dos niveles.

IV. DISCUSIÓN

CAPITULO 1: REGULACIÓN DE LA MORFOGENESIS EN LA LEVADURA DE FISIÓN MEDIANTE EL ACTIVADOR DE PP2A PTA2.

- **Las células de *pta2Δ* presentan una pérdida parcial de polaridad y una alteración en la citoquinesis.**

La heterogeneidad de fenotipos que encontramos en las células de *pta2Δ* podría ser explicada por el hecho de que las células se encuentren en diferentes estadios del ciclo celular (Ge W, *et al* 2005), o bien por la capacidad que tienen las células de *pta2Δ* de despolarizar las zonas hiperpolarizadas en las que se da un crecimiento activo. También cabe destacar que PP2A-*pta2Δ* presenta defectos en la organización de los filamentos de actina, así como en la localización de For3-GFP y de Cdc42 activo.

Resaltar los importantes defectos de citoquinesis que presentan las células de *pta2Δ* cuando se crecen a alta temperatura. Éstos son similares a los defectos que se tienen cuando no se tienen ninguna de las subunidades reguladoras, ni las de tipo B ni B' (Kinoshita K, *et al* 1996; Jiang W, *et al* 2000; Le Goff X, *et al* 2001 y Lahoz A, *et al* 2010). Teniendo en cuenta esto, así como el análisis del fenotipo de las células de *pta2Δ*, nos sugiere que PP2A-Pta2 tiene un papel en morfogénesis y en citoquinesis.

- **PP2A-Pta2 participa en el establecimiento de las zonas activas de crecimiento durante el ciclo celular.**

Todas las células bipolares tras su división heredan el scar de la división previa. Algo similar se encuentra descrito que ocurre en las células del mutante *for3Δ* (Feierbach B, *et al* 2001). No está muy claro, pero se piensa que la herencia diferenciada del scar se encuentra relacionada con el establecimiento de la polaridad celular tras la división.

El tiempo de entrada en mitosis y las correspondientes cinéticas de crecimiento que presentan las células de *pta2Δ*, nos sugiere que el checkpoint de control del tamaño celular en G2/M se encarga de coordinar el crecimiento y la división en *S. pombe* (Jorgensen P, *et al* 2004 y Fantes P, *et al* 1997). Pudiendo explicar así por qué

las células monopolares y bipolares presentan una diferencia en la tasa de crecimiento, así como un tiempo diferente para la entrada en mitosis. La falta de función de PP2A, teniendo en cuenta los resultados previos existentes (Kinoshita N, *et al* 1993), actúa como un regulador negativo del control del tamaño y de la división celular. También puede entenderse que parte de esta regulación pueda deberse a la capacidad que tiene el complejo de PP2A de regular la tasa y el patrón de crecimiento.

Es posible que la dependencia del tamaño de entrada en mitosis sobre el patrón de crecimiento pueda ser una consecuencia de la prematura entrada en mitosis que presentan el mutante *pta2Δ*. Así que una desregulación del checkpoint que controla el tamaño de entrada en mitosis en las células de *pta2Δ* podría explicar también la asimetría causada entre las dos células hijas resultantes.

Así que PP2A-Pta2 podría estar promoviendo la activación de las zonas activas de crecimiento en los extremos nuevos generados tras la división. Esto posibilita que en una de las dos células hija presente un patrón de crecimiento igual al observado en las células de un wildtype, previniendo un prematuro crecimiento en los extremos nuevos generados.

Recordar que en las células en las que se ha eliminado la forma For3, éstas muestran una asimetría en el patrón de crecimiento entre las dos células hijas generadas tras la división, similar a lo observado en el mutante *pta2Δ* (Feierbach B, *et al* 2001). Así que es posible que cambios en la nucleación de cables de actina por parte de For3, dependientes de la activación de Cdc42 sean los responsables del crecimiento asimétricos entre ambas células hijas de *pta2Δ*.

Consistente con esta hipótesis, la delección del activador de Cdc42, Gef1 en un fondo *pta2Δ* hace decrecer el porcentaje de divisiones asimétricas, bipolar/monopolar, de un 76% a un 33% (Figura 5A). En el trabajo de Das M, *et al* 2007 se sugieren que cambios similares en el patrón de crecimiento pueden ser explicados por una activación ectópica de Cdc42, causada por la ausencia del GAP, Rga4. Esta información apoyaría nuestro modelo, pero en contraposición, cabría resaltar que mutantes en los factores de polaridad (*tea1Δ*, *tea4Δ* y *pom1Δ*) también produce alteraciones el patrón de crecimiento, pero que no participan en la regulación de Cdc42, sólo generan células monopolares (Huisman SM, *et al* 2011).

- **Interacciones genéticas entre Pta2 y los factores de polaridad celular.**

La negativa y fuerte interacción que se produce entre los genes *pta2* y *for3* nos recuerda a la completa pérdida de polaridad celular en el doble mutante de *for3* con los componentes de exocisto (Bendezu FO, *et al* 2011 y Estravis M, *et al* 2011); incrementando así la posibilidad de PP2A pudiese estar regulando las funciones del exocisto. Señalar que los defectos en la polarización celular del mutante *pta2Δ* son aditivos a los defectos en los mecanismos de polarización celular dependientes de actina y de microtúbulos.

- **PP2A-Pta2 regula los niveles y la actividad de Cdc42.**

Teniendo en cuenta que Gef1 es un activador y Rga4 es un inhibidor de Cdc42, los fenotipos de los dobles mutantes son consistentes con que en las células de *pta2Δ* haya una mayor actividad de Cdc42.

Las dos alteraciones más importantes que aparecen en las células de *pta2Δ*, como son alteraciones en el patrón de crecimiento (Das M, *et al* 2007 y Janssens V, *et al* 2001); y una pérdida de polaridad (Miller PJ, *et al* 1994 y Etienne-Manneville S, *et al* 2004); ambas son consistentes con el papel que juega Pta2 en la desregulación de Cdc42.

Para resumir podemos decir que las células de *pta2Δ* presentan algunos fenotipos, entre los que cabe resaltar la implicación que tiene PP2A en la regulación de la morfogénesis y el ciclo celular.

- Alteraciones de la polaridad celular y en la forma de las células de *pta2Δ*; así como alteraciones en el patrón de crecimiento sugiere que PP2A tiene un papel en la reorganización de la maquinaria de actina después de la división celular; y en el mantenimiento de las zonas de crecimiento polarizado.
- Defectos morfológicos que presenta las células de *pta2Δ* son aditivos a defectos en el mecanismo de polarización celular dependientes de MTs (*pta2Δtea1Δ* o *pta2Δtea4Δ*); y también a la ausencia de cables de actinas

(*pta2Δfor3Δ*), produciendo en ambos casos una pérdida de polaridad celular y un crecimiento isotrópico de las mismas.

- El patrón de crecimiento de *pta2Δ* se encuentra parcialmente suprimido por la delección de Gef1, mientras que los defectos morfológicos de las células de *pta2Δ* son aditivos a la delección del GAP de Cdc42, Rga4. PP2A-Pta2 puede regular la estabilidad o el reciclaje de la GTPasa Cdc42, por eso en las células *pta2Δ* se observa un incremento de los niveles totales y activos de Cdc42.
- Aunque la falta de función de *rga4* no tiene un gran impacto en los niveles de Cdc42 activo (Das M, et al 2007), las células de *rga4Δ* tienen una pérdida del control espacial de dicha GTPasa. En un wildtype Rga4 queda restringido a las regiones laterales de la célula dejando competentes los extremos para crecer por ellos (Tatebe H, et al 2008). Esto sugiere que Rga4 regula negativamente el crecimiento celular por el sitio de división; produciendo una prematura activación del crecimiento en el polo nuevo (Das M, et al 2007). Es posible que los altos niveles de Cdc42 activo causados por una falta de función de PP2A pueda tener algunas consecuencias en la pérdida de Rga4, produciendo así una alteración del patrón de crecimiento.
- La función de PP2A-Pta2 se encuentra implicada en la regulación de polaridad celular mediante la desregulación de la GTPasa Cdc42, la cual está implicada en el control espacial a través del citoesqueleto de MTs y actina.

CAPITULO 2: BUSQUEDA DE SUSTRATOS DE LA FOSFATASA PP2A

En este capítulo se ha descrito las dos estrategias proteómicas generales usadas para la búsqueda de sustratos del complejo de PP2A. En la primera de ellas se realizó una electroforesis en geles bidimensionales, comparados cambios en el proteoma de dos mutantes de PP2A; y la segunda se utilizó una inmunoprecipitación del complejo para posteriormente identificar las proteínas asociadas a él. En ambos casos los posibles sustratos se mandaron a identificar mediante espectrometría de masas.

En la primera aproximación, se encontraron diferencias significativas en la abundancia de los 55 spots, que se correspondía con 27 proteínas diferentes, entre la cepa control y las cepas con una actividad reducida de PP2A. Además, se encontró un solapamiento significativo entre los cambios proteicos en *pta2Δ* y *pab1-4*, 24/27 eran comunes en ambos mutantes, sugiriendo que esos cambios eran una consecuencia de la inactivación de PP2A y no un resultado de otros defectos adicionales. Los cambios fueron más pronunciados en el mutante de la subunidad reguladora de tipo B (*pab1-4*) que en el mutante *pta2Δ*, que se encarga de regular la subunidad catalítica. Esto es consistente con el fuerte fenotipo que presentan las células de *pab1-4*, que es más sensible en los ensayos de estrés, presentan una menor tasa de crecimiento y presenta unos defectos morfológicos más acusados que los que presentan las células de *pta2Δ*, (Bernal M, *et al* 2012; Lahoz A, *et al* 2010 y Goyal A, *et al* 2012).

Aproximadamente, un cuarto de las proteínas identificadas mediante 2D-DIGE (7/27) muestran en *S. cerevisiae* una interacción física y/o genética con la subunidad catalítica (PPH22), las reguladoras (RTS1 y CDC55) o PTPAs (RRD1 y RRD2). Las proteínas Hsp90 y Gpd1 que son fosfoproteínas en *S. pombe* (Wilson-Grady J. T, *et al* 2008) fueron identificadas en múltiples spots, distribuidos de manera adyacentes y que podrían representar diferentes formas fosforiladas; convirtiéndose en importantes candidatos para interactuar directamente con el complejo de PP2A. Consistente con este punto de vista, la interacción física entre Hsp90 y el regulador RRD2 que se da en *S. cerevisiae* está descrita en Millson S. H, *et al* 2005; mientras que Gpd1 se identificó como una proteína de unión en *S. pombe*, (Singh N. S. *et al* 2011). De hecho en el experimento 2D-DIGE se identificó 12/27 como fosfoproteínas descritas en *S. pombe*, incluyendo las proteínas que se identificaron presentes únicamente en un único spot,

(Wilson-Grady J. T, *et al* 2008). También es posible que la disminución de la intensidad en algunos spots en los mutantes de PP2A pueda deberse a cambios en la fosforilación de las mismas, si las formas fosforiladas son rápidamente marcadas para ser degradadas, difícilmente se podrían detectar en un gel 2D. Un ejemplo de esto podría ser la fosfoproteína Sks2, una chaperona ribosomal, la cual se observó que la degradación proteica (el spot 6 correspondiente a este estado) estaba más elevada en ambos mutantes de PP2A. En la literatura están descritos algunos otros ejemplos, como es el caso del oncogén c-Myc, la estabilidad de dicha proteína se encuentra regulada mediante fosforilación, el cual se encuentra controlado por el balance de la quinasa glicógeno sintasa 3 β y de la fosfatasa PP2A, (Liu L, *et al* 2012). También está descrito como la proteólisis dependiente de PP2A es esencial para reguladores esenciales en la producción de etileno en las plantas, (Skotteke K. R, *et al* 2011).

Alternativamente, la disminución en la abundancia de algunos spots en los mutantes de PP2A podría deberse a cambios en el funcionamiento del proteosoma mediado por PP2A. La presencia de componentes del sistema de ubiquitinación del proteosoma como es Rpn2, presentes en el ensayo de inmunoprecipitación del complejo de PP2A (Tabla III), podría explicar la posibilidad de que PP2A estuviese regulando la degradación de proteínas, (Kimura Y, *et al* 2003). Está descrito como PP2A interacciona y regula el proteosoma en el músculo cardíaco, al tener un papel antagónico en este tejido a la protein kinasa A, (Zong C, *et al* 2006).

También es posible que algunos cambios encontrados en el 2D-DIGE sean debidos a una regulación transcripcional. Por ejemplo, en el caso del gen *gpd1* se observó un descenso bastante significativo de los niveles de ARNm en el mutante *pab1-4*, además se observó en el gel 2D una redistribución de los spots similar a la que presentan las proteínas con diferentes fosfoisoformas (Figura 16 y Figura 18).

En la segunda aproximación empleada, en la inmunoprecipitación del complejo de PP2A, se identificaron una gran cantidad de potenciales sustratos. Además, 4 de esas proteínas también fueron identificadas en el experimento de 2D-DIGE (Tdh1, Sks2, Fba1 y Sam1). Éstas son unos importantes candidatos a ser sustratos directos de PP2A, ya que han sido identificadas por dos experimentos independientes.

El análisis de las categorías GO representadas en el 2D-DIGE y el experimento de inmunoprecipitación pone de manifiesto que algunos procesos celulares podrían ser regulados por PP2A (Figura 20). Además, las proteínas identificadas en ambas aproximaciones están enriquecidas en las categorías GO en las que existe un mayor grado de solapamiento; entre las que se incluye el metabolismo del carbono, la producción de energía y el plegamiento proteico. Esto sugiere que estos procesos biológicos en *S. pombe* se encuentren regulados por la actividad de PP2A. Por ejemplo, la reducción del metabolismo del carbono y la síntesis de aminoácidos podrían producir una reducción en la tasa de crecimiento, característico de los mutantes de PP2A.

También es posible que los defectos en la forma en ambos mutantes puedan causar un crecimiento lento, que a su vez llevaría a cambios en el metabolismo del carbono, de los aminoácidos y de las vitaminas. Además, estos fenotipos parecen ser específicos de las células que presentan una falta de función de la subunidad reguladora de tipo B, Pab1; que no son compartidos con las otras subunidades reguladoras de tipo B', Par1 y Par2, las cuales muestran una tasa de crecimiento normal.

Los potenciales cambios en los niveles de fosforilación de Gpd1, enzima encargada de la regulación de la síntesis de glicerol durante los procesos de osmoregulación (Aiba H, *et al* 1995 y Ohmiya R, *et al* 1995), se observaron en los dos mutantes de falta de función de PP2A. De hecho está descrito que Gpd1 interacciona físicamente con el complejo de PP2A (Singh N. S, *et al* 2011), y además ésta se encontró en múltiples spots que se disponían de manera adyacentes en el gel, de manera opuesta en ambos mutantes con respecto al wildtype (Figura 16). Sugiriendo una implicación directa de PP2A en la osmoregulación mediante la fosforilación de Gpd1, (Aiba H, *et al* 1995; Ohmiya R, *et al* 1995 y Degols G, *et al* 1996). Sin embargo, solamente en el mutante *pta2Δ*, pero no en el mutante *pab1-4* se observó incrementos en los niveles intracelulares de glicerol. Estas diferencias entre ambos mutantes sugiere la presencia de mecanismos adicionales que regulen la homeostasis del glicerol, como una regulación transcripcional del gen *gpd1*, que funciona de manera diferente en los dos mutantes. Esta sería una manera adicional para poder explicar las diferencias encontradas en los niveles de glicerol entre ambos mutantes.

También se observó que tanto *pta2Δ* como *pab1-4* eran sensibles a estrés osmótico; y dado que los niveles de glicerol en ambos mutantes son diferentes, esto nos sugiere un papel de PP2A en la osmoregulación celular independientemente de su implicación en el metabolismo del glicerol.

PP2A también está descrito que regula el ciclo celular, la citoquinesis y la morfogénesis (Singh N. S, *et al* 2011; Bernal M, *et al* 2012; Jiang W, *et al* 2000; Kinoshita K, *et al* 1996, Kinoshita N, *et al* 1990; Kinoshita N, *et al* 1993; Le Goff X, *et al* 2001; Lahoz A, *et al* 2010 y Goyal A, *et al* 2012). En este capítulo se han encontrado algunas proteínas que podría participar en estos procesos, entre las que se encuentran incluidas Hsp90, Wos2, Rad24 y Clp1/Flp1. Hsp90 y Wos2 regulan la progresión del ciclo celular y el ensamblaje del anillo de actomiosina durante la citokinesis (Aligue R, *et al* 1994; Mishra M, *et al* 2005; Munoz M. J, *et al* 1999 y Santino A, *et al* 2012), mientras que Rad24 y Cdc14 regula la transición G2/M, (Cueille N, *et al* 2001; Esteban V, *et al* 2004; Lopez-Girona A, *et al* 1999 y Trautmann S, *et al* 2001). También es posible que los niveles celulares de algunas dianas de PP2A, responsables de la regulación del ciclo celular o de la morfogénesis, no puedan ser detectadas por las técnicas analíticas empleadas en ambas aproximaciones.

V. CONCLUSIONES

1. Based on protein sequence conservation, *pta1* and *pta2* are the *S. pombe* orthologues to *S. cerevisiae* protein phosphatase phosphoactivators *RRD1/YPA1* and *RRD2/YPA2*.
2. Pta2 physically associates to the PP2A complex in the fission yeast.
3. Proteome-wide analysis of the PP2A mutants *pab1-4* and *pta2Δ* reveals multiples pathways likely regulated by PP2A, including cell cycle, morphogenesis, glycerol synthesis, carbon metabolism, amino acid biosynthesis, vitamin production and protein folding.
4. Deletion of *pta2*, (*PP2A-pta2Δ*) is viable and fenocopy morphological defects of PP2A deficiency.
5. *PP2A-pta2Δ* become essential for viability when either, the MOR signalling pathway, the exocist or the nucleation of actin cables are deficient.
6. Morphological defects of *PP2A-pta2Δ* are also additive to the deletion of Cdc42 inhibitor Rga4, but in this case, the double mutant was viable.
7. The *PP2A-pta2Δ* mutant showed increased levels of total and active Cdc42 (GTP-bound).
8. The MOR signalling pathway and PP2A regulate the architecture and dynamics of Rga4 nodular domain. The morphogenetic defects of PP2A mutants might be partially explained by the lack of this control.
9. Our data is consistent with a model in which PP2A might regulate downstream components of the MOR to spatially control Cdc42 activity. Gef1 and Rga4 are both candidates for this regulation. In addition to this control, our data is also consistent with a role of PP2A in the regulation of upstream components of the MOR.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Nomenclatura

A lo largo de esta tesis, los genes de *Schizosaccharomyces pombe* se nombran con tres letras minúsculas en cursiva seguidas de un número; ej. *pta2*. Cuando se designan alelos mutantes se especifican detrás del gen separados por un guión; ej. *wee1-50*. Para hacer referencia a la proteína correspondiente se nombra con las mismas letras que el gen, pero la primera letra en mayúscula y si no se escribe en cursiva; ej. Pta2. En el caso de *S. cerevisiae* los genes se indican con tres letras en mayúscula y en cursiva; y las proteínas se refieren como en *S. pombe*.

La delección de un gen se indica con el signo " Δ "; ej. *pta2* Δ . El signo ":: Δ " se utiliza para describir a un gen que ha sido reemplazado por otro; ej. *pta2::ura4* (el gen *ura4* reemplaza a *pta2*). El signo ":" indica una fusión entre dos secuencias de DNA; ej. *pta2:GFP* (el gen *pta2* se encuentra fusionada al extremo carboxilo de la proteína GFP, **Green Fluorescent Protein**).

Los sexos de *S. pombe* de cepas heterotálicas se indican como h⁺ y h⁻ y son variaciones mutantes estables de la cepa homotálica original.

Cuando se indica el genotipo de una estirpe concreta, los loci a los que se hace referencia se separan por comas; ej. *leu1-32, ura4-D18*. Si la cepa lleva un plásmido, se indica el genotipo de la cepa; y separado por una barra inclinada se señala el plásmido que contiene; ej. *leu1-32 / pRep41:pta2:EGFP*.

2.- Estirpes utilizadas

Cepa	Genotipo	Procedencia
RD312	<i>h+ wt ade6-M210 ura4-D18 leu1-32</i>	R. Daga
RD313	<i>h- wt ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	R. Daga
RD1192	<i>h+ pta2::ura4+ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1193	<i>h- pta2::ura4+ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1439	<i>h+ paa1:pK ade6- leu1-32</i>	Este trabajo
RD821	<i>h- pta2:GFP:kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1349	<i>pta2::ura4+ tea1:GFP:kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1292	<i>pta2::ura4+ for3:3GFP:ura4+ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1298	<i>pta2::ura4+ rga4:GFP:kanMX6 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1306	<i>h- pta2::ura4+ CRIB:GFP:ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1304	<i>h- te1:GFP:kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	R. Daga
YSM423	<i>h- for3:3GFP-ura4+ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	F. Chang
CA4699	<i>h- rga4:GFP:kanMX6 ura4-D18 leu1-32</i>	K. Shiozaki
CA5931	<i>h- CRIB:GFP-ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	K. Shiozaki
RD2064	<i>h- pta2::ura4+ gef1::ura4+ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1346	<i>h+ gef1::ura4+ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	R. Daga
PP70.04	<i>h- cdc42-1625:knaMX6 ura4-D18 leu1-32</i>	P. Perez
RD1266	<i>pta2::ura4+ tea4::kanMX6 ade6- ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
RD1262	<i>pta2::ura4+ tea1::ura4+ ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
RD1294	<i>pta2::ura4+ rga4::ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
PN1734	<i>h+ tea1::ura4+ ura4-D18 ade6-M216</i>	P. Nurse
YSM144	<i>h+ tea4::kanMX6 ade6- leu1-32 ura4-D18</i>	F. Chang
CA4166	<i>h- rga4::ura4+ ura4-D18 lue1-32</i>	K. Shiozaki
RD1459	<i>h- for3::kanMX6 ade6- ura4-D18 leu1-32</i>	F. Chang
RD187	<i>h+ pom1::ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	R. Daga
RD1494	<i>h+ HA:cdc42 ade6-M16 leu1-32 ura4-D18</i>	R. Daga
RD1505	<i>pta2::ura4+ HA:cdc42 ade6- ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
JJ628	<i>h pab1-4 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	J. Jimenez

3.- Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos de células de *S. pombe* se realizaron en medio rico YE (*Yeast Extract*) y en medio mínimo EMM (*Edinburgh Minimal Medium*), tal como se encuentra descrito en Moreno S, *et al* 1991. Ambos medios eran suplementados con adenina, histidina, uracilo y leucina, a una concentración final de 225 mg/l, excepto aquellos casos en los que se hacía necesaria la ausencia de uno de estos suplementos para selección de un plásmido o una cepa determinada. Al YE suplementado se le denominará YES y al EMM suplementado se le denominará EMM2. Para las cepas que expresaban un gen desde alguna de las variantes del promotor *nmt* (Maundrell KG, *et al* 1993) se adicionaba tiamina (5 µg/ml) a los cultivos para mantener el promotor apagado. Para trabajar en condiciones de alta expresión con estos promotores se lavaban tres veces los cultivos con medio EMM estéril y se cambiaban a un medio con EMM2, pero sin tiamina donde las células eran crecidas entre 16 y 27 horas.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2%.

- **Medio rico YES:** Se utilizó rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*.
- **Medio YES+Genéctica:** Se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* transformadas con el marcador de resistencia a genética. Estas placas se encuentran suplementadas con 100 µg/ml de sulfato de genética (G-418, Life Technologies).
- **EMM:** Se utilizó como medio en los experimentos de transformación de cepas de *S. pombe* auxótrofas para leucina o uracilo.
- **Medio de esporulación SPA:** Usado para inducir la conjugación y la esporulación de *S.pombe*.

Los medios de cultivo utilizados para *Escherichia coli* fue medio LB (*Luria Bernati*), preparados según Sambrook *et al* 1989. La selección de clones resistentes a ampicilina se realizó suplementando los medios con 100 µg/ml.

Todos los experimentos se llevaron a cabo con cultivos en fase exponencial, con una densidad óptica entre 0.2-0.6 a 600 nm. La temperatura de crecimiento de los cultivos de *S. pombe* fue de 30°C. Para los mutantes termosensibles la temperatura de

crecimiento permisiva fue de 25°C y la restrictiva de 36°C. Las células de *E. coli* se incubaron en medio líquido en agitación a 37°C. Para el crecimiento en medio sólido las células se incubaron en estufas a 37°C.

4.- Análisis genético

4.1.- Conjugación de cepas para la generación de dobles mutantes

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe*, se requiere un medio deficiente en nitrógeno, esto es detectado por las células que activan su programa de reproducción sexual, una temperatura de 25°C y cepas heterotálicas de tipo sexual opuesto (h+ o h-). Las células fueron incubadas previamente en placas de medio rico para recuperarlas del proceso de descongelación y asegurarnos que se encontraban creciendo satisfactoriamente. Se recogió aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa; y se mezclaron ambas en un pequeño volumen de agua estéril (5 µl) sobre una placa de SPA. Los cigotos se originan al cabo de 12-20 horas e inmediatamente sufren una meiosis y una esporulación, formando ascas con 4 ascosporas en su interior al cabo de 1-2 días de incubación a 25°C.

Existen dos maneras de analizar el genotipo de la descendencia producida:

- **Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación:** Las ascas resultantes de los cruces se micromanipularon en placas de YES y se analizó el genotipo de las cuatro esporas de cada tétrada mediante réplicas en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas.
- **Selección en masa:** Se cogió biomasa del cruce, cuando las ascas estaban maduras y se resuspendieron en 200 µl de agua estéril, a la que se le añadió β-glucoronidasa (Sigma) y se sembraron las esporas a temperatura permisiva en YES o EMM, dependiendo del cruce. Haciendo réplicas en medios selectivos o a distintas temperaturas se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado.

4.2.- Ensayos de crecimiento en gota

Los ensayos de gota en placa se realizaron de la siguiente forma: se crecieron todas las cepas a ensayar hasta la misma densidad óptica (entre 0.4 y 0.6); y se hicieron diluciones seriadas de 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Posteriormente, se sembraron las correspondientes diluciones de cada cepa en el medio y la temperatura que se requería para llevar a cabo el experimento.

5.- Técnicas generales de biología molecular

5.1.- Extracción de ADN genómico y plásmidos

Las extracciones de ADN genómico se realizaron a partir de cultivos estacionas de levaduras y se siguió el protocolo descrito en Moreno S, *et al* 1991. Para la extracción de ADN plasmídico con mayor pureza se utilizó el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche).

5.2.- Utilización de enzimas de restricción y polimerasas

Los tratamientos con enzimas de restricción, enzimas modificadoras del ADN y las PCR (BioTaq, Accuzyme, Long Expand Template System y Phusion High-Fidelity), se realizaron siguiendo las condiciones de uso suministradas por el fabricante.

5.4.- Clonación, selección y marcaje

La clonación, selección y amplificación de plásmidos se llevó a cabo mediante transformación de cepas de *Escherichia coli* DH5 α crecidas en los medios de cultivo LB a 37°C.

5.5.- Electroforesis y extracción de ADN de geles de agarosa

Las electroforesis de ADN o ARN se realizaron en geles de agarosa al 0.8%, y como buffer se empleó TAE o TBE, dependiendo del requerimiento del experimento.

Para de ADN de los geles se agarosa se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

5.6.- Secuenciación

La secuenciación se hizo según el método descrito en Sambrook *et al* 2001. Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp PCR System 2400 usando reactivos BIGDye terminators DNA sequencing kit de acuerdo con las instrucciones del manual. Las muestras se procesaron mediante un equipo de secuenciación automática Perkin Elmer Abi Prism 310 y se analizaron con el programa SeqmanII de Lasergene. Algunas de las secuenciaciones se enviaron a la empresa de secuenciación SECUGEN (www.secugen.es).

5.7.- Transformación de *S. pombe*

Las transformaciones de células de *S. pombe* se realizaron mediante el método de acetato de litio descrito en Bahler J, *et al* 1998a.

5.8.- Transformación de *E. coli*

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron según el protocolo descrito en Kushner *et al* 1978, usando bacterias competentes DH5 α .

5.9.- Southern-blot

5.10.- Extracción de ARN y Northern-blot

Se extrajo el ARN total mediante el kit QIAGEN RNeasy Mini (QIAGEN). Se corrieron 20 μ g de ARN en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó con una sonda del gen de *cdc42* de 449 pb (cuya posición se encuentra entre el 711-1160 del ORF de *cdc42*); y con otra sonda de 449 pb correspondiente al gen de la actina, que se usa como control (cuya posición se encuentra entre 591-1040 del ORF del gen de la actina). La detección autoradiográfica de las bandas se hizo utilizando el Molecular Dynamics PhosphorImager.

5.11.- PCR cuantitativa

Las muestras de ARN se obtuvieron utilizando un protocolo estándar a base de fenol ácido. Para la realización de la síntesis de DNAc se partió de un total de 0,8 μ g de

ARN total, para este primer paso se usó el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) con unos cebadors aleatorios de 6 pares de bases. La expresión de ARNm fue cuantificada mediante una PCR a tiempo real, éstas se realizaron una ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) usando para ello FluoCycle II MasterMix (Genycell Biotech); en un volumen final de 20 µl. Los valores umbrales (Ct) fueron determinados con el software ABI Prism 7000. La expresión de todos los genes fue normalizada a los niveles de ARNm para la actina, para esa misma muestra; y luego se compararon los niveles de expresión en un wildtype.

5.12. Determinación de la concentración intracelular de glicerol

Los cultivos utilizados para la determinación de glicerol intracelular fueron crecidos en medio rico a 30°C. Las células fueron recogidas por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos. El pellet fue transferido a tubos eppendorf y fueron lavados dos veces con 1 ml de agua desionizada, durante 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, las células se resuspendieron en 500 µl de agua a las que se le añadieron bolitas ácidas de vidrio (Sigma), tras unos segundos de agitación en el vortex se incubó todo 5 minutos a 100°C. La solución resultante se clareó por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos, del sobrenadante obtenido se utilizó 100 µl para la determinación de la concentración de glicerol. Para ello se utilizó un kit Glycerin UV-test (Boehringer Mannheim/R-Biopharm).

5.13.- Análisis de proteínas

a) Western-blot:

- **Obtención de extractos celulares**

Todos los ensayos proteicos se realizaron a partir de extractos celulares crecidos a densidad óptica entre 0.4 y 0.7. Las células se recogían por centrifugación y se lavaron con STOP buffer (NaCl 150 mM, NaF 50 mM, EDTA 10 mM y NaN₃ 1 mM, todo a pH 8.0). La extracción de proteínas se realizaron utilizando el tampón de lisis adecuado para cada experimento, utilizando como inhibidores de proteasas un cóctel de inhibidores de Roche, con o sin EDTA según el requerimiento del experimento.

Las células se lisaron con bolitas de vidrio (Sigma), en una Fast-Prep PF120 (Bio 101 Savant) durante 2 pulsos de 15 segundos a una potencia de 6.0; y se comprobó la rotura celular por observación al microscopio, al que se le añadía unos microlitros de SDS para asegurarse de que las células se encontraban totalmente lisadas.

Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se eliminaron mediante una decantación rápida, realizada a bajas revoluciones durante 2 minutos. Posteriormente el sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf limpio y se clareó la muestra centrifugándolo a 13.000 rpm durante 10 minutos. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de las misma se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinchonínico.

- **Electroforesis y electrotransferencia**

Los análisis de Western-blot se llevaron a cabo cargando cantidades equivalentes de proteína en geles de SDS-poliacrilamida de distinto porcentaje en función del experimento. El equipo utilizado para la fabricación de los geles, la electroforesis y la transferencia fue el Mini-PROTEAN-Electrophoresis-System (Bio-Rad).

Para la transferencia se utilizaron membranas de nitrocelulosa, Hybrom ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham Pharmacia Biotech); y ésta se realizó según las instrucciones que suministraba la casa comercial y usando un buffer de transferencia que llevaba metanol al 10% y CAPS al 1%.

- **Inmunodetección de proteínas**

Las membranas se bloquearon con leche al 10% en PBST (PBS y 0.01% de Tween-20) entre 30 y 60 minutos. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a la dilución adecuada en PBST al 5% durante toda la noche en un rotor a velocidad constante a 4°C. Seguidamente, se hicieron 6 lavados de 5 minutos con abundante PBST y se incubaron después con el anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa (HRP, "horseradish peroxidase"), para la mayoría de los casos. Esta incubación se produjo en un rotor durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este paso, las membranas se volvieron a lavar 6 veces con abundante PBST cada 5 minutos; y se le añadió el sustrato para la detección de la

actividad peroxidásica por quimioluminiscencia (ECL o Super Signal). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron usando películas de autoradiografía Kodak X-Omat (Sigma).

b) Determinación de la actividad GTPasa:

- **Producción de GST-CRIB**

La cantidad de Cdc42 activa se determinó mediante el ensayo de precipitación con GST-CRIB (*Cdc42/Rac Interactive Binding*) de la proteína Pak2 (Manser *et al* 1988). Este dominio sólo se asocia a Cdc42 cuando está unida a GTP. La proteína recombinante GST-CRIB se obtuvo en una cepa *DH5 α* de *E. coli* transformada con el plásmido pGEX-CRIB, (Reid *et al* 1996). Las bacterias transformadas se incubaron a 28°C en 500 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) hasta que alcanzaron una D.O. a 595 nm de 0.6. En este momento, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión del gen que codifica la proteína de fusión y se incubaron 3 horas más a 28°C en agitación.

Se recogieron las células por centrifugación a 5.000rpm y se resuspendieron en 20 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂HPO₄ 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM) frío al que se añadieron previamente inhibidores de proteasas (Cóctel de Roche Complete Mini EDTA- free) y lisozima (2mg/ml). Tras 30 minutos de incubación en hielo, las células se sonicaron 4 veces a una potencia media durante 30 segundos. Se añadió Tritón TX-100 a una concentración final del 1% y se centrifugaron las células lisadas a 10.000 rpm durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se añadieron 600 μ l de glutation-sefarosa al 50% previamente equilibrada con PBS y se incubó durante 2 horas a 4°C. A continuación, las bolas de glutation-sefarosa con la proteína de fusión GST-CRIB unida, se lavaron 3 veces con 40 ml de PBS, recogándose por centrifugación a 3.000 rpm. Por último, se resuspendieron al 50% en solución de lisis B: Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NaCl 20 mM, glicerol al 10%, MgCl₂ 2mM, DTT 0,1 mM y NP-40 al 0,5%, con inhibidores de proteasas.

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

- **Ensayo de unión**

Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio que expresaban HA-Cdc42 utilizando el tampón de lisis B descrito en el apartado anterior. Los extractos (2 mg de proteína total), se llevaron a 500 μ l con tampón de lisis B y se añadieron 10 μ g de GST-CRIB asociado a bolas de glutation sefarosa, que habíamos preparado anteriormente. Se incubaron 2-4 horas a 4°C y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis B. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 30 μ l de tampón de carga 2X y se realizó la electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12%. Tras la transferencia las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA 12CA5 para detectar la fracción de la proteína HA-Cdc42 unida a GTP que había precipitado al unirse al dominio CRIB, (Coll PM, *et al* 2003).

c) Inmunoprecipitación:

- **Ensayo de Inmunoprecipitación**

Para realizar los experimentos de inmunoprecipitación se partieron de 100 ml de cultivos de una cepa en la que habíamos marcado con PK la única subunidad estructural del complejo de PP2A, Paa1-PK; y de una cepa silvestre no marcada a una DO600 de 0.35. Centrifugamos el cultivo a 4°C, durante 5 minutos a 4000 rpm; y resuspendimos el pellet en 4 ml del buffer de IP a 4°C [Tris-HCl 25 mM (pH 7.5), Nonidet P-40 al 0,1% y NaCl 150 mM]. Las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas en 0,1 ml del mismo buffer, el cual se suplementó inhibidores de proteasa (Roche). Posteriormente las muestras se transfirieron a un eppendorf que contenía glass beads y las células se rompieron usando la Fast-Prep, 4 segundos a 4°C. El sobrenadante se pasó a otro eppendorf limpio y se centrifugo a 4°C a 14.000 rpm durante 10 min, para clarear la muestra.

- **Aislamiento y análisis de complejos proteicos**

Los lisados clareados que contenían un 1 mg de proteína total fue mezclado con 1,5 mg de Protein A Dynabeads (Invitrogen) y se unieron covalentemente a al anti-PK (este anti-PK se hizo en ratón procede del laboratorio del Dr. I. Hagan, Paterson Institute, Manchester, UK) se incubó en un rotor a 4°C durante 60 min. Las Dynabeads fueron recolectadas usando un sistema magnético y las muestras fueron lavadas tres

veces con 0,2 ml del buffer de IP en eppendorf siliconados que posibilitan un mejor lavado de las muestras.

Tras el proceso de lavado se cogió el buffer de IP procedente de la incubación con las Dynabeads; y el complejo formado antígeno-anticuerpo-Dynabeads se disolvió en el buffer de carga SDS-PAGE [Tris (2-carboximetil)-HCl 10 mM (Sigma)] a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE en gradiente entre 4-12% (BioRad); y fueron teñidos con plata (Silver Stain Kit, Pierce).

Se compararon las bandas diferenciales de la cepa en la que teníamos marcada Paa1-PK con respecto a la condición silvestre. Las bandas cortadas se digirieron con tripsina (Promega) durante 4 h a 37°C. Los péptidos de cada banda fueron analizados con un espectrómetro de masas, Thermo-Finnigan FT-ICR, usando el NanoMate chip como sistema de electrospray. Las muestras fueron mandadas a la Unidad de Genómica Funcional y Proteómica de la Universidad de Birmingham.

e) 2D-DIGE:

- **Obtención de extractos proteicos**

Para la obtención de extractos proteicos representativos del proteoma de la condición que queremos analizar se tomaron 4 réplicas biológicas de cada cepas que se quería estudiar, cada una de ellas se partió de 1 litro de cultivo (4×10^6 células/ml). Tras centrifugarlo y lavarlo 2 veces con buffer Tris-HCl 20 mM (pH 9), los pellets se guardaron a -80°C para posteriormente procesarlos. Las células se resuspendieron en un buffer de lisis [Tris-HCl 20 mM (pH 9), Na_3VO_4 10 mM, NaF 10 mM, y complementado un cocktail inhibidores de proteasa (cOmplete miniTM, EDTA-free, Roche)], a las que se le añadieron bolitas de vidrio (Sigma); y con ayuda de un Ribolyzer (Ribolyser, FP120) se produjo la lisis de las mismas. Seguidamente, se comprobó al microscopio el porcentaje de rotura de las células. Los extractos se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Se transfirieron los sobrenadantes a unos tubos limpios, los cuales se ultracentrifugaron durante 60 minutos a 100.000 rpm a 4°C.

- **Marcaje DIGE de las proteínas y separación mediante geles 2D**

Las proteínas totales se precipitaron con un kit, 2D Clean-Up (Amerschan Biosciences), posteriormente fueron resuspendidas en un buffer que contenía: Tris-HCl 30 mM (pH 8.5), CHAPS al 4% (específicos para los strips que usamos en el experimento de 2D, Immobiline DryStrip pH 3-10 NL), urea 7M y tiourea 2M. La concentración total de proteínas fue determinada usando un kit, RC DCTM Protein Assay (Bio-Rad); y una misma cantidad de proteínas totales fueron marcadas con dos fluoróforos diferentes Cy3-Dye y Cy5-Dye, para ello se utilizó un kit, CyDye DIGE Fluor minimal labeling (GE Healthcare, Life Sciences). En la tabla M1 se resumen la distribución de las diferentes réplicas biológicas y su correspondiente marcaje. Como control interno se utilizó una mezcla de todas las cepas a la misma concentración de proteínas, las cuales se marcaron con el fluoróforo Cy2-Dye. Este control interno se utilizó para todos los geles.

	Cy3	Cy5
gel1	<i>wt</i> (1)	<i>pta2Δ</i> (1)
gel2	<i>pta2Δ</i> (2)	<i>pab1-4</i> (1)
gel3	<i>pab1-4</i> (2)	<i>wt</i> (2)
gel4	<i>wt</i> (3)	<i>pta2Δ</i> (3)
gel5	<i>pta2Δ</i> (4)	<i>pab1-4</i> (3)
gel6	<i>pab1-4</i> (4)	<i>wt</i> (4)

Tabla M1: Distribución de las réplicas biológicas y su correspondiente marcaje con Cy3 o Cy5 en cada gel.

Para correr la primera dimensión se utilizaron strip 3-10 NL (Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 13 cm, GE Healthcare Life sciences) que se corrieron en un IPGphor (Pharmacia Biotech). Las condiciones utilizadas para correr estos strips son las descritas en la siguiente tabla M2. Después de correr la primera dimensión, los strips fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente en un buffer de equilibrado [Tris-HCl 50 mM (pH 8.5), 6 M de urea, 30% v/v de glicerol, 2% p/v de SDS y

10 mg/ml de DTT]. Seguidamente los strips fueron incubados otros 15 minutos en las mismas condiciones, pero utilizando un buffer ligeramente diferente, en vez de DTT, este lleva 25 mg/ml de yodoacetamida.

Step	Grad/Step&Hold	Voltage (V)	Time (h)	V/h
Rehydration	SH	-	10	-
S1	SH	500	1	500
S2	Gradient	1000	1	750
S3	Gradient	8000	3	13500
S4	SH	8000	3.75	30000
S5	SH	500	10	-

Tabla M2: Condiciones utilizadas para correr los strip en la primera dimensión.

SH (step&hold) vs Gradient hace referencia a la cinética del voltaje aplicado a los strips durante la primera fase.

Para correr la segunda dimensión se utilizó una fuente de electroforesis Ettan Dalt Six Elect (Amersham Biosciences), que nos permitió correr los 6 geles a la vez. Los geles se corrieron, inicialmente 5 W/gel durante 30 minutos; y luego se le aplicó 17 W/gel durante 4 horas. Como buffer de electroforesis se usó: Tri-HCl 250 mM, glicina 1,92 M y SDS al 1%.

- **Software de análisis de 2D-DIGE:**

Los geles se escanearon usando el Typhoon-9410; en los 3 canales en los que emitían los diferentes fluoróforos empleados para el marcaje, rojo, verde y azul. Posteriormente, los spots fueron visualizados con el software DeCyder 2D (v 7.0, GE Healthcare Fife Sciences). Una vez visualizados, se tiñeron los geles con nitrato de plata; y los spots de interés fueron cortados y mandados a analizar por espectrometría de masas.

- **Identificación proteica por espectrometría de masas:**

i) Digestión triptica de proteínas en gel

Los spots de proteínas se escindieron manualmente y transferidos a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo cónico perforado (Bruker Daltonik) cargadas con agua ultrapura. Las muestras se digirieron de forma automática en un robot Proteineer DP (Bruker Daltonik) bajo el control del programa dpControl 1.2. Se empleó el protocolo de digestión de Shevchenko *et al* con ligeras variaciones: los fragmentos fueron reducidos con DTT 10 mM (GE Healthcare) en bicarbonato amónico 50 mM (pureza: 99,5%; Sigma Chemical); y alquilados con yodoacetamida 55 mM (Sigma Chemical) en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo (calidad HPLC; Merck); y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación se añadió a los fragmentos tripsina porcina modificada (calidad secuenciación; Promega) a una concentración de 8 ng/ μ l en bicarbonato amónico 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 8 horas. Por último, se añadió ácido trifluoroacético al 0,5% (pureza: 99.5%; Sigma Chemical) para extraer péptidos y los digeridos resultantes se transfirieron a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo cónico (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

ii) Espectrometría de masas

Para el análisis de masas mediante MALDI se mezclaron volúmenes iguales de una solución digerida y de una disolución matriz compuesta por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker Daltonik) en acetonitrilo acuoso al 50% y ácido trifluoroacético al 0,25%. La mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado AnchorChip de 600 μ m (Bruker Daltonik), (Schuerenberg M, *et al* 2002) y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis de masas de las muestras se realizó de forma automática en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik), (Suckau D, *et al* 2003) empleando calibración interna bajo el control del programa flexControl 2.2 (Bruker Daltonik). En una primera etapa se midieron los espectros de masas MALDI-MS en el intervalo 800-4000 Da en modo reflector positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon 300 espectros individuales. Los espectros MALDI-MS fueron calibrados internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones

provenientes de la autólisis de la tripsina con $m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$. En una segunda etapa, se llevó a cabo el análisis de los iones fragmento en modo tándem (MS/MS) de aquellos iones precursores cuya relación señal-ruido en el espectro MALDI-MS superaba un valor umbral. Los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones, acumulándose 1000 espectros individuales. La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo $m/z = 800-3200$. El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el software flexAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik). También se llevó a cabo una revisión manual de los espectros MALDIMS y MS/MS para su readquisición, recalibración o reetiquetado en caso necesario empleando los programas mencionados más arriba y software casero.

iii) Búsqueda en bases de datos

Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa BioTools 3.0 (Bruker Daltonik) para buscar en una base de datos no redundante (NCBI nr; $\sim 10^7$ entradas; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EE.UU.; o SwissProt; $\sim 5 \times 10^5$ entradas; Swiss Institute for Bioinformatics, Suiza) empleando el software Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido), (Perkins D. N, *et al* 1999). Otros parámetros de búsqueda relevantes fueron: enzima, tripsina; modificaciones fijas, carbamidometilcisteína; se permitió un corte fallido del enzima; tolerancia en péptidos, ± 20 ppm; tolerancia en MS/MS, ± 0.5 Da.

g) Software de análisis:

- **Alineamiento de secuencias proteicas**

Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron mediante el programa Clustal W, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

- **Determinación y clasificación de proteínas empleando los términos GO**

Las anotaciones GO para los genes encontrados en los experimentos de IP y 2D-DIGE se obtuvieron de los correspondientes archivos de asociaciones que se encontraron en la base de datos PomBase, (Aslett M, *et al* 2006); y convertidos a su correspondiente Slim GO terms para *S. pombe* usando el protocolo map2slim.pl procedente paquete go-perl. Posteriormente, se enriqueció los términos de la lista completa obtenida mediante la aplicación FuncAssociate 2.0, (Berriz G. F, *et al* 2009). El número de términos específicos GO fue normalizado haciéndolo relativo al número de genes procedentes del experimento de 2D-DIGE y de Inmunoprecipitación. (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/yeast/pombe/Gene_ontology/gene_association.GeneDB_Spombe, 09/24/2012).

6.- Construcción de la cepa *pta2*

6.1.- Delección del ORF de *pta2* (SPAC1782.05)

El gen de *pta2* fue delecionado mediante un fragmento de PCR consistente en el marcador de *ura4*, flanqueado por 728 pb upstream del ORF del gen *pta2* y 415 pb que corresponden con la región downstream el ORF.

Dicha construcción fue realizada en tres pasos: **1.** La región upstream de *pta2* fue amplificada usando la pareja de oligos 5' GACTAGTCGGCTGCAAGCATTATGAGTCTC 3' y 5' GGAATTCCGGCATAACTTGATCGGTTAAGAC 3', el producto de PCR fue digerida con *SpeI* y *EcoRI*; y clonado en pBIISK. **2.** El cassette de *ura4*, clonado en el plásmido pBSKura4+ fue digerido con *EcoRI* y *XhoI* y se clonó en el plásmido que contenía la región upstream de *pta2*. **3.** La región downstream del gen *pta2* fue amplificada usando la pareja de oligos 5' GGCATCAAGATACCAAGTGCGATC 3' y 5'GGGGTACCCCATGTATCTGCTTCTAGCAGC 3', posteriormente el fragmento generado fue digerido con *KpnI* y *XhoI*; y clonados dentro del pBIISK, el cuál contenía la región upstream y el cassette de *ura4*. Finalmente, se sacó por PCR una construcción de 2827 pb y para ello se utilizaron la parejas de oligos 5' GGCTGCAAGCATTATGAGTCTC 3' y 5' ATGTATCTGCTTCTAGCAGC 3'. El Fragmento resultante fue transformado en una cepa diploide. Las colonias *ura4+* positivas fueron seleccionadas y el remplazamiento del ORF del gen *pta2* fue comprobado por PCR y Southern blot.

6.2.- Marcaje con GFP

7.- Técnicas generales de biología celular

7.1.- Microscopía

a) Tipos de Microscopios utilizados

Para visualizar las células tanto al visible como con fluorescencia, fijadas o *in vivo*, utilizamos dos microscopios diferentes:

- Spinning disc confocal (Olympus IX81, Roper Scientific)
- Delta-vision widefield (Olympus IX71, Applied precisión)

b) Microscopía *in vivo*

En los experimentos de microscopía *in vivo*, se usaron cultivos creciendo en fase exponencial (DO: 0.2-0.5), se bajaron 1 ml de células a 2500 rpm durante 1-2 minutos y se resuspendieron entre 20-50 μ l del mismo medio.

Para el análisis del patrón de crecimiento partimos de un cultivo creciendo exponencialmente (0.2-0.5) a 30°C en YES; colocando las células en un agar patch, como se describe en Tran PT, *et al* 2001. Las imágenes fueron adquiridas con el objetivo de 100x (UPLANSAPO, NA 1.4) cada 10 minutos realizando entre 10 y 15 cortes de 0.5 μ m de grosor. Para otros experimentos de microscopía *in vivo* también se usaron las microplacas de MatTek de 35 mm (Sigma-Aldrich), a las que se fijaron las células con 0,2 mg/ml de soybean lectin (Sigma-Aldrich); y se añadió 3 ml de medio.

7.2.- Tinciones de citoesqueleto

a) Tinción de MTs

Para la visualización de los microtúbulos se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos contra la tubulina. Para ello se fijaron las muestras con metanol a -80°C y después se procesaron las muestras según lo descrito en Hagan IM, *et al* 1988. El anticuerpo anti-tubulina usado fue el TAT-1 a una dilución 1:80; y como secundario un anti ratón hecho el cabra denominado Alexa 488 (Molecular Probes).

b) Tinción de actina

La actina fue teñida según lo escrito en Pelham RJ, *et al* 2001, usando para ello AlexaFluor 488-phalloidin (Molecular Probes).

7.3.- Tinción de núcleos, pared celular y sitios activos de crecimiento.

Los núcleos se visualizaron con 0,2 µg/ml de DAPI (Sigma) o con 100 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma). Mientras que los septos y los sitios activos de crecimiento celular fueron visualizados usando una tinción de calcofluor de 35 µg/ml (fluorescent brightener; Sigma). En ambas tinciones se utilizó el protocolo descrito en Alfa *et al* 1993.

7.5.- Análisis de imágenes

Para el procesamiento de las imágenes e utilizó Adobe Photoshop, Imagen J y Metamorph.

La longitud celular y la intensidad de los cables de actina fue medida en una única sección usando ImagenJ (NIH, Bethesda, MD). Para la determinación del grado de significación de los cambios observados en el crecimiento celular y en el volumen se compararon mediante un t-test. Para calcular el volumen celular, se tomaron imágenes de DIC; y se midió con el ImagenJ, usando como aproximación de la forma celular un cilindro y dos semiesferas para las regiones de las puntas.

VII. ANEXOS

Tabla 1. Proteínas identificadas en el experimento de 2D-DIGE

Spot	Nombre Sistemático	Proteína	a ¹	b ¹	<i>pta2Δ</i>	<i>pab1-4</i>
24	SPAC23A1.03	Adenine phosphoribosyltransferase	9	138	3.24	9.55
9	SPBC8D2.18c	Adenosylhomocysteinase	13	426	-2.15	-1.68
10	SPBC8D2.18c	Adenosylhomocysteinase	13	217	-2.92	-1.36
48	SPBP35G2.12	ADP-ribose diphosphatase	7	132	2.77	5.51
43	SPBC119.10	Asparagine synthetase	13	185	-1.67	-2.68
19	SPBP8B7.05c	Carbonic anhydrase	6	167	2.86	5.53
25	SPBC30D10.05c	Conserved protein	8	146	4.4	10.27
7	SPCC364.07	D-3 phosphoglycerate dehydrogenase	21	687	-4.74	-3.39
46	SPBC19C2.07	Fructose-bisphosphate aldolase Fba1	8	151	1.36	2.16
50	SPBC354.12	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Gpd3	7	124	-1.63	6.7
15	SPBC32F12.11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	11	193	-6.8	-1.16
16	SPBC32F12.11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	20	779	-9.84	-1.81
12	SPBC215.05	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	12	364	2.21	3.06
13	SPBC215.05	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	12	313	2.67	4.26
14	SPBC215.05	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	8	162	2.23	4.85
38	SPBC215.05	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	17	471	-1.77	-3.41
49	SPBC215.05	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	17	987	1.9	-1.15
47	SPBC12C2.12c	Glyoxalase I	14	369	1.81	2.27

6	SPBC3B8.03	Heat-Shock Protein	11	214	2.16	2.91
6	SPBC1709.05	Heat-Shock Protein	9	273	2.16	2.91
41	SPBC1709.05	Heat-Shock Protein	15	591	-2.36	-2.52
8	SPAC24H6.04	Hexokinase 1	10	239	-2.17	-1.19
44	SPBC1105.02c	Homocitrate synthase	10	344	-2.25	-2.37
2	SPAC926.04c	Hsp90 chaperone	14	180	2.26	2.21
3	SPAC926.04c	Hsp90 chaperone	22	484	4.74	18.46
4	SPAC926.04c	Hsp90 chaperone	25	532	4.13	9.54
17	SPAC926.04c	Hsp90 chaperone	8	442	2.2	1.79
34	SPAC926.04c	Hsp90 chaperone	13	169	-1.29	-4.15
45	SPAC926.04c	Hsp90 chaperone	10	207	4.03	7.88
18	SPBC119.03	Human COMT homolog 1	8	231	2.89	2.54
51	SPBC21C3.08c	Ornithine aminotransferase	5	186	1.88	5.47
23	SPAC9E9.13	p23 homolog Wos2	1	87	2.23	-1.11
28	SPAC9E9.13	p23 homolog Wos2	1	86	3.21	5.19
5	SPAC1F8.07c	Pyruvate decarboxylase	13	475	-2.32	-3.28
42	SPAC1F8.07c	Pyruvate decarboxylase	23	566	-1.86	-2.25
20	SPAC8E11.02c	Rad24	11	279	2.79	8.68
32	SPAC8E11.02c	Rad24	7	119	1.07	-3.28
30	SPBC14F5.05c	S-adenosylmethionine synthetase	17	549	-2.13	-2.18

11	SPBC26H8.01	Thiazole biosynthetic enzyme	10	401	-7.88	-35.8
21	SPAC1142.02c	TPR repeat protein, SGT family	3	123	2.57	5.51
1	SPBC2G5.05	Transketolase	13	213	-2.14	-2.1
31	SPBC2G5.05	Transketolase	21	291	-1.86	-1.42
33	SPAC3C7.14c	Ubiquitinated histone-like protein Uhp1	4	207	-1.03	-2.44

*a*¹ Matched peptides *b*¹ MASCOT score

Tabla 2. Proteínas identificadas en el experimento de IP

Nombre Sistemático	Proteína	a¹	b¹
SPAP8A3.09c	Protein phosphatase regulatory subunit Paa1	62	1366,29
SPAC23G3.06	U3 snoRNP protein Nop58	30	747,54
SPAC140.02	Nucleolar protein required for rRNA processing	62	571,48
SPBC16H5.07c	Serine/threonine protein phosphatase Ppa2	20	559,05
SPAC12G12.04	Mitochondrial heat shock protein Hsp60/Mcp60	18	507,07
SPBC32F12.11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	19	470,09
SPBC32H8.12c	Actin Act1	20	456,53
SPBC2D10.10c	Fibrillarin	24	423,58
SPCC1902.02	Oxidoreductase	17	403,39
SPBC17D1.06	ATP-dependent RNA helicase Dbp3	22	398,89
SPAC23A1.10	Translation elongation factor EF-1 alpha Ef1a-b	10	343,88
SPCC13B11.01	Alcohol dehydrogenase Adh1	14	343,14
SPCC188.02	Protein phosphatase regulatory subunit Par1	10	304,72
SPBC17D11.05	Translation initiation factor eIF3a	15	287,93
SPBC1709.05	Heat shock protein, ribosome chaperone Sks2	14	274,70
SPBC1734.01c	Pre-rRNA processing protein Esf1	19	231,91
SPCC320.10	Signal recognition particle subunit Srp72	12	214,31
SPCC1739.13	Heat shock protein Ssa2	8	208,40

SPAC1F5.02	Protein disulfide isomerase	8	202,86
SPAC1486.04c	Medial ring protein Alm1	11	202,15
SPBP8B7.11	Ubiquitin protease cofactor Glp1	2	179,29
SPAC1782.05	Phosphotyrosyl phosphatase activator Ypa2	9	172,33
SPBC685.06	40S ribosomal protein S0A (p40)	7	168,41
SPAC6F6.03c	Ribosome export GTPase	7	167,36
SPAC1782.09c	Cdc14-related protein phosphatase Clp1/Flp1	14	160,45
SPAC57A7.12	Heat shock protein Pdr13	8	155,16
SPBP22H7.02c	RNA-binding protein Mrd1	8	153,75
SPCC584.01c	Sulfite reductase NADPH flavoprotein subunit	7	152,77
SPBC530.10c	Mitochondrial adenine nucleotide carrier Anc1	5	151,53
SPCC594.01	DUF1769 family protein	3	148,89
SPAC29A4.04c	Pseudouridylate synthase Cbf5	6	143,12
SPCC1020.06c	Transaldolase	9	140,36
SPAC4H3.10c	Pyruvate kinase	5	138,76
SPAPJ698.02c	40S ribosomal protein S0B	7	131,63
SPBC17D11.07c	19S proteasome regulatory subunit Rpn2	7	129,59
SPBC11B10.10c	Histone H2A variant H2A.Z, Pht1	2	125,73
SPAC823.15	Minor serine/threonine protein phosphatase Ppa1	2	122,42
SPAC664.08c	Traub family, involved in ribosome biogenesis	8	121,48

SPAC821.10c	Superoxide dismutase Sod1	5	112,70
SPCC1322.04	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase Fyu1	7	106,71
SPCC622.09	Histone H2B Htb1	6	103,95
SPCC1795.11	Translation initiation RNA helicase Sum3	4	102,27
SPAC3A12.10	60S ribosomal protein L20a	4	101,04
SPBC3F6.04c	U3 snoRNP protein Nop14	7	96,76
SPCC825.01	Ribosome biogenesis ATPase, Arb family ABCF-1-like	13	93,83
SPAC27D7.02c	GRIP domain protein	9	88,94
SPAC637.07	Translation initiation factor eIF3d Moe1	4	87,66
SPBC1709.09	Mitochondrial translation termination factor Rrf1	7	86,73
SPBC646.10c	U3 snoRNP protein Nop56	7	86,19
SPAC3G9.09c	Translation initiation factor eIF2 alpha subunit	8	86,17
SPBC19F8.03c	ENTH/VHS domain protein	1	85,32
SPAC1834.02	Pentafunctional aromatic polypeptide Aro1	3	84,66
SPBC19C2.07	Fructose-bisphosphate aldolase Fba1	6	83,89
SPBC14F5.05c	S-adenosylmethionine synthetase	3	81,13
SPBC646.09c	EIF3e subunit Int6	5	80,27

*a*¹ Matched peptides *b*¹ MASCOT score

Tabla 3. Lista de proteínas procedentes del experimento de 2D-DIGE que tienen interacción física y/o genética en *S. pombe* y *S. cerevisiae*

Proteína	Interacción física y/o genética en <i>S. pombe</i>	Interacción física y/o genética en <i>S. cerevisiae</i>
Fructose-bisphosphate aldolase Fba1	Paa1	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Gpd3		RTS1 y PPH22
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	Paa1	RTS1 y PPH22
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	Paa1	
Heat shock protein Sks2		TPD3 y PPH22
Hexokinase 1	Paa1	CDC55 y RTS1
Hsp90 chaperone		RRD1 y RRD2
Ornithine aminotransferase	Paa1	
Rad24		CDC55 y RTS1
Ubiquitinated histone like protein Uhp1		RTS1

Interacción Física, Interacción Genética

Tabla 4. Lista de proteínas procedentes del experimento de IP que tienen interacción física y/o genética en *S. pombe* y *S. cerevisiae*

Proteína	Interacción física y/o genética en <i>S. pombe</i>	Interacción física y/o genética en <i>S. cerevisiae</i>
Nucleolar protein required for rRNA processing	Paa1	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	Paa1	RTS1 y PPH22
Actin Act1		TPD3, PPH21, PPH22 y RTS1
Fibrillarin	Paa1	
Oxidoreductase		PPH21 y PPH22
Alcohol dehydrogenase Adh1	Paa1	
Translation initiation factor eIF3a		TPD3
Heat shock protein, Sks2		TPD3 y PPH22
Protein disulfide isomerase	Paa1	RRD1 y CDC55
Medial ring protein Alm1	Paa1	
Ubiquitin protease cofactor Glp1		RRD1
Cdc14-related protein phosphatase Clp1/Flp1	Ppa2	TPD3 y CDC55
Transaldolase	Paa1	
Pyruvate kinase		RRD1
19S proteasome regulatory subunit Rpn2	Paa1	
Histone H2A variant H2A.Z, Pht1	Par1	CDC55
Superoxide dismutase Sod1		RRD1, RRD2 y RTS1

Pentafunctional aromatic polypeptide Aro1	Paa1	RTS1
Fructose-bisphosphate aldolase Fba1	Paa1	
EIF3e subunit Int6	Paa1	

Interacción Física, Interacción Genética

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, H.; Yamada, H.; Ohmiya, R.; Mizuno, T.** (1995). The osmo-inducible *gpd1+* gene is a target of the signaling pathway involving Wis1 MAP-kinase kinase in fission yeast. *FEBS Lett*, 376, (3), 199-201.
- Aligue, R.; Akhavan-Niak, H.; Russell, P.** (1994). A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *Embo J.*, 13, (24), 6099-106.
- Aslett, M.; Wood, V.** (2006). Gene Ontology annotation status of the fission yeast genome: preliminary coverage approaches 100%. *Yeast*, 23, (13), 913-9.
- Bahler, J.; and Nurse, P.** (2001). Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *Embo J.*, 20, 1064-73.
- Bahler, J.; Pringle, J. R.** (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.*, 12, 1356-70.
- Barr, F. A.; Elliott, P. R.; Gruneberg, U.** (2011). Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *J. Cell Sci.*, 124, (Pt 14), 2323-34.
- Beckett, P.** (2012). The basics of 2D DIGE. *Methods Mol. Biol.*, 854, 9-19.
- Benard, V.; Bohl, B. P.; Bokoch, G. M.** (1999). Characterization of *rac* and *cdc42* activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 13198-204.
- Bendezu, F. O.; Martin, S. G.** (2011). Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, 22, 44-53.
- Bernal, M.; Sanchez-Romero, M. A.; Salas-Pino, S.; Daga, R. R.** (2012). Regulation of fission yeast morphogenesis by PP2A activator *pta2*. *PLoS One*, 7, (3), e32823.
- Berriz, G. F.; Beaver, J. E.; Cenik, C.; Tasan, M.; Roth, F. P.** (2009). Next generation software for functional trend analysis. *Bioinformatics*, 25, (22), 3043-4.
- Bollen, M.; Gerlich, D. W.; Lesage, B.** (2009). Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol.*, 19, (10), 531-41.
- Cayla, X.; Goris, J.; Hermann, J.; Hendrix, P.; Ozon, R.; Merlevede, W.** (1990). Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry*, 29, 658-67.
- Chang, E. C.; Barr, M.; Wang, Y.; Jung, V.; Xu, H. P.; Wigler, M. H.** (1994). Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell*, 79, 131-41.
- Chang, F.; Martin, S. G.** (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a001347.
- Chang, F.; Peter, M.** (2003). Yeasts make their mark. *Nat. Cell Biol.*, 5, 294-9.
- Cho, U. S.; Morrone, S.; Sablina, A. A.; Arroyo, J. D.; Hahn, W. C.; Xu, W.** (2007). Structural basis of PP2A inhibition by small t antigen. *PLoS Biol.*, 5, (8), e202.
- Clarke, P. R.; Hoffmann, I.; Draetta, G.; Karsenti, E.** (1993). Dephosphorylation of *cdc25-C* by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Biology of the Cell*, 4, 397-411.
- Coll, P. M.; Trillo, Y.; Ametzazurra, A.; Perez, P.** (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell*, 14, 313-23.

Cueille, N.; Salimova, E.; Esteban, V.; Blanco, M.; Moreno, S.; Bueno, A.; Simanis, V. (2001). Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J. Cell Sci.*, 114, (Pt 14), 2649-64.

Das, M.; Wiley, D. J.; Chen, X.; Shah, K.; Verde, F. (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol.*, 19, 1314-9.

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

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

Drubin, D. G.; Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell*, 84, 335-44.

Esteban, V.; Blanco, M.; Cueille, N.; Simanis, V.; Moreno, S.; Bueno, A. (2004). A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *J. Cell Sci.*, 117, (Pt 12), 2461-8.

Estravis, M.; Rincon, S. A.; Santos, B.; Perez, P. (2011). Cdc42 Regulates Multiple Membrane Traffic Events in Fission Yeast. *Traffic*, 12 (12), 1744-58.

Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42-the centre of polarity. *J. Cell Sci.*, 117, 1291-300.

Feierbach, B.; Chang, F. (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr. Biol.*, 11, 1656-65.

Feierbach, B.; Verde, F.; Chang, F. (2004). Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J. Cell Biol.*, 165, 697-707.

Fellner, T.; Lackner, D. H.; Hombauer, H.; Piribauer, P.; Mudrak, I.; Zaragoza, K.; Juno, C.; Ogris, E. (2003). A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes Dev.*, 17, 2138-50. 16.

Ge, W.; Chew, T. G.; Wachtler, V.; Naqvi, S. N.; Balasubramanian, M. K. (2005). The novel fission yeast protein Pal1p interacts with Hip1-related Sla2p/End4p and is involved in cellular morphogenesis. *Mol. Biol. Cell*, 16, 4124-38.

Gentry, M. S.; Hallberg, R. L. (2002) Localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A subunits throughout mitotic cell cycle. *Mol. Biol. Cell*, 13, (10), 3477-92.

Goode, B. L.; Eck, M. J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 593-627.

Gong, Y.; Kakiyama, Y.; Krogan, N.; Greenblatt, J.; Emili, A.; Zhang, Z.; Houry, W. A. (2009). An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol. Syst. Biol.*, 5, 275.

Goyal, A.; Simanis, V. (2012). Characterization of ypa1 and ypa2, the *Schizosaccharomyces pombe* orthologs of the peptidyl prolyl isomerases that activate PP2A, reveals a role for Ypa2p in the regulation of cytokinesis. *Genetics*, 190, (4), 1235-50.

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

Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc. Trans*, 33, 891-5.

Hannus, M.; Feiguin, F.; Heisenberg, C. P.; Eaton, S. (2002). Planar cell polarization requires Widerborst, a B' regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *Development*, 129, (14), 3493-503.

Hayles, J.; Nurse, P. (2001). A journey into space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 647-56.

Hirota, K.; Tanaka, K.; Ohta, K.; Yamamoto, M. (2003). Gef1p and Scd1p, the Two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell*, 14, 3617-27.

Hoffman, G. R.; Cerione, R. A. (2000). Flipping the switch: the structural basis for signaling through the CRIB motif. *Cell*, 102, 403-6.

Hombauer, H.; Weismann, D.; Mudrak, I.; Stanzel, C.; Fellner, T.; Lackner, D. H.; Ogris, E. (2007). Generation of active protein phosphatase 2A is coupled to holoenzyme assembly. *PLoS Biol.*, 5, e155.

Hohmann, S. (1991). Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 173, (24), 7963-9.

Janssens, V.; Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.*, 353, 417-39.

Janssens, V.; Goris, J.; Van Hoof, C. (2005). PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15, (1), 34-41.

Janssens, V.; Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.*, 353 (Pt 3), 417-39.

Janssens, V.; Longin, S.; Goris, J. (2008). PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem. Sci.*, 33, (3), 113-21.

Jiang, W.; Hallberg, R. L. (2000). Isolation and characterization of par1(+) and par2(+): two *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding B' subunits of protein phosphatase 2A. *Genetics*, 154, 1025-38.

Jimenez, J.; Oballe, J. (1994). Ethanol-hypersensitive and ethanoldependent cdc- mutants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & General Genetics: MGG* 245, 86 95.

Jin, Z.; Shi, J.; Saraf, A.; Mei, W.; Zhu, G. Z.; Strack, S.; Yang, J. (2009). The 48-kDa alternative translation isoform of PP2A:B56epsilon is required for Wnt signaling during midbrain-hindbrain boundary formation. *J. Biol. Chem.*, 284, (11), 7190-200.

Jordens, J.; Janssens, V.; Longin, S.; Stevens, I.; Martens, E.; Bultynck, G.; Engelborghs, Y.; Lescrinier, E.; Waelkens, E.; Goris, J. (2006). The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 6349-57.

Kelly, F. D; Nurse, P. (2011). Spatial control of Cdc42 activation determines cell width in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, 22, 3801-11.

Kremmer, E.; Ohst, K.; Kiefer, J.; Brewis, N.; Walter, G. (1997). Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol. Cell Biol.*, 17, (3), 1692-701.

Kinoshita, K.; Nemoto, T.; Nabeshima, K.; Kondoh, H.; Niwa, H.; Yanagida, M. (1996). The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 1, 29-45.

Kimura, Y.; Saeki, Y.; Yokosawa, H.; Polevoda, B.; Sherman, F.; Hirano, H. (2003). N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409, (2), 341-8.

Kinoshita, N.; Ohkura, H.; Yanagida, M. (1990). Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell*, 63, 405-15.

Kinoshita, N.; Yamano, H.; Niwa, H.; Yoshida, T.; Yanagida, M. (1993). Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes & Development*, 7, 1059-71.

Kitajima, T. S.; Sakuno, T.; Ishiguro, K.; Iemura, S.; Natsume, T.; Kawashima, S. A.; Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature*, 441, (7089), 46-52.

Krogan, N. et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 440, (7084), 637-43.

Kume, K.; Koyano, T.; Kanai, M.; Toda, T.; Hirata, D. (2011). Calcineurin ensures a link between the DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth. *Nat. Cell Biol.*, 13, 234-42. 17.

Lahoz, A.; Alcaide-Gavilan, M.; Daga, R. R.; Jimenez, J. (2010). Antagonistic roles of PP2A-Pab1 and Etd1 in the control of cytokinesis in fission yeast. *Genetics*, 186, 1261-70.

Lackner, D. H.; Schmidt, M. W.; Wu, S.; Wolf, D. A.; Bahler, J. (2012). Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. *Genome Biol.*, 13, (4), R25.

Le Goff, X.; Buvelot, S.; Salimova, E.; Guerry, F.; Schmidt, S.; Cueille, N.; Cano, E.; Simanis, V. (2001). The protein phosphatase 2A B'-regulatory subunit par1p is implicated in regulation of the *S. pombe* septation initiation network. *FEBS Letters*, 508, 136-42.

Li, R.; Gundersen, G. G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 860-73.

Lin, F. C.; Arndt, K. T. (1995). The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. *Embo J.*, 14, 2745-59.

Liu, L.; Eisenman, R. N. (2012). Regulation of c-Myc Protein Abundance by a Protein Phosphatase 2A-Glycogen Synthase Kinase 3beta-Negative Feedback Pathway. *Genes Cancer*, 3, (1), 23-36.

Lopez-Girona, A.; Furnari, B.; Mondesert, O.; Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*, 397, (6715), 172-5.

Lundgren, K.; Walworth, N.; Booher, R.; Dembski, M.; Kirschner, M.; Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, 64, 1111-22.

Marks, J. and Hyams, J. S. (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.*, 39, 27-32.

Martin, S. G.; Chang, F. (2005). New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle*, 4, 1046-9.

Martin, S. G.; McDonald, W. H.; Yates, J. R.; Chang, F. (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Developmental Cell*, 8, 479-91.

Martin, S. G.; Rincon, S. A.; Basu, R.; Perez, P.; Chang, F. (2007). Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol. Biol. Cell*, 18, 4155-67.

Mata, J.; Nurse, P. (1997). tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell*, 89, 939-49.

May, J. W.; Mitchison, J. M. (1995). Pattern of polar extension of the cell wall in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Microbiol.*, 41, 273-7.

McCusker, D.; Denison, C.; Anderson, S.; Egelhofer, T. A.; Yates, J. R., 3rd; Gygi, S. P.; Kellogg, D. R. (2007). Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nat. Cell Biol.*, 9, 506-15.

Mishra, M.; D'Souza V, M.; Chang, K. C.; Huang, Y.; Balasubramanian, M. K. (2005). Hsp90 protein in fission yeast Swo1p and UCS protein Rng3p facilitate myosin II assembly and function. *Eukaryot. Cell*, 4, (3), 567-76.

Millson, S. H.; Truman, A. W.; King, V.; Prodromou, C.; Pearl, L. H.; Piper, P. W. (2005). A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slk2p (Mpk1p). *Eukaryot. Cell*, 4, (5), 849-60.

Miller, P. J.; Johnson, D. I. (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 1075-83.

Minc, N.; Boudaoud, A.; Chang, F. (2009). Mechanical forces of fission yeast growth. *Curr. Biol.*, 19, (13), 1096-101.

Mitchell, D. A.; Sprague, G. F., Jr. (2001). The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 488-500.

Mitchison, J. M.; Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.*, 75, 357-76.

Mochida, S.; Hunt, T. (2012). Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO Rep.*, 13, (3), 197-203.

Moreno, S.; Klar, A.; Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.*, 194, 795-823.

Moseley, J. B. and Nurse, P. (2009). Cdk1 and cell morphology: connections and directions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 21, 82-8.

Munoz, M. J.; Jimenez, J. (1999). Genetic interactions between Hsp90 and the Cdc2 mitotic machinery in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, 261, (2), 242-50.

Navarro, F. J.; Nurse, P. (2012). A systematic screen reveals new elements acting at the G2/M cell cycle control. *Genome Biol.*, 13, (5), R36.

Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature*, 422, 766-74.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344, 503-8.

- Ohmiya, R.; Yamada, H.; Nakashima, K.; Aiba, H.; Mizuno, T.** (1995). Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. *Mol. Microbiol.*, 18, (5), 963-73.
- Pal, G.; Paraz, M. T.; Kellogg, D. R.** (2008). Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. *J Cell Biol*, 180, 931-45.
- Pelham, R. J. Jr.; Chang, F.** (2001). Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Cell Biol.*, 3, 235-44.
- Pruyne, D.; Legesse-Miller, A.; Gao, L.; Dong, Y.; Bretscher, A.** (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 559-91.
- Pruyne, D. W.; Schott, D. H.; Bretscher, A.** (1998). Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J. Cell Biol.*, 143, 1931-45.
- Rempola, B.; Kaniak, A.; Migdalski, A.; Rytka, J.; Slonimski, P. P.; di Rago, J. P.** (2000). Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics: MGG* 262, 1081-92.
- Rincon, S.; Coll, P. M.; Perez, P.** (2007). Spatial regulation of Cdc42 during cytokinesis. *Cell Cycle*, 6, 1687-91.
- Rincon, S. A.; Ye, Y.; Villar-Tajadura, M. A.; Santos, B.; Martin, S. G.; Perez, P.** (2009). Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell*, 20, 4390-9.
- Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S.** (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, (18), 3551-67.
- Riedel, C. G.; Katis, V. L.; Katou, Y.; Mori, S.; Itoh, T.; Helmhart, W.; Galova, M.; Petronczki, M.; Gregan, J.; Cetin, B.; Mudrak, I.; Ogris, E.; Mechtler, K.; Pelletier, L.; Buchholz, F.; Shirahige, K.; Nasmyth, K.** (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature*, 441, (7089), 53-61.
- Russell, P.; Nurse, P.** (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, 45, 145-53.
- Russell, P.; Nurse, P.** (1987). Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, 49, 559-67.
- Santino, A.; Tallada, V. A.; Jimenez, J.; Garzon, A.** (2012). Hsp90 interaction with Cdc2 and Plo1 kinases contributes to actomyosin ring condensation in fission yeast. *Curr Genet.*, 58, (4), 191-203.
- Sents, W.; Ivanova, E.; Lambrecht, C.; Haesen, D.; Janssens, V.** (2013). The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J.*, 280(2):644-61.
- Shi, Y.** (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139, (3), 468-84.
- Shimanuki, M.; Kinoshita, N.; Ohkura, H.; Yoshida, T.; Toda, T.; Yanagida, M.** (1993). Isolation and characterization of the fission yeast protein phosphatase gene ppe1+ involved in cell shape control and mitosis. *Mol. Biol. Cell*, 4, 303-13.

Schuerenberg, M.; Luebbert, C.; Eickhoff, H.; Kalkum, M.; Lehrach, H.; Nordhoff, E. (2000). Prestructured MALDI-MS sample supports. *Anal. Chem.*, 72, (15), 3436-42.

Siegrist, S. E.; Doe, C. Q. (2007). Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes & Development*, 21, 483-96.

Singh, N. S.; Shao, N.; McLean, J. R.; Sevugan, M.; Ren, L.; Chew, T. G.; Bimbo, A.; Sharma, R.; Tang, X.; Gould, K. L.; Balasubramanian, M. K. (2011). SIN-inhibitory phosphatase complex promotes Cdc11p dephosphorylation and propagates SIN asymmetry in fission yeast. *Curr. Biol.*, 21, (23), 1968-78.

Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V.; Mann, M., In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.*, 1, (6), 2856-60.

Skottke, K. R.; Yoon, G. M.; Kieber, J. J.; DeLong, A. (2011). Protein phosphatase 2A controls ethylene biosynthesis by differentially regulating the turnover of ACC synthase isoforms. *PLoS Genet.*, 7, (4), e1001370.

Slupe, A. M.; Merrill, R. A.; Strack, S. (2011). Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res.*, 2011, 398751.

Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, (7), 952-65.

Tatebe, H.; Nakano, K.; Maximo, R.; Shiozaki, K. (2008). Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr. Biol.*, 18, 322-30.

Tatebe, H.; Shimada, K.; Uzawa, S.; Morigasaki, S.; Shiozaki, K. (2005). Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr. Biol.*, 15, 1006-15.

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

Tay, K. H.; Jin, L.; Tseng, H. Y.; Jiang, C. C.; Ye, Y.; Thorne, R. F.; Liu, T.; Guo, S. T.; Verrills, N. M.; Hersey, P.; Zhang, X. D. (2012). Suppression of PP2A is critical for protection of melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. *Cell. Death. Dis.*, 3, e337.

Trautmann, S.; Wolfe, B. A.; Jorgensen, P.; Tyers, M.; Gould, K. L.; McCollum, D. (2011). Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Curr. Biol.*, 11, (12), 931-40.

Van Hoof, C.; Martens, E.; Longin, S.; Jordens, J.; Stevens, I.; Janssens, V.; Goris, J. (2005). Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem J* 386, 93-102.

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

Wei, H.; Ashby, D. G.; Moreno, C. S.; Ogris, E.; Yeong, F. M.; Corbett, A. H.; Pallas, D. C. (2001). Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p. *J. Biol. Chem.*, 276, 1570-7. 19.

Wood, V. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415, (6874), 871-80.

Wilson-Grady, J. T.; Villen, J.; Gygi, S. P. (2008). Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J. Proteome Res.*, 7, (3), 1088-97.

Wu, J.; Tolstykh, T.; Lee, J.; Boyd, K.; Stock, J. B.; Broach, J. R. (2000). Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo. *Embo J.*, 19, 5672-81.

Wurzenberger, C.; Gerlich, D. W. (2011). Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, (8), 469-82.

Xu, Y.; Xing, Y.; Chen, Y.; Chao, Y.; Lin, Z.; Fan, E.; Yu, J. W.; Strack, S.; Jeffrey, P. D.; Shi, Y. (2006). Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*, 127, (6), 1239-51.

Yang, J.; Phiel, C. (2010). Functions of B56-containing PP2As in major developmental and cancer signaling pathways. *Life Sci.*, 87, (23-26), 659-66.

Yoshida, S.; Pellman, D. (2008). Plugging the GAP between cell polarity and cell cycle. *EMBO Rep.*, 9, 39-41.

Zong, C.; Gomes, A. V.; Drews, O.; Li, X.; Young, G. W.; Berhane, B.; Qiao, X.; French, S. W.; Bardag-Gorce, F.; Ping, P. (2006). Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners. *Circ. Res.*, 99, (4), 372-80.