



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Funció de la MAPKAP quinasa Srkl en resposta a pertorbacions del citoesquelet d'actina en *Schizosaccharomyces pombe*

Julia Llanes Velasco

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Funció de la MAPKAP quinasa Srk1 en resposta a
pertorbacions del citoesquelet d'actina en
Schizosaccharomyces pombe

Tesi presentada per

Julia Llanes Velasco

Programa

Doctorat en Biomedicina

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la **Dra. Rosa M. Aligué
Alemany**, en el Departament de Biomedicina de la Facultat de Medicina i
Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Barcelona, Juliol 2020

Departament de Biomedicina

Programa de Doctorat en Biomedicina

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat de Barcelona

*A mis padres,
que me lo han dado todo*

Agraïments

“Hello there!”

Obi-Wan Kenobi, Star Wars

Es difícil decir cuándo empezó todo esto. Se podría decir que empezó ese septiembre de 2016, cuando entré en el laboratorio 31 por primera vez. O un año antes, cuando entré en el Master que me traería hasta aquí. Muchos dirán que empezó en 2011, cuando decidí hacer la carrera de Bioquímica, pero yo ya me había enamorado de ella en el Bachillerato. Quizás viene incluso de antes, cuando me llevaba libros al colegio para poder leer en el recreo. La verdad es que no importa demasiado. Si has estado allí. Si crees que has contribuido en lo más mínimo en cómo soy hoy: GRACIAS.

“I am glad you are here with me. Here at the end of all things”

J. R. R. Tolkien, The Lord of the Rings

I en donar les gràcies, com no començar per tu, **Rosa**. Des del primer correu, des de la primera entrevista. Em vas donar una oportunitat de demostrar de què era capaç, i mai t'ho podré agrair prou. Sota la teva tutela he crescut no només com a professional, si no també com a persona. Has cregut en mi i m'has animat a ser la millor versió de mi mateixa. Però el que no podré oblidar mai és el tracte que m'has donat. Sempre ens has tractat amb el màxim respecte i, juntament amb en Ramon, ens heu fet sentir com de la família. Per això i per molt més, un milió de gràcies.

"If you want to know what a man's like, take a good look at how he treats his inferiors, not his equals."

Sirius Black, Harry Potter and the Goblet of Fire

A l'**Oriol** i la **Txus**. Sempre disposats a donar un cop de mà. Sobretot al principi, quan vaig entrar a cultius i vaig necessitar que m'adoptéssiu. Però això no va parar aquí. Sempre heu estat una font de coneixement i recolzament inesgotable.

“You want weapons? We're in a library! Books! The best weapons in the world!”

Doctor Who

Y cómo olvidar a mi Zape. A mi compañero de penurias. A mi media naranja en el laboratorio. **Edgar**, ha sido un camino largo y me siento orgullosa de poder decir que lo hemos recorrido juntos. Que hemos luchado codo con codo y nos hemos enfrentado a los problemas juntos. Y aunque tu poyata me haya sacado siempre de quicio, no habría podido hacer esto sin ti. Ánimo, porque pronto tú también serás Doctor y tendremos que ir a celebrarlo juntos.

"It matters not what someone is born, but what they grow to be."

Albus Dumbledore, Harry Potter and the Goblet of Fire

Laura, has sido mi rival más fuerte y mi mayor aliada. Tenerte en mi vida me ha enseñado a pensar rápido y abrir la mente. Has pasado por muchas cosas este último año y tú has demostrado ser todo un ejemplo de fuerza y optimismo. Aunque el destino te arrastre lejos de mí, siempre guardaré un sitio especial en mi corazón para ti.

“You know, no matter how much we fought,
I’ve always hated watching you leave.”

Leia Organa, Star Wars

¡A mis Minions! ¡Os adoro! Con vosotros he aprendido que el mundo está lleno de personas maravillosas y que el futuro está en muy buenas manos. **Michelle**, siempre dispuesta a arrimar el hombro. **Laurita**, con manías peores que las mías, hacías que yo pareciera normal. **David**, que aguantabas todas las tormentas y volvías a por más. **Tati**, eres puro amor. Por mucho que pasa el tiempo sigues a mi lado. **Lluc**, gracias por todos los recuerdos que me has dado.

“You can’t stop the change, any more than you
can stop the suns from setting.”

Shmi Skywalker, Star Wars

A mi Príncipe Azul, **Jon**. No puedo contar las veces que me has salvado la vida. Has sido el mejor compañero con el que alguien puede soñar. Ya sabes que digo lo tonto que eres, pero es porque no existe una palabra que describa el buen corazón que tienes. Te mereces los mayores tesoros del universo, y espero estar en tu vida para ver cómo los recibes.

“There’s a lot of things you need to get across this universe. Warp drive...
wormhole refractors... You know the thing you need most of all? You need a
hand to hold.”

Doctor Who

Y no hay príncipe sin Princesa. Mi queridísima **Carla**. El laboratorio puede llegar a ser un lugar oscuro, ¡pero tu alma es holográfica! Has llenado nuestros días de color y risas, y me has dado fuerzas para sonreír día a día. Con tus pequeños detalles nos has llenado el laboratorio de luz. Aquellos que te acojan no saben la suerte que han tenido contigo.

“One may tolerate a world of demons for the sake of an angel.”

Doctor Who

Y hablando de la Familia Real, ¡no podemos dejarnos a la Reina! **Rodrigo**, RDR para los amigos. Me gustaría dar las gracias por perderte de vista, pero tú y yo sabemos que en fondo te quiero cantidad. Planificar grandes producciones cinematográficas contigo ha sido la mejor manera de esperar a que corra un gel. Espero que sigas llamándome para salir a mover el esqueleto cuando te acuerdes de mí.

"You're a little scary sometimes, you know that? Brilliant ... but scary."

Ron Weasley, Harry Potter and the Sorcerer's Stone

¡A las veteranas del grupo! Últimamente apenas nos vemos, pero no puedo pasar por estos años en el laboratorio sin recordaros con toda la ternura del mundo. **Sara**, la teva paciència no té límits. M'has aguantat amb un somriure als llavis fins i tot quan ja no estaves al laboratori. **Tula**, te agradezco muchísimo el interés que has mostrado por mí y todos los consejos que me has dado. **Judit**, és meravellós haver conegut a algú tan fort i tan segur de sí mateix. **Serena**, el laboratorio está vacío sin tus historias. **Eduarne**, espero que esta nueva etapa te haga feliz, aunque nosotros no podamos verte tanto como nos gustaría.

“The universe has to move forward. Pain and loss, they define us as much as happiness or love. Whether it’s a world, or a relationship... Everything has its time. And everything ends.”

Doctor Who

¡A las secres! ¡Esos salvavidas! **Nuria, Carme, Mercè**. Os agradezco mucho cómo cuidáis de nosotros. El mimo que le ponéis y cómo os desvivís porque no nos falte nada. Sois los pilares que sustentan el laboratorio.

“Hope.”

Leia Organa, Star Wars

Y a todos los que ya no estáis: **Fabián, Joel, Lavinia, Lucía, Marc**. Todos nos habéis dejado algo y nunca os olvidaremos.

“I would rather spend one lifetime with you, than face all the ages of this world alone.”

J.R.R. Tolkien, The Lord of the Rings

A los de fuera, que llevo muy dentro. A **Esther** y todos los compañeros del PRBB. A **Débora, Fer**, las **Sonias** y todos los vecinos del Clínic. Una tiene menos miedo sabiendo que os tiene guardándole la espalda.

“This is who I am, right here, right now, all right? All that counts is here and now, and this is me!”

Doctor Who

Pero nada de esto podría haber sido posible sin mi familia. Ni la que comparte vínculos de sangre ni la que ha forjado lazos tan fuertes como estos.

A mi madre, **Esther**, que me ha dado la vida. Literal y figuradamente. Me cuidaste con todo el esmero que puede existir. Me has dado todo lo que he necesitado, lo quisiera o no. Y gracias a eso me has hecho querer ser justa en mis juicios, escuchar a mis sentimientos y hacer que me esfuerce para que todo el que esté en mi vida se sienta a salvo.

“Moonlight drowns out all but the brightest stars.”

J.R.R. Tolkien, The Lord of the Rings

A mi padre, **People**, que me ha convertido en la mujer que soy. Siempre has creído lo mejor de mí y me has hecho demostrarte que tenías razón. Me has dado fuerzas para levantarme, aunque estuviera mala y a hacerlo lo mejor posible. Gracias a ti puedo decir que no me doy por vencida y que cuando voy a por algo, voy con todo.

“No. I am your father.”

Darth Vader, Star Wars

A mis tíos, **Montse** y **Ramón**. A mis primos, **Rubén** y **Elena**. En vosotros he encontrado la roca en la que coger fuerzas antes de la próxima batalla. A mi abuelo **Frutos** y mi abuela **Marta**. Me habría gustado que hubieseis podido ver el final de esta etapa.

“The Force runs strong in your family. Pass on what you have learned.”

Yoda, Star Wars

A tu, **Arnau**. No existeixen paraules per explicar tot el que et dec. Has estat el més important per mi, i necessitaria tres vides per tornar-te una petita part del que m’has donat.

“It does not do well to dwell on dreams and forget to live.”

Albus Dumbledore, Harry Potter and the Sorcerer's Stone

A los **amigos**. Sois la balsa que me ha alejado de los problemas. La brisa que me ha dado un respiro. La corriente que me ha impulsado siempre hacia adelante. Y la luz que me ha llenado de energía cuando ya no me quedaban fuerzas.

Los de toda la vida: Pau, Adri, Alba y Víctor.

Los que me trajo la carrera: Sergi, Carles, Diego, Espre, Castells, Albert... ¡sois demasiados para nombraros a todos!

Los de la Familia del Hapkido, y en especial al Maestro y Nieves.

Los que vinieron de una galaxia muy muy lejana: Anam, Cristian, Mikel, Andrea, Jon, Laura, Karen...

Los que convierten cada baile en un respiro: Leo y Roger.

“Even the smallest person can change the course of the future.”

J.R.R. Tolkien, The Lord of the Rings

No sé qué me deparará el futuro, pero lo que sí sé es que quiero vivirlo rodeada de gente tan maravillosa como vosotros. Sois muchos y no cabéis todos en estas breves páginas. Donde sí cabéis es en mi corazón, donde os llevo a todos.

“I am and always will be the optimist. The hoper of far-flung hopes and the dreamer of improbable dreams.”

Doctor Who

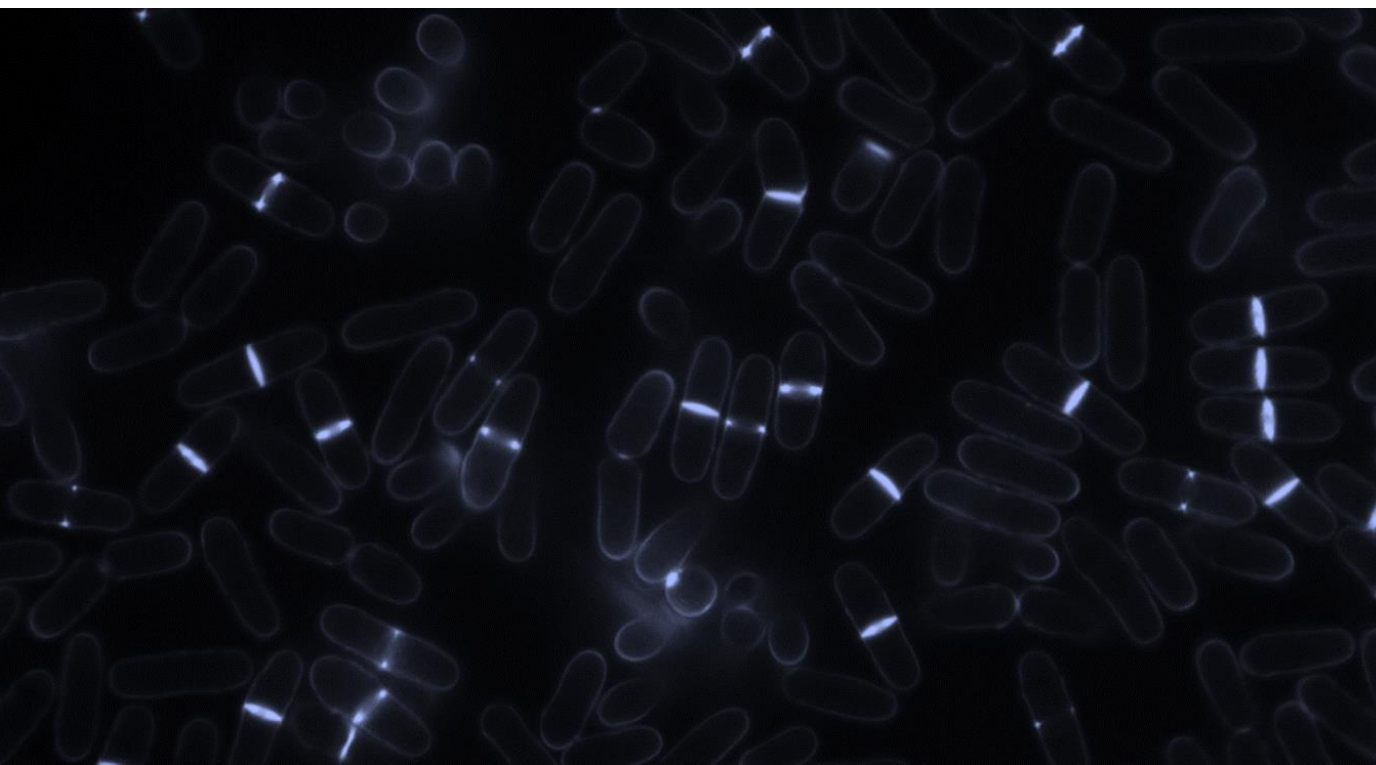
Taula de continguts

Abreviatures.....	3
Introducció.....	9
1. Model d'estudi cel·lular: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	9
2. Cicle cel·lular en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12
2.1. Funció del citoesquelet en el cicle cel·lular.....	14
2.2. Regulació del cicle cel·lular: Cdc2.....	16
2.2.1. Regulació de la mitosi.....	20
2.2.1.1. Wee1 i Mik1.....	20
2.2.1.2. Cdc25.....	22
2.2.1.3. Sortida de mitosi: Clp1/Flp1.....	22
2.2.2. Regulació de la citocinesi.....	24
2.2.2.1. Zona medial en interfase.....	24
2.2.2.2. Assemblatge del CAR.....	26
2.2.2.3. Maduració del CAR.....	27
2.2.2.4. Contracció del CAR i formació del septe.....	29
3. CaM-quinases en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	33
3.1. Ssp1.....	34
3.2. Ckk2.....	35
3.3. Cmk1.....	35
3.4. Cmk2.....	36
3.5. Srk1.....	36
4. MAPKs en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	37
4.1. Stress-activated protein kinase (SAPK) i Sty1.....	38
4.1.1. Gens CESR i factors de transcripció.....	41
4.1.2. MAPK-activated proteins (MAPKAP).....	43
4.1.2.1. Plo1.....	43
4.1.2.2. Cmk2.....	44
4.1.2.3. Srk1.....	44
4.2. Ruta d'integritat cel·lular i Pmk1.....	46
4.3. Ruta de senyalització per feromones i Spk1.....	48

4.4.Regulació negativa de les MAPK	49
4.4.1.Tirosina-fosfatases: Pyp1 i Pyp2	50
4.4.2.Fosfatases d'especificitat dual (PP2C): Ptc1 i Ptc3	50
4.4.3.Fosfatases d'especificitat dual: Pmp1	51
4.4.4.Altres reguladors: Ecm33	51
5.Lsk1 i regulació de la RNA-polimerasa II	52
Antecedents	57
Objectius	61
Materials i mètodes	65
1.Cultius bacterians	65
1.1.Soques utilitzades	65
1.2.Condicions de cultiu	65
1.3.Transformació en bacteri	66
2.Cultius <i>S. pombe</i>	67
2.1.Soques utilitzades	67
2.2.Condicions de cultiu	68
2.3.Transformació en llevat	69
2.3.1.Integració de DNA	69
2.3.2.Sobre-expressió en llevat	70
2.4.Creuament de soques	70
2.5.“Spots assay”	71
3.Tècniques de manipulació de DNA	72
3.1.PCR	72
3.1.1.Fragments per a clonatge	72
3.1.2.Fragments per a integració	72
3.2.Clonatge	74
3.2.1.Plasmidis utilitzats	74
3.2.2.Digestió, lligació i selecció dels clonatges	74
3.3.Electroforesi en gel d'agarosa	74
3.4.Quantificació de DNA	75
3.5.Quantificació de la dotació genòmica de nuclis purificats	75
4.Tècniques de manipulació de proteïna	77

4.1.Obtenció d'extractes proteics	77
4.2.Immunoprecipitació (IP) de proteïnes	77
4.3.Obtenció de proteïnes recombinants	78
4.3.1.Expressió de proteïnes en bacteri	78
4.3.2.Purificació de proteïnes recombinants	78
4.4.Assaig quinasa	79
4.4.1.Proteïnes analitzades	80
4.5.SDS-PAGE	81
4.6.Western Blot.....	82
4.6.1.Transferència	82
4.6.2.Immunodetecció	82
4.7.Tinció per Coomassie Blue	84
4.8.Mètode " <i>Tandem Affinity Purification</i> " (TAP)	84
Resultats.....	89
1.Activació de Srk1 en resposta a latrunculina.....	89
2.Mecanisme d'acció de la Srk1 en resposta a LatB	92
2.1.Proteïnes d'unió a Srk1: Lsk1.....	92
2.2.Unió <i>in vivo</i> de Srk1 i Lsk1.....	93
2.3.Proliferació de soques amb mutacions en <i>srk1</i> i <i>lsk1</i> en resposta a LatB.....	94
2.4.Fosforilació de Lsk1 per Srk1	95
2.5.Activació de Lsk1 en resposta a Srk1.....	97
3.Regulació negativa de la via SAPK	99
Discussió.....	105
1.Activació de la via SAPK en resposta a latrunculina	105
2. Mecanisme d'acció de la Srk1 en resposta a LatB	107
3.Regulació negativa de la via SAPK	110
Conclusions	113
Bibliografia	117

ABREVIATURES



Abreviatures

AA	Aminoàcids
ATF	<i>Activating transcription factors</i>
ATP	Adenosina trifosfat
APC	<i>Anaphase promoting complex</i>
B1	Tiamina
C-terminal	Carboxi-terminal
Ca ²⁺	Cations de calci
CaCl ₂	Clorur de calci
CaM	Calmodulina
CaMK	Quinases dependents de Ca ²⁺ /calmodulina
CAR	Anell contràctil d'actomiosina
CBD	Domini d'unió a calmodulina
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
CDK	Quinasa dependent de ciclina
CESR	<i>Core environmental stress response</i>
cDNA	DNA complementari
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CTD	Domini carboxi-terminal
DNA	Àcid desoxiribonucleic

ABREVIATURES

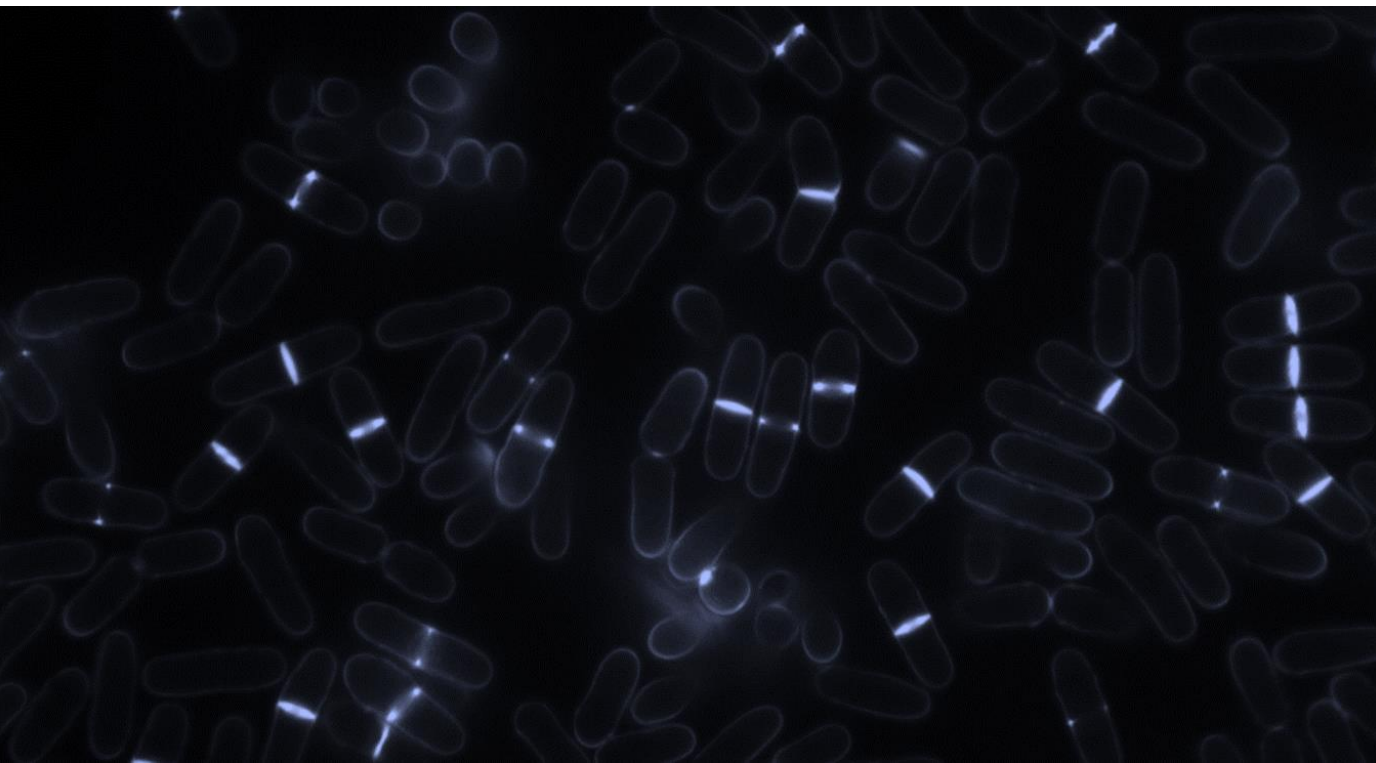
DMSO	Dimetil sulfòxid
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
DYRK	<i>Dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDP	Guanosina difosfat
GPCR	Receptors acoblats a proteïna G
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
GTP	Guanosina trifosfat
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
HCl	Àcid clorhídric
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranòsid
IQGAP	<i>Ras GTPase-activating-like protein</i>
KCl	Clorur de potassi
LatA	Latrunculina A
LatB	Latrunculina B
Lsk1	<i>Latrunculin sensitive kinase 1</i>

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAP	Proteïna activada per MAPK
MBF	<i>Mlu1-box binding factor</i>
Mg ²⁺	Cations de magnesi
MgCl ₂	Clorur de magnesi
MOR	<i>Morphogenesis Orb6</i>
MPF	<i>Mitosis Promoting Factor</i>
mRNA	RNA missatger
N-terminal	Amino-terminal
N9A	Amino-terminal amb 9 mutacions que substitueixen llocs de fosforilació per alanines
NaCl	Clorur de sodi
NETO	<i>New End Take Off</i>
OD	Densitat òptica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PIC	<i>Protease Inhibidor Cocktail</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PP2A	Proteïna fosfatasa 2
PP2C	Proteïna fosfatasa 2C
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives de l'oxigen

ABREVIATURES

rRNA	RNA ribosòmic
SAC	<i>Spindle attachment checkpoint</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SPB	<i>Spindle Pole Body</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIN	<i>Septation Initiation Network</i>
SP	Septe primari
SS	Septe secundari
TCA	Àcid tricloroacètic
UTR	Regió no traduïda
UV	Ultraviolada
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild type</i>

INTRODUCCIÓ



Introducció

1. Model d'estudi cel·lular: *Schizosaccharomyces pombe*

El llevat *Schizosaccharomyces pombe* va ser descrit per primer cop el 1893 per Paul Lindner (Bridge and May 1984), químic, biòleg i microbiòleg polonès que va aconseguir aïllar-la de mostres de cervesa Bantu. És per aquest motiu que la va batejar amb el nom *pombe*, el qual significa "cervesa" en suahili. Malgrat això, no va ser emprat com a model experimental fins al 1950 per Urs Leupold (Anon n.d.), i el seu valor com a eina per a l'estudi del cicle cel·lular no va ser reconegut fins al 1957 per Murdoch Mitchison (Mitchison 1957).

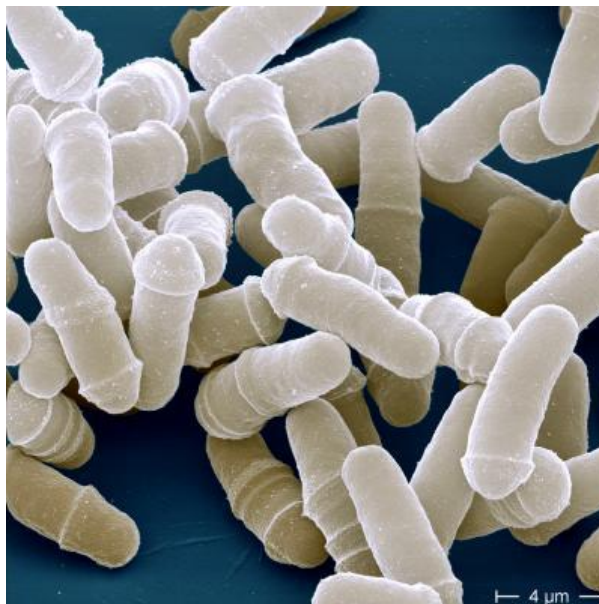


Figura 1. Imatge de microscòpia electrònica de rastreig de cèl·lules de llevat de fissió (*Schizosaccharomyces pombe*) en divisió. Crèdit per Jürgen Berger/Max Planck Institute for Developmental Biology.

Filogenèticament, la presència de paret cel·lular, la mitosi completa i l'esporengi en forma d'asca, juntament amb altres característiques, situen a *S. pombe* dins del filus ascomicets. Anàlisis inicials de la seqüència del rRNA, però, van establir

INTRODUCCIÓ

que *Schizosaccharomyces pombe* divergia en sobremanera de la resta d'espècies del regne dels fongs, indicant que la seva branca es va originar molt properament a la divergència entre el regne animal i el regne dels fongs. Aquest fet s'associa amb una gran homologia de gran nombre de proteïnes de *S. pombe* amb proteïnes de mamífer (Sipiczki 2000), així com passa amb la posició del pla de divisió al centre geomètric de la cèl·lula (Pérez et al. 2016).

Fenotípicament, *S. pombe* és un organisme unicel·lular eucariota; allargat i cilíndric, d'uns 3-5 μm de diàmetre i 8-14 μm de longitud (Fig. 1). Es divideix aproximadament cada 3 hores per bipartició o fissió binària (el que li dóna el nom de llevat de fissió).

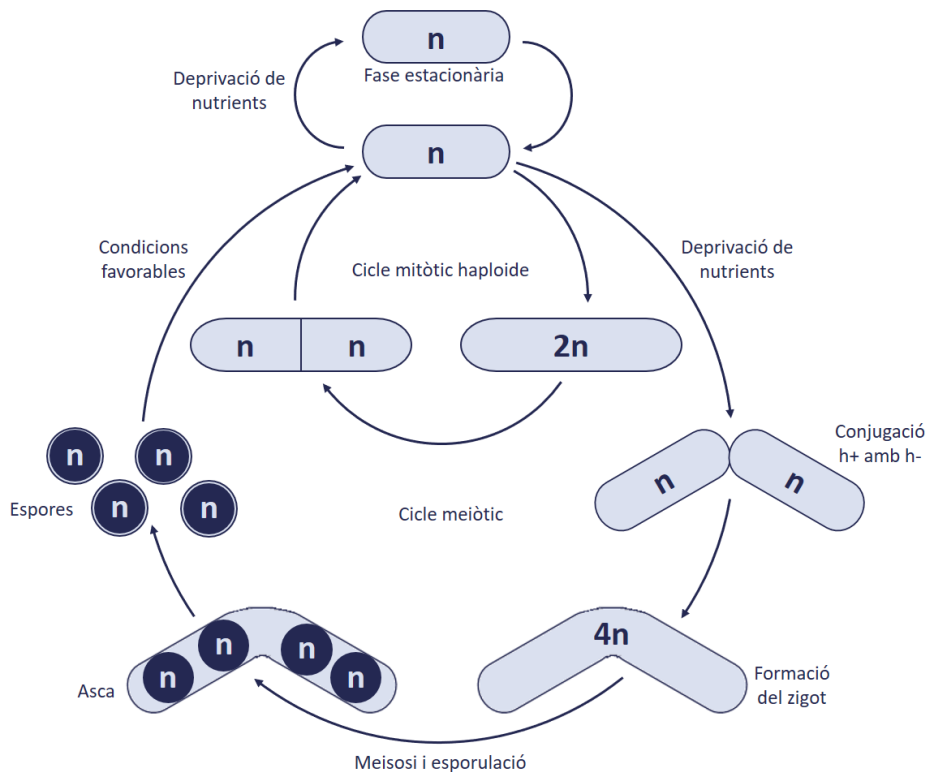


Figura 2. Representació del cicle cel·lular haplodiplont de *S. pombe*. N representa una dotació cromosòmica haploide.

Genèticament, *S. pombe* té 3 cromosomes amb 14.1 milions de parells de bases i 4,970 ORFs predits, un 43% dels quals contenen introns (Wilhelm et al. 2008). En condicions de creixement vegetatiu, aquest es manté amb una dotació haploide que presenta un dels dos sexes: h+ o h- (Fig. 2, Cicle mitòtic haploide). En una situació de depleció nutricional, cèl·lules de sexe oposat es conjuguen i adquireixen de forma transitòria una dotació diploide, només per poder iniciar la meiosi i generar estructures de resistència conegudes com a ascòspores, de nou haploides (Crandall, Egel, and Mackay 1977; Egel and Egel-Mitani 1974) (Fig. 2, Cicle meiòtic). Les espores germinen quan es troben en condicions favorables. És possible mantenir soques d'aquest llevat amb dotació diploide, però és una forma molt inestable.

Com a model cel·lular, *S. pombe* presenta 4 grans avantatges:

- 1) Els mecanismes que controlen el cicle cel·lular estan molt conservats en la línia evolutiva, el que permet extrapolar les observacions en aquest organisme a un gran nombre d'organismes eucariòtics.
- 2) La taxa de recombinació genètica és molt alta, el que permet integrar DNA exogen en el genoma de l'organisme amb relativa facilitat, generant així delecions, mutacions, adició de marcadors i canvis de promotors.
- 3) Degut a que l'organisme només té una dotació cromosòmica, l'efecte que pot tenir una modificació en el genoma és fàcilment observable fenotípicament sense la interferència d'un cromosoma germà.
- 4) La simplicitat en el fenotip del llevat i la velocitat de la divisió cel·lular facilita identificar l'efecte de les modificacions en el cicle cel·lular. Així, mutacions que alenteixin la progressió cel·lular permetran un major creixement i donaran lloc a cèl·lules allargades, mentre que mutacions que accelerin el cicle donaran lloc a cèl·lules més arrodonides (Thuriaux, Nurse, and Carter 1978).

INTRODUCCIÓ

2.Cicle cel·lular en *Schizosaccharomyces pombe*

El cicle cel·lular és el conjunt de processos ordenats que condueixen al creixement cel·lular i a la creació de dues cèl·lules filles amb una dotació genètica idèntica. El cicle cel·lular es divideix en dos grans fases: la interfase i la mitosi.

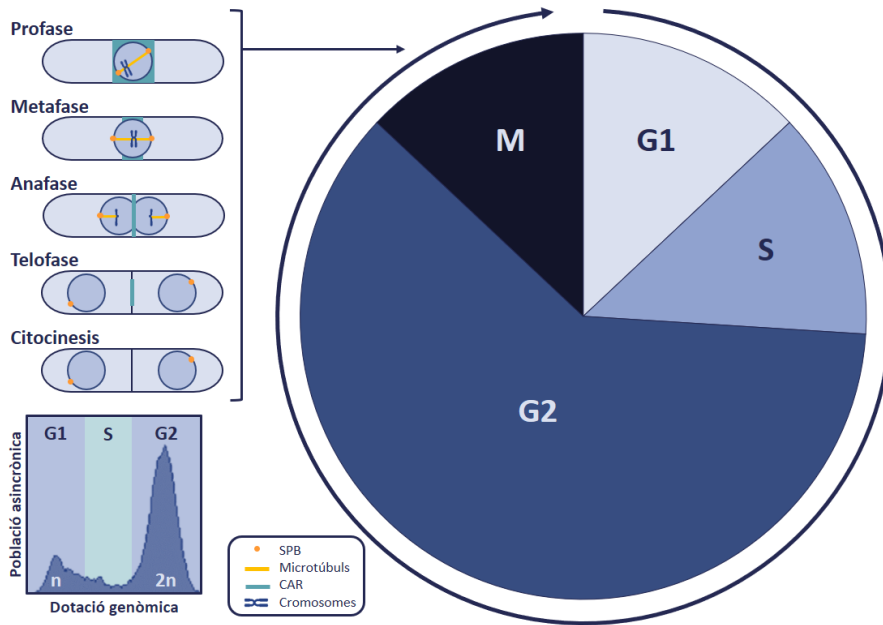


Figura 3. Representació de les fases del cicle cel·lular de *S. pombe*.

La interfase està, alhora, dividida en tres fases: G1, S i G2 (Fig. 3). En el moment en que una nova cèl·lula apareix, aquesta inicia la fase G1. Es tracta d'una fase de creixement en la que es sintetitzen proteïnes i RNA, sobretot d'elements necessaris per la replicació de DNA. També és el moment en que es determina si ha d'iniciar una nova divisió o tindrà un altre destí (com la conjugació o la quiescència - fase estacionària/G0). La fase G1 és seguida de la fase S, durant la qual es sintetitza una còpia de la dotació cromosòmica de la cèl·lula (pas de una dotació n a una dotació $2n$). Finalment, la cèl·lula arriba a fase G2, l'interval que separa el final de la síntesi del DNA amb l'inici de la divisió cel·lular. En ell s'acaben de sintetitzar proteïnes i RNA necessaris i s'assoleix la mida de divisió adequada. En el cas de *S. pombe*, les fases G1 i S es donen en paral·lel a la mitosi, de manera

que la segona es dona de forma gairebé simultània amb la citocinesi; i la fase G2 és, per tant, la més llarga de tot el cicle (Mitchison and Creanor 1971).

Un cop la cèl·lula assoleix la mida adequada al final de la fase G2, s'inicia la mitosi. Aquest és el procés pel qual la cèl·lula original (coneguda com a cèl·lula mare) es divideix en dues cèl·lules filles i reparteix cada una de les còpies del genoma entre les dues. Aquest procés consta de 5 fases (Fig. 3):

- 1) Profase: el material genètic es condensa i s'inicia l'assemblatge del fus mitòtic. A diferència d'organismes superiors, en *S. pombe* la membrana nuclear no es trenca, i els *Spindle Pole Bodies* (SPB) s'incrusten en ella (Ding et al. 1997). Els cromosomes s'ancoren als microtúbuls per permetre la reorganització espacial.
- 2) Metafase: els cromosomes ben ancorats als microtúbuls s'alineen al centre de la cèl·lula mitjançant forces de tensió. En aquest moment trobem el *spindle attachment checkpoint* (SAC), pel qual la cèl·lula no continua si els cromosomes no s'han ancorat correctament.
- 3) Anafase: la cohesina (Rad21), que manté unides les cromàtides germanes gràcies a la securina (Cut2), és degradada per la separassa (Cut1). Les cromàtides es separen als dos extrems del nucli. Aquest es divideix en dos i cada un es desplaça a cada extrem de la cèl·lula. També s'inicia l'organització de l'anell contràctil d'actomiosina (CAR).
- 4) Telofase: el fus mitòtic es desorganitza i el CAR es comença a contraure per separar les dues cèl·lules filles.
- 5) Citocinesi: el CAR acaba de separar les dues cèl·lules filles i es forma el septe.

Existeix un altre tipus de divisió cel·lular que pot donar lloc a cèl·lules filles diferents a la cèl·lula mare: la meiosi. Aquesta és la característica principal de la reproducció sexual i la font majoritària de variabilitat genètica intra-espècie.

INTRODUCCIÓ

Aquesta és similar a la mitosi, però en aquest cas es donen dues divisions cel·lulars consecutives sense passar per una interfase (Yamashita et al. 2017). El motiu d'interès en aquest tipus de divisió cel·lular es troba en que és la responsable de la formació d'espores en *S. pombe*, i que en les seves etapes inicials es dona una recombinació meiótica que permet intercanviar DNA entre els dos cromosomes homòlegs, creant així noves variants genòmiques.

2.1.Funció del citoesquelet en el cicle cel·lular

El citoesquelet és la xarxa de filaments proteics que recorren la cèl·lula i és el principal responsable de la seva morfologia. El citoesquelet té tres components: els microtúbuls, els filaments d'actina i els filaments intermedis; i cada un d'ells té proteïnes associades que els permeten realitzar altres funcions com la distribució dels components intracel·lulars, la migració cel·lular i la mitosi.

S. pombe en creixement presenta un agregat de F-actina a cada extrem de la cèl·lula (Fig. 4, Creixement bipolar). Se'ls considera responsables del creixement cel·lular, i és per això que *S. pombe* presentaria un creixement bipolar i una morfologia allargada. La polimerització d'actina es dona a través per Arp2/3 (La Carbona, Le Goff, and Le Goff 2006). Dels agregats ens sorgeixen uns cables nucleats per la formina For3 (Feierbach and Chang 2001), els quals contribueixen a la polaritat i morfogènesis cel·lular.

Els microtúbuls de *S. pombe* estableixen l'eix de creixement de la cèl·lula. Formen feixos antiparal·lels des del nucli cap als pols, i situen el nucli al centre de la cèl·lula. Presenten un creixement dinàmic: es polimeritzen fins arribar als extrems cel·lulars, on a través d'una catàstrofe microtubular, col·lapsen i es despolimeritzen fins a un punt anterior prèviament estabilitzat, a partir del qual tornen a iniciar la polimerització. No són essencials per al creixement cel·lular, però col·laboren en l'organització del citoesquelet d'actina i en definir els llocs de creixement (Chang 2001).

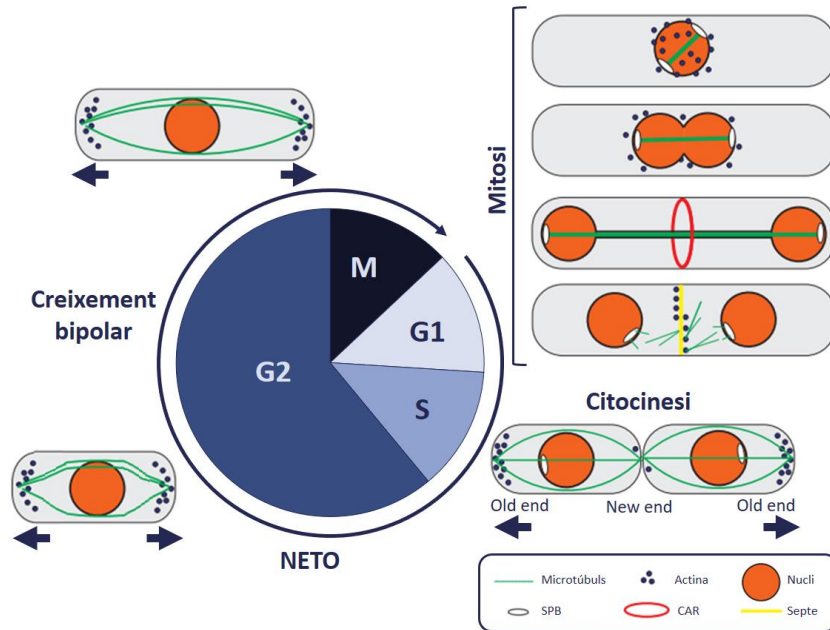


Figura 4. Representació del paper del citoesquelet en el cicle cel·lular. Les fletxes representen les direccions de creixement. Modificació de Selhuber-Unkel, C. et al 2009.

La posició nuclear determina la localització en que es formarà l'anell contràctil d'actomiosina (CAR) gràcies a una banda en el còrtex que envolta la zona nuclear, formada per proteïna Mid1 (Chang, Woollard, and Nurse 1996). En fases inicials de la mitosi, les cèl·lules aturen el creixement i reorganitzen el citoesquelet d'actina i microtúbuls en aquesta regió. Després de la divisió nuclear, el CAR inicia la contracció de la membrana i divideix així la cèl·lula mare en les dues cèl·lules filles mitjançant la citocinesi (Fig. 4, Mitosi i Citocinesi).

En aquest moment, les cèl·lules només presenten un agregat d'actina en l'extrem que existia abans de la divisió (*old end*), el que provoca que durant la G1 trobem un creixement monopolar de la cèl·lula. Després de que les cèl·lules hagin completat la fase S i hagin assolit una mida mínima, es dona el *New End Take Off* (NETO), en que part de l'actina migra a l'altre pol cel·lular i inicia el creixement bipolar (Mitchison and Nurse 1985; Selhuber-Unkel et al. 2009; Svecizer and Horváth 2017).

INTRODUCCIÓ

2.2.Regulació del cicle cel·lular: Cdc2

És vital que les cèl·lules tinguin mecanismes per assegurar que durant el procés de creixement i divisió cel·lular el DNA es repliqui un únic cop i es reparteixi, juntament amb la resta d'elements cel·lulars, entre les dues cèl·lules filles. És per això que el cicle cel·lular es troba estretament regulat per un conjunt de punts de control o *checkpoints* que eviten la divisió en situacions anòmales i el pas d'una fase a una altra fins que la primera no ha estat completada.

Aquesta regulació es dona a través de dues classes imprescindibles de molècules reguladores: les ciclines i les quinases dependents de ciclines (CDK) (Anon n.d.; Nigg 1995; Nurse 1990). Les ciclines són les subunitats reguladores de les CDKs. S'hi uneixen per formar heterodímers, un complex actiu que promou l'entrada a cada una de les fases del cicle. Habitualment, les CDKs es troben expressades de forma constitutiva a les cèl·lules, mentre que les ciclines presenten patrons d'expressió cíclics al llarg de la vida cel·lular que regulen així la transició entre les diferents fases mitjançant diferents combinacions ciclina-CDK.

La majoria d'aquests gens es troben conservats en tots els eucariotes, tot i que organismes més complexos impliquen un control més elaborat de les vies implicades. La deleció d'aquests gens és letal. Per estudiar-los, cal treballar amb mutacions que permeten el creixement més o menys normal en condicions permissives (normalment de temperatura), però que en condicions restrictives alteren la progressió del cicle (obtenint cèl·lules que es divideixen a mides superiors o inferiors a la normal). Això va permetre recopilar un llistat de gens implicats en la regulació del cicle (Nurse, Thuriaux, and Nasmyth 1976), tot i que aquest anàlisi pot no incloure aquells gens que hi intervenen més d'un cop. Gràcies a la mutació sistemàtica de gens que presentaven aquest fenotip es van identificar els anomenats gens *cell division cycle (cdc)* (Wissinger and Wang 1983).

En *S. pombe*, Cdc2 és una serina-treonina quinasa de 297 aas, 34.36 kDa, altament conservada al llarg de la línia evolutiva (Norbury and Nurse 1992). Correspon a la única CDK en aquest llevat, i també rep el nom de Cdk1 (Nurse and Bissett 1981; Nurse and Thuriaux 1980). Els seus nivells proteics són constants al llarg del cicle cel·lular, pel que la seva activitat fluctua degut a diferents reguladors. La fosforilació de substrats d'alta afinitat quan la seva activitat és baixa i la fosforilació de substrats de baixa afinitat quan l'activitat augmenta és el que provoca la transició entre les diferents fases del cicle (García-Blanco and Moreno 2019; Swaffer et al. 2016), marcant els dos esdeveniments principals del cicle cel·lular: el *Start* (G1/S) i l'entrada en mitosi (G2/M).

El cicle cel·lular està controlat en fase G1 per un conjunt de senyals externes a la cèl·lula que poden ser positives (factors de creixement, disponibilitat de nutrients...) o negatives (inhibició per contacte, toxines...). En el segon cas, la cèl·lula atura el cicle cel·lular i passa a fase de quiescència (G0). En cas de rebre senyals positives, la cèl·lula efectua el *Start*, el punt de no retorn a partir del qual les cèl·lules han de completar el cicle independentment dels factors externs.

Al principi de la fase G1 trobem el mínim d'activitat de Cdc2, mentre es troba unida a la ciclina Puc1 (Forsburg and Nurse 1991) (Fig. 5A). El complex Cdc2-Puc1 activa el MBF (*Mlu1-box binding factor*), format per Cdc10 i encarregat de l'expressió dels gens propis de la transició G1/S (Gaspa et al. 2016; Hendler et al. 2017), entre ells la ciclina Cig2 (Fig. 5B). Aquesta ciclina es va unint a Cdc2 a mesura que augmenta la seva concentració, però el complex es troba inactiu degut a la presència de Rum1.

Davant les senyals externes positives esmentades anteriorment, Cdc2-Puc1 fosforila Rum1 i promou la degradació de Rum1 i Ste9 (Martín-Castellanos et al. 2000) (Fig. 5B). A causa d'això, la inhibició de Rum1 disminueix i el complex Cdc2-Cig2 assoleix un nivell d'activitat que actua com a *Start* (Fig. 5A). Aquesta senyal

INTRODUCCIÓ

inicia la fase S (Martin-Castellanos, Labib, and Moreno 1996; Mondesert, McGowan, and Russell 1996) i provoca la inhibició del MBF (Chen et al. 2013).

La ciclina Cig1 actua en la fase G1, i degut a que aquesta fase és molt curta, no s'ha pogut determinar amb exactitud quin paper té en la transició entre fases. Alguns estudis la relacionen amb la degradació de Rum1, amb un paper similar al de Puc1 (Benito, Martín-Castellanos, and Moreno 1998).

Durant la fase S es troben uns nivells d'activitat de Cdc2 superiors a la fase G1, però aquests continuen sent baixos (Fig. 5A). En condicions de creixement favorables, la via TOR manté la fosfatasa PP2A activa. Així, aquesta via activa Wee1 (Chica et al. 2016; Moris et al. 2016) a l'inici de G2, la qual fosforila Cdc2 en Tyr15 i manté la seva activitat baixa (Fig. 5B).

Durant la fase G2, Cdc13 es sintetitza progressivament i arriba a un màxim en la seva síntesis en el moment d'entrar en mitosi (G2/M). La unió activadora de Cdc13 a Cdc2, juntament amb la desfosforilació de la segona a través de la via Pom1/Wee1/Cdc25 (que explicarem més àmpliament a continuació), permeten l'activació de Cdc2-Cdc13 i l'entrada en mitosi (Norbury and Nurse 1992) (Fig. 5A).

Durant la mitosi trobem l'activació de l'*anaphase promoting complex* (APC), el qual poli-ubiquinitza i marca una sèrie de proteïnes que han de ser degradades pel proteosoma. Dins d'aquest complex trobem Ste9 (Lim and Surana 2003; Vanoosthuyse and Hardwick 2005).

En arribar a l'anafase, es produeix una disminució dràstica de l'activitat Cdc2-Cdc13 (Fig. 5A). Això es deu a que durant aquesta fase s'indueix l'expressió de Rum1, la qual és capaç d'unir-se al complex Cdc2-Cdc13 i inhibir-lo (Correa-Bordes and Nurse 1995) (Fig. 5B). Alhora, aquesta unió provoca que Ste9 i l'APC degradin Cdc13 (Blanco et al. 2000; Correa-Bordes, Gulli, and Nurse 1997). La

disminució d'aquesta activitat permet la sortida de la mitosi i la progressió de la fase G1.

En *S. pombe*, el complex CDK-ciclina està format, a més, per un tercer component: la proteïna Suc1. Aquesta serveix com a cohesió del complex i se li han volgut associar moltes funcions, però cap d'elles ha estat verificades (Basi and Draetta 1995; Lundgren et al. 1991).

Tot i que les diferents fases del cicle s'associen a diferents combinacions Cdc2-ciclina, la delecció de Cdc13 és la única letal. Igualment, la presència d'aquesta única ciclina és capaç de suplir la funció de *puc1*, *cig1* i *cig2*, presentant només una petita elongació de la fase G1/S.

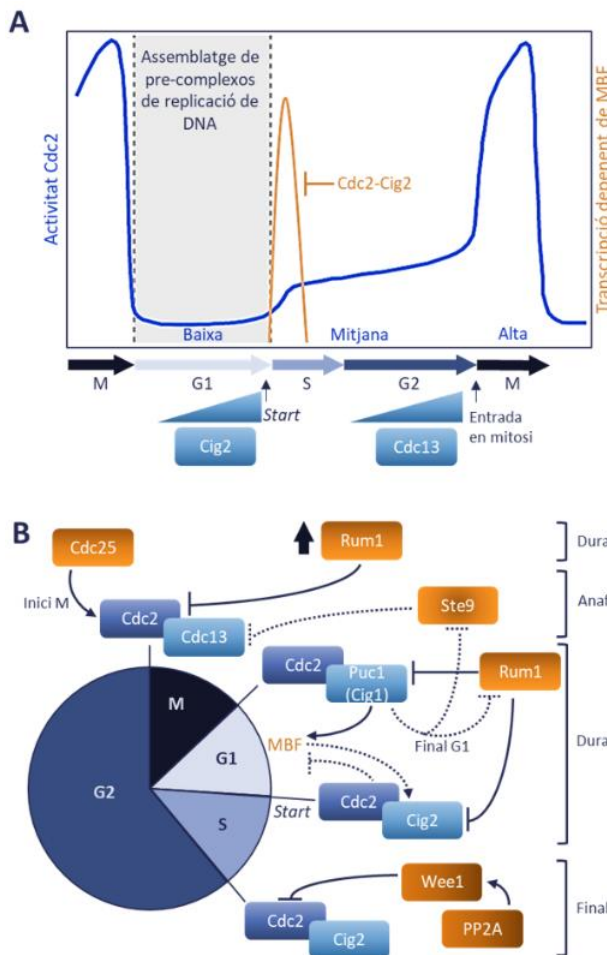


Figura 5. Regulació del cicle en funció de la Cdk1/Cdc2.

(A) Activitat Cdc2 i transcripció feta per MBF al llarg del cicle. Producció de les ciclines inactives Cig2 i Cdc13 en fase G1 i G2 respectivament. Activació del complex Cdc2-Cig2 en el moment Start i Cdc2-Cdc13 per la via Pom1/Wee1/Cdc25.

(B) Combinacions de la Cdk1/Cdc2 amb les ciclines corresponents a l'inici de cada una de les fases (Puc1, Cig1, Cig2 i Cdc13).

Regulació per interacció (línia contínua) o degradació (línia discontinua) per elements externs (taronja), al llarg de cada fase.

Modificació de Garcia-Blanco i Moreno 2019.

INTRODUCCIÓ

Donat el fet que Cdc13 és suficient per regular el cicle cel·lular, l'existència de les altres ciclines de funció redundants i amb un paper centrat en la regulació de la fase G1 es pot deure a dos factors. Primerament, una cèl·lula de *S. pombe* en G1 és haploide en condicions òptimes i no pot dur a terme la recombinació homòloga per reparar el seu DNA, el que la fa vulnerable. També és important tenir en compte que la supervivència i evolució d'una espècie depèn en gran manera de la seva capacitat de reproducció sexual, la qual es determina durant aquesta mateixa fase. Així, un sistema complex de regulació de la fase G1 mitjançant diferents ciclines i quinases permet regular estretament aquesta fase del cicle tan delicada (Martín-Castellanos et al. 2000).

El cicle cel·lular es veu modulats en resposta a diferents estímuls. Les condicions de creixement (privació nutricional) o l'aparició de danys a diferents nivells (mutacions o exposicions a drogues) estimulen vies que poden frenar o accelerar el cicle modificant l'activitat de les proteïnes esmentades anteriorment.

2.2.1.Regulació de la mitosi

L'entrada a mitosi es dona quan Cdc2 s'uneix a la Cdc13 que ha estat sintetitzada durant la G2 i la seva activitat arriba a un màxim. Cdc2 i Cdc13 formen el *mitosis-promoting factor* (MPF), el qual activa les proteïnes encarregades de dur a terme la mitosi.

Per assolir aquest màxim, s'han d'aturar les vies que mantenen Cdc2 fosforilada en Tyr15 (les quinases Wee1/Mik1) i s'han d'activar les vies que promouen la desfosforilació de la quinasa (la fosfatasa Cdc25) (Russell and Nurse 1987) (Fig. 6).

2.2.1.1.Wee1 i Mik1

Pom1, o *dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase* (DYRK), és una proteïna de 1087 aas, 121.15 kDa, i es troba dins la cèl·lula creant un gradient de concentració des de les puntes fins a la zona medial (Bähler and Pringle 1998;

Celton-Morizur et al. 2006) (Fig. 6, verd). Quan la cèl·lula és petita, Pom1 inhibeix Cdr1 (Fig. 6, taronja). Quan la cèl·lula creix, el gradient es manté centrat als pols de la cèl·lula, de manera que la concentració i activitat de Pom1 a la zona medial disminueix i es pot activar la Cdr1 (Fig. 6, superior).

Wee1 és una proteïna de 877 aas, 96.26 kDa, i és el principal regulador que controla la mida de *S. pombe* en el moment de la divisió (Nurse 1975; Nurse and Thuriaux 1977; Son et al. 2011). En condicions favorables de creixement, la fosfatasa PP2A desfosforila i manté activa a Wee1 (Chica et al. 2016; Featherstone and Russell 1991; Gould and Nurse 1989; McGowan and Russell 1993; Parker and Piwnica-Worms 1992), el que inhibeix Cdc2 i l'entrada a mitosi (Fig. 6, quadre).

La inhibició de Wee1 es dona a través de dues quinases: Nim1/Cdr1 i Cdr2 (Breeding et al. 1998; G. Dunphy 1994; Kanoh and Russell 1998; Opalko et al. 2019), que es localitzen en nodes al còrtex cel·lular de la zona medial gràcies a Pom1 (Fig. 6, taronja). Pom1, alhora, manté aquests nodes inhibits. La reducció de l'activitat de Pom1 a la zona medial que hem descrit permet l'activitat de Cdr2, la qual és capaç de fosforilar Wee1 i retenir aquesta proteïna en els nodes. Això provoca que Cdr1 fosforili i inhibeixi Wee1 (Coleman, Tang, and Dunphy 1993; Martin and Berthelot-Grosjean 2009; Parker et al. 1993; Wu and Russell 1993) (Fig. 6, quadre), el que permetria l'activació de Cdc2.

La distribució de Pom1 també evita que la divisió es doni als pols de la cèl·lula (Bähler and Pringle 1998; Huang et al. 2007; Padte et al. 2006).

Tot i que Wee1 és la principal inhibidora de Cdc2, Mik1 és capaç de realitzar la seva funció en absència de la primera (Lee, Enoch, and Piwnica-Worms 1994; Lundgren et al. 1991). Es sap que la doble deleció provoca una entrada prematura en mitosi, però no es sap exactament quin és el seu paper. Mik1 és una proteïna de 581 aas, 65.93 kDa. S'ha observat un augment d'aquesta en la fase S, el que

INTRODUCCIÓ

podria relacionar-la amb la prevenció d'una mitosi prematura, amb un paper limitat a la resposta al *checkpoint* d'errors en el DNA (Christensen et al. 2000).

2.2.1.2.Cdc25

Cdc25 és una tirosina-fosfatasa de 596 aas, 66.57 kDa. S'acumula al llarg de la G2 i desfosforila i activa Cdc2. És el principal inductor de mitosi en *S. pombe* (Gould and Nurse 1989; Kovelman and Russell 1996; Millar et al. 1991; Murray and Kirschner 1989; Nurse 1990; Russell and Nurse 1986), acoblant-la amb el creixement cel·lular (Daga and Jimenez 1999).

L'activació de Cdc25 es dona en augmentar la seva concentració, de manera que Cdc2 és capaç de fosforilar-la i activar-la en un cicle de retroalimentació positiva (Fig. 6, blau). Altres elements externs (Srk1, Cds1, Chk1) també són capaços de regular-la.

2.2.1.3.Sortida de mitosi: Clp1/Flp1

La sortida de mitosi, com ja hem dit, s'inicia a l'anafase amb l'expressió de Rum1, l'activació del APC (Ste9) i la degradació de Cdc13 (Correa-Bordes et al. 1997; Correa-Bordes and Nurse 1995), el que implica una disminució de l'activitat Cdc2. Degut a que es passa de l'activitat màxima a la mínima de la Cdk1, intervenen altres reguladors que contribueixen a aquesta inhibició.

Clp1/Flp1 és una fosfatasa de 537 aas, 60.25 kDa, no essencial, ortòloga de Cdc14 i implicada en múltiples processos cel·lulars (Wolfe et al. 2006; Wolfe and Gould 2004).

Clp1 contribueix a reduir l'activitat de Cdc2 (Fig. 6, gris), i concretament desfosforila els substrats de Cdc2, entre ells Cdc25. Això disminueix la seva activitat i trenca el cicle de retroalimentació positiva de Cdc2 (Chen et al. 2013; Esteban et al. 2004, 2008). Alhora, desestabilitza la Cdc25 i aquesta es marca per la seva degradació mitjançant l'APC (Nefsky and Beach 1996) (Fig.6, blau). Tot això comporta una reducció dràstica de l'activitat Cdc2-Cdc13, el que permet la

sortida de mitosi i la citocinesi (Daga and Jimenez 1999; García-Blanco and Moreno 2019; Trautmann et al. 2001).

Clp1 presenta activitat autocatalítica. En sortir dels nuclèols, s'auto-desfosforila lentament i augmenta la seva activitat de forma progressiva. Això permet que al principi de la mitosi només actuï sobre substrats d'alta afinitat i assoleixi un màxim d'activitat al final de la mitosi (Wolfe et al. 2006).

La seva activitat també es regula a través de la seva localització. En sortir del nuclèol, Clp1 es localitza als cinetocors (Trautmann, Rajagopalan, and McCollum 2004) durant la metafase i migra al fus mitòtic i el CAR durant l'anafase (Trautmann and McCollum 2005). Allà és regulada per Sid2 de la ruta *Septation Initiation Network* (SIN), on realitzen funcions específiques de la citocinesi (Clifford et al. 2008; Wachtler et al. 2006), com ja es veurà. Finalment, Cdc2 hiperfosforila i inhibeix Clp1, quan i només si la ruta SIN s'inactiva. Això permet que Clp1 torni a ser segregada als nuclèols (Chen et al. 2008; Cueille et al. 2001).

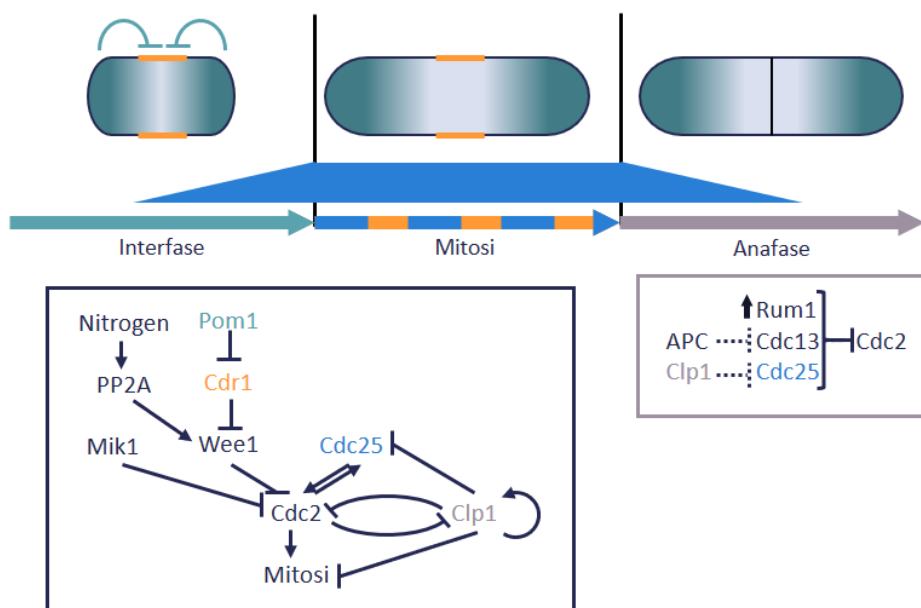


Figura 6. Representació de la regulació de l'entrada i sortida en mitosi en *S. pombe*. Regulació per fosforilació (línia contínua) o degradació (línia discontínua).

INTRODUCCIÓ

Interfase: inhibició de Cdc2 (i mitosi) per les vies Pom1/Cdr1 i PP2A.

Mitosi: inhibició de Wee1 per la via Pom1/Cdr1 i activació de Cdc25 per acumulació i retroalimentació.

Anafase: auto-activació de Clp1 que inhibeix Cdc25, Cdc2 i els seus substrats.

2.2.2.Regulació de la citocinesi

La darrera fase de la mitosi, *S. pombe* divideix la cèl·lula original en dues cèl·lules filles mitjançant la citocinesi. Aquest procés està sotmès a un estricte control espacial i temporal. Per això, la cèl·lula determina durant la interfase la zona on s'establirà l'anell contràctil d'actomiosina (CAR). En ella reclutarà els elements que el formen, el contractarà i hi formarà el septe medial (Pollard and Wu 2010; Wu et al. 2003).

2.2.2.1.Zona medial en interfase

En *S. pombe* la divisió es produeix al centre de la cèl·lula cilíndrica. Aquesta característica és la que li proporciona el nom de "llevat de fissió". Per tal que això es doni, és necessari que al llarg del creixement es determini quina és la zona central o medial de la cèl·lula per tal que s'hi situï correctament el CAR, arribat el moment.

En interfase, a la zona central de la cèl·lula trobem els precursors del CAR, coneguts com a nodes de tipus I (Akamatsu et al. 2014) (Fig. 7A). Aquests nodes estan formats per Cdr1 i Cdr2, dels quals ja hem esmentat com a reguladors de Wee1. Cdr2, alhora, manté ancorada Mid1/Dmf1, una proteïna adaptadora similar a l'anilina (Akamatsu et al. 2014; Almonacid et al. 2009; Gu and Oliferenko 2015) en aquests nodes.

Existeixen també uns nodes de tipus II. Aquests contenen els romanents de l'anell contràctil anterior i es troben difusos pel còrtex cel·lular (Fig. 7A).

Com ja hem esmentat anteriorment, és molt important la localització dels nodes de tipus I. Per a això, existeixen dos tipus de senyals que exerceixen forces sobre aquestes estructures i eviten que es situïn a llocs erronis.

Per començar, existeix una força repel·lidora que allunya els nodes de les zones de creixement, és a dir, els dos pols de la cèl·lula (Fig. 7B, verd). Aquesta força l'exerceix Pom1 (Celton-Morizur et al. 2006; Moseley et al. 2009; Moseley and Nurse 2009; Padte et al. 2006).

Alhora, existeix una força atraient que arrossega els nodes al còrtex que envolta el nucli, tot i que no es sap quina és aquesta força (Moseley and Nurse 2009) (Fig. 7B, taronja). Durant la interfase existeix un transport continu de Mid1 entre el nucli i el còrtex que l'envolta, però s'ha vist que no és essencial per a aquesta localització (Bahler et al. 1998; Bähler and Pringle 1998; Chang 2001; Paoletti and Chang 2000). També s'ha vist que la proximitat del reticle endoplasmàtic a aquesta zona del còrtex cel·lular crea una espècie de compartimentació que podria contribuir a la localització de Mid1 (Zhang, Vjestica, and Oliferenko 2010).

Dins dels processos de senyalització que s'activen durant la mitosi, trobem la ruta *Septation Initiation Network* (SIN), la qual és la responsable de coordinar la citocinesi amb la formació del septe.

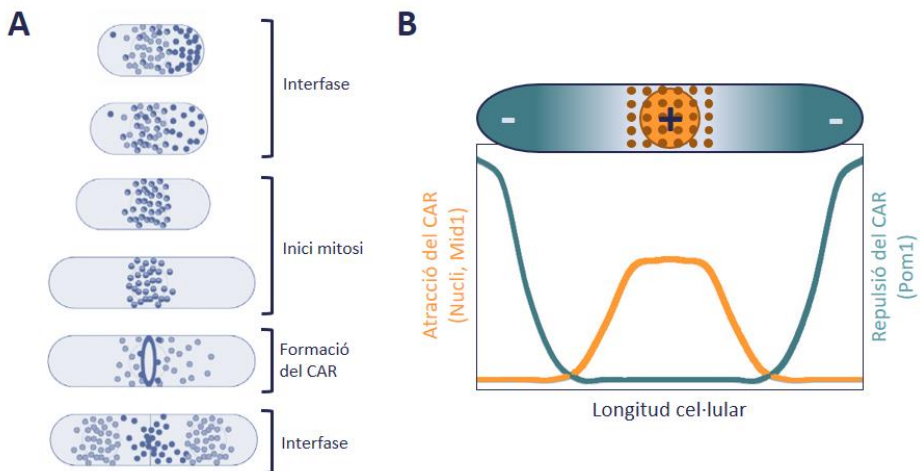


Figura 7. Representació de la localització de la zona medial en interfase.
 (A) Localització dels nodes tipus I (blau clar) i tipus II (blau fosc) al llarg del cicle cel·lular. Modificació de Akamatsu et al. 2014.
 (B) Representació de les forces localitzadores dels nodes. Modificació de Moseley i Nurse 2009.

INTRODUCCIÓ

La quinasa Polo Plo1, forma part d'aquesta via i s'activa a través de Cdc2 en el moment d'entrar en mitosi. Entre altres funcions (que veurem més endavant) provoca la exportació total de Mid1 des dels nuclis fins als nodes de tipus I, a l'equador de la cèl·lula (Almonacid et al. 2011; Sohrmann et al. 1996). Simultàniament, els nodes de tipus II es traslladen per unir-se als nodes de tipus I (Akamatsu et al. 2014) (Fig. 7A).

2.2.2.2. Assemblatge del CAR

En iniciar-se la mitosi, i en estadis inicials de la profase (just abans de la separació dels SPB) es produeix la maduració dels nodes de Mid1. En aquests estadis es recluten proteïnes necessàries per a la formació de l'anell contràctil. Aquestes són: Rng2 (de la família de les IQGAP) (Takaine, Numata, and Nakano 2009), la cadena pesada de la miosina II Myo2 (Motegi et al. 2004; Motegi, Nakano, and Mabuchi 2000) i les cadenes lleugeres Cdc4 i Rlc1 (Naqvi et al. 1999; Shannon 2012) (Fig. 8A).

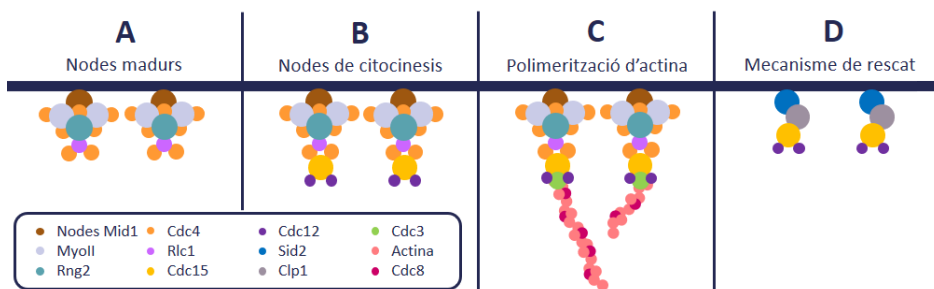


Figura 8. Representació del reclutament de les diferents proteïnes del CAR als nodes.

(A) Estadi 1: Maduració dels nodes.

(B) Estadi 2: Nodus de citocinesi.

(C) Estadi 3: Polimerització de l'actina.

(D) Mecanisme de rescat a través de Clp1.

Un cop obtinguts els nodes madurs, és necessari reclutar els elements encarregats de la nucleació de l'actina. Així, s'hi uneixen la reguladora Cdc15 i la nucleadora d'actina Cdc12 (Bahler et al. 1998; Carnahan and Gould 2003), formant els nodes de citocinesi (Gu and Oliferenko 2015; Wu et al. 2006; Wu and

Pollard 2005) (Fig. 8B). Sid2 fosforila aleshores Cdc12 (Bohnert et al. 2013), la qual s'associa amb la profilina Cdc3 (Chang, Drubin, and Nurse 1997; Kovar et al. 2003; Yonetani et al. 2008).

Finalment, els nodes de citocinesi inicien la polimerització dels filaments d'actina, la qual s'associa a la tropomiosina Cdc8/Fus4 per elongar-se (Paul and Pollard 2008; Skau, Neidt, and Kovar 2009) (Fig. 8C). Aquesta elongació es dona en totes direccions, però es creu que la proximitat del reticle endoplasmàtic podria limitar el creixement dels filaments a un pla proper al còrtex.

Existeix, també, un mecanisme que rescata l'absència de Mid1 en l'assemblatge del CAR. Per començar, l'absència de Mid1 (i per tant, dels nodes) no evita la formació de l'anell contràctil. En condicions normals, però, si que presenten defectes en la localització i orientació del mateix (Hachet and Simanis 2008). Malgrat això, s'ha vist que en situacions en que endarrerim la formació del septe, la posició del CAR es corregeix (Huang, Yan, and Balasubramanian 2008). Això implica que hi ha un mecanisme que, tot i que no és el principal, contribueix a la localització del CAR.

Es creu que aquest mecanisme està associat a la ruta SIN (Arai and Mabuchi 2002), la qual reclutaria Cdc15 a través de la fosfatasa Clp1 (Chen et al. 2008; Clifford et al. 2008; Wachtler et al. 2006) (Fig. 8D). També estaria relacionat amb el fet que el CAR es trobaria ancorat a la paret cel·lular (Pérez et al. 2016) (com veurem més endavant).

2.2.2.3. Maduració del CAR

En aquest moment trobem un gran nombre de nodes de citocinesi polimeritzant filaments d'actina en totes direccions en una banda ampla del còrtex que envolta el nucli (Fig. 8C). És necessari, aleshores, que aquests nodes es condensin per formar un anell estret al centre de la cèl·lula (Arai and Mabuchi 2002; Kamasaki, Osumi, and Mabuchi 2007).

INTRODUCCIÓ

Aquest procés es dona gràcies a que els filaments d'actina que estan sent sintetitzats, són capturats per la Myo2 dels nodes veïns (Fig. 9A). Aquests provoquen moviments similars a les contraccions musculars (Motegi et al. 2000; Vavylonis et al. 2008) juntament amb l' α -actina Ain1 i Rng3 (Chang et al. 1997; Coffman et al. 2009; Lord and Pollard 2004; Mishra and Oliferenko 2008; Wu et al. 2003), i condensen els nodes en una banda fina (Fig. 9B).

Un cop format l'anell contràctil, aquest s'estabilitza en forma i mida i es manté en un equilibri dinàmic durant el que es coneix com la maduració del CAR (Pelham and Chang 2002). Això vol dir que, tot i que en aparença no es produeixen canvis en l'anell, la composició d'aquest sí que varia.

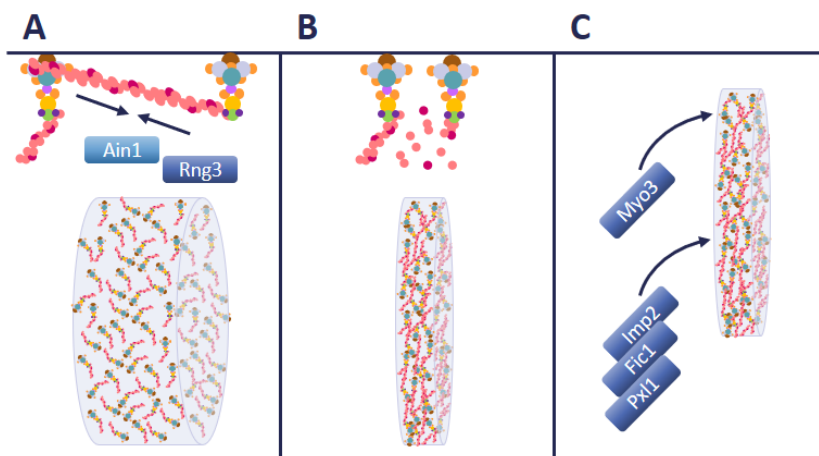


Figura 9. Representació de la maduració del CAR.

(A) Mecanisme pel qual els nodes entren en contacte i es condensen per moviments de contracció.

(B) Anell contràctil condensat i col·lapse dels filaments d'actina.

(C) Equilibri dinàmic del CAR.

Els canvis que es produeixen en l'anell són (Fig. 9C):

- S'incorpora la miosina no-convencional Myo3/Myo2 (Roberts-Galbraith et al. 2009).
- S'incorpora Imp2, Fic1 i la paxilina Pxl1, que estableixen l'anell (Carnahan and Gould 2003; Ge and Balasubramanian 2008; Roberts-Galbraith et al. 2009; Wachtler et al. 2006).

- Mid1 es trasllada dels nodes tipus I als tipus II. Els nodes de tipus II es condensen al CAR i els de tipus I es dispersen pel citoplasma per acció del SIN (Akamatsu et al. 2014; Pu, Akamatsu, and Pollard 2015; Sohrmann et al. 1996).

2.2.2.4. Contracció del CAR i formació del septe

Un cop el CAR té la composició adequada, i davant la disminució de l'activitat Cdc2 (Balasubramanian, McCollum, and Surana 2000), la cèl·lula progressa vers la citocinesi i contrau el CAR per generar les dues cèl·lules filles. *S. pombe*, però, presenta una característica pròpia dels llevats que la diferencia dels eucariotes superiors.

Els llevats presenten una paret cel·lular que és necessària per evitar la lisi cel·lular. És a dir, si a l'extrem de la nova cèl·lula no es sintetitza una estructura que realitzi aquesta funció, la contracció del CAR implicarà la mort de les noves cèl·lules.

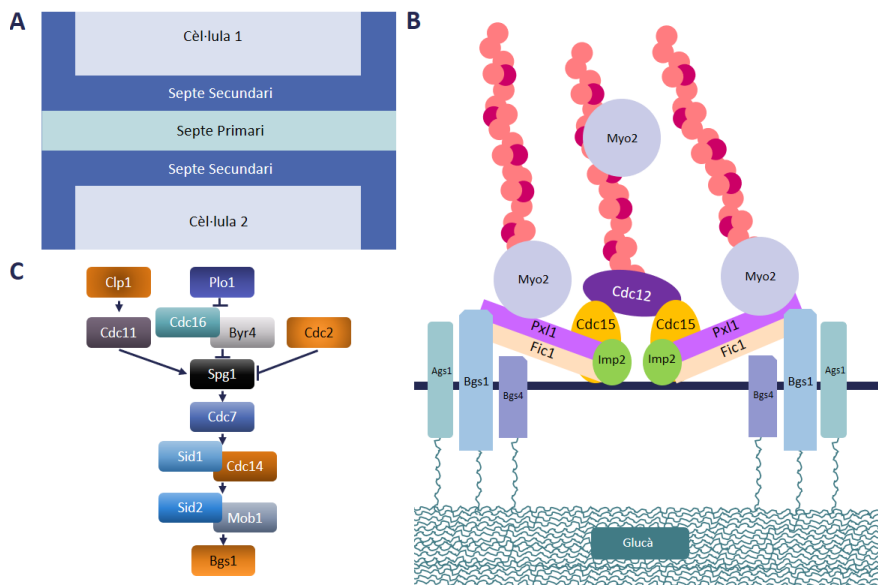


Figura 10. Representació de la formació del septe.
 (A) Estructura del septe entre les dues cèl·lules filles.
 (B) Ancoratge del CAR a la paret cel·lular de glucà.
 (C) Control de la síntesi del septe a través de la via SIN.

INTRODUCCIÓ

La paret està formada per una xarxa de polisacàrids, principalment glucà. En el moment de la separació cel·lular, es forma una estructura derivada d'aquesta paret coneguda com a septe (Pérez et al. 2016). Aquesta estructura glucídica mostra 3 capes diferenciades (Fig. 10A). Per començar, la capa central es coneix com a septe primari (SP), la qual és una modificació de la paret cel·lular en la que predominen polisacàrids lineals. Aquesta capa està flanquejada per dos septes secundaris (SS), els quals es sintetitzen alhora al SP i tenen una composició idèntica a la paret cel·lular. Aquesta, per tant, serà la futura paret de la cèl·lula filla en aquest extrem.

En *S. pombe*, les proteïnes encarregades de la síntesi de la paret són conegudes com a Bgs. Concretament, Bgs2 és responsable de la síntesi de la paret durant l'esperulació, mentre que Bgs1, 3 i 4 estan implicades en processos de creixement vegetatiu (Pérez et al. 2016). Pel que fa a la síntesi del septe (Fig. 10B), Bgs1/Cps1/Drc1 és la responsable de la síntesi del SP (Humbel et al. 2001) i Bgs4, de l'estabilitat de la paret en la separació de les cèl·lules.

La síntesi del septe, com hem dit, ha de ser coordinada amb la contracció del CAR. De fet, la presència de la paret cel·lular (Mishra et al. 2012), Bgs1 (Arasada and Pollard 2014) i Bgs4 (Muñoz et al. 2013) és fonamental per l'ancoratge del CAR i evitar que aquest llisqui per la cèl·lula. Aquestes proteïnes interaccionen amb Imp2, Fic1 i Pxl1 del CAR i fixen les dues estructures juntes (Cortés et al. 2016; Pérez et al. 2016) (Fig. 10B).

Així, la coordinació entre la contracció del CAR i la síntesi del septe es dona a través de la SIN, que tot i no ser necessària per l'assemblatge del CAR, sí és imprescindible (juntament amb Plo1) per a la maduració i contracció del mateix (Hachet and Simanis 2008; Roberts-Galbraith and Gould 2008; Wolfe and Gould 2005). Tots els elements del SIN es relacionen íntimament amb el SPB en funció de la fase del cicle en que es troben (Krapp and Simanis 2008; Simanis 2015). La via SIN està altament regulada, i consta dels següents passos (Fig. 10C):

- 1) La via SIN s'inicia amb la GTPasa Spg1.
 - 1.1) En interfase, es troba inhibida pel complex GAP (Byr4 i Cdc16 (Furge et al. 1998)), unida al SPB per altres membres de SIN (Sid4 i Cdc11) i conjugada amb GDP (Cerutti and Simanis 1999).
 - 1.2) Plo1, activada per Cdc2 al principi de la mitosi, inactiva el complex GAP (Balasubramanian et al. 2000; Roberts-Galbraith and Gould 2008).
 - 1.3) Clp1 assoleix un màxim d'activitat al final de la mitosi. L'activació de Clp1 desfosforila i activa la Cdc11 (Chen et al. 2013; Trautmann et al. 2001).
 - 1.4) A continuació, una disminució de l'activitat de Cdc2 permet l'activació de Spg1, però només si 1.2 s'ha donat anteriorment. Això evita una septació incorrecta durant la fase S (Cerutti and Simanis 1999).
- 2) Spg1 es manté al SPB, de manera que quan aquest es duplica, un d'ells presenta la forma activa de la GTPasa. La distribució asimètrica de la forma activa de Spg1 permet controlar que la senyal de formació del septo sigui única.
- 3) La Spg1 activa Cdc7 (Sohrmann et al. 1998). Això activa una cascada de fosforilacions que passa pels complexos Sid1-Cdc14 i Sid2-Mob1.
- 4) Sid2, utilitza els microtúbuls post-anafàsics per traslladar-se al lloc de divisió cel·lular, on activa la contracció de l'anell i la formació del septo (Sparks, Morphew, and McCollum 1999).

En el cas de que l'anell presenti alguna pertorbació, la senyalització del SIN (a través de Clp1) s'allarga per facilitar una correcta divisió cel·lular.

La constricció del CAR es dona pel lliscament de les fibres d'actina alhora que aquests filaments i les proteïnes associades es desorganitzen per mantenir el

INTRODUCCIÓ

gruix de l'anell constant (Wu et al. 2003; Wu and Pollard 2005). Sembla que la concentració de miosina II sí que augmenta.

Sense la miosina, però, la cèl·lula és capaç de contraure el CAR. És per això que es creu que la formació del septe és la força principal que permet la citocinesi un cop s'ha iniciat la contracció (Liu et al. 1999, 2002; Pérez et al. 2016). La tensió produïda per la contracció de l'anell seria la responsable de l'activació de Bgs1, la qual inicia la síntesi del SP. Alhora, Ags1 inicia la formació del SS (Pérez et al. 2016).

La síntesi de la paret cel·lular es fa amb el suport de dues estructures que envolten el CAR a cada banda, formades per septines (Martín-Cuadrado et al. 2005) i Mid2 (Berlin, Paoletti, and Chang 2003; Gu and Oliferenko 2015). Entre altres, col·laboren en l'acumulació d'agregats d'actina a la zona de la divisió que permeten l'aport de material necessari per a la síntesi del septe (An et al. 2004; Tasto, Morrell, and Gould 2003).

El SIN té una tercera funció en el procés de divisió cel·lular. Durant la interfase, la ruta *morphogenesis Orb6* (MOR) és la responsable del control de la morfologia i el creixement polar de la cèl·lula (Gupta and McCollum 2011; Ray et al. 2010). L'activació de la ruta SIN provoca una inhibició de la via MOR (Gupta and McCollum 2011) que permet la remodelació del citoesquelet d'actina durant la mitosi.

Un cop l'anell s'ha contret i el septe s'ha format correctament, les cèl·lules filles es separen per la degradació del septe primari, la qual es duu a terme amb les glucanases Eng1 (Martín-Cuadrado et al. 2003) i Agn1 (Dekker et al. 2004). Aquest procés està relacionat amb l'activació de la via MOR (Gupta, Govindaraghavan, and McCollum 2014).

3. CaM-quinases en *Schizosaccharomyces pombe*

El calci (Ca^{2+}) és un segon missatger intracel·lular que regula un gran nombre de processos fisiològics. Entre ells, es troben les transicions entre les fases G1/S, G2/M i metafase/anafase.

En eucariotes, els nivells de calci es monitoritzen principalment per mitjà de la calmodulina (CaM) (Chin and Means 2000). Quan els nivells de calci augmenten a $1 \mu\text{M}$, aquesta s'uneix a 4 àtoms de calci, el que li provoca un canvi conformacional que permet que s'uneixi a altres proteïnes (Fig. 11).

Dins de les quinases i canals iònics que s'activen mitjançant aquesta unió trobem les quinases dependents de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK). En mamífer, alguns membres d'aquesta família són la CaMKI, CaMKII i CaMKIV. A més de l'activació per Ca^{2+} /CaM, hi ha CaMK que requereixen d'una activació per fosforilació, la qual realitza la CaMKK (que també pertany a aquesta família) (Manning et al. 2002; Ohmae et al. 2006).

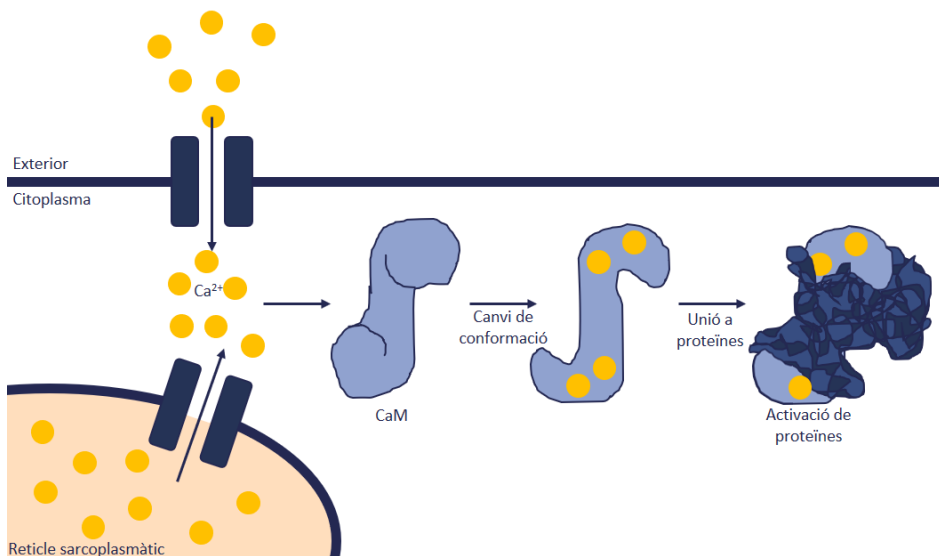


Figura 11. Representació del canvi conformacional de la calmodulina (CaM) i l'activació de proteïnes.

INTRODUCCIÓ

En *S. pombe*, existeix un únic gen que codifica per CaM (*cam1*), una proteïna de 150 aas, 16.91 kDa. També existeixen cinc proteïnes que presenten homologia de seqüència amb les CaMK: Ssp1, Ckk2, Cmk1, Cmk2 i Srk1. D'aquestes, les úniques que presenten activitat depenent de Ca^{2+} /CaM són la Cmk1 i la Ckk2.

3.1.Ssp1

Ssp1 és una proteïna de 652 aas, 73.99 kDa, ortòloga de CaMKK. Tot i que la seva activitat no depèn de Ca^{2+} /CaM, sí que presenta un domini d'unió a calmodulina (CBD) (Gómez-Hierro et al. 2015).

Ssp1 va ser descrita en el seu paper essencial com a responsable de la deslocalització del citoesquelet d'actina en resposta a estrès (Rupeš, Jia, and Young 1999). També es va veure que tenia un paper en el NETO.

Estudis previs del nostre grup van definir un paper positiu per a Ssp1 en la transició G2/M, ja que la seva deleció atura el cicle cel·lular en aquesta fase (Gómez-Hierro et al. 2015). Vam establir que Ssp1 és capaç d'inhibir Srk1, que (com explicarem més endavant) al seu torn inhibeix Cdc25 i atura el cicle cel·lular.

El nostre grup també va establir que la via Ssp1/Srk1 té un paper en el control de la morfologia cel·lular (Gómez-Hierro et al. 2015). El paper de Ssp1 en el control del NETO (Rupeš et al. 1999), però, és independent de Srk1 (Gómez-Hierro et al. 2015). Respecte a això, vam establir que Ssp1 controla la regulació de la polarització d'actina a través de Twf1.

Recentment s'ha descrit un altre paper en la regulació del cicle cel·lular per Ssp1 relacionat amb Pom1 i el seu control sobre Cdr2. Com ja hem explicat, Cdr2 promou l'entrada a mitosi inhibint Wee1. Alhora, una alta concentració de Pom1 al centre de la cèl·lula inhibeix Cdr2. Quan la concentració de Pom1 disminueix, Ssp1 és la responsable d'activar Cdr2 i induir la mitosi (Deng et al. 2014).

Per tant, es creu que Ssp1 forma part d'un complex que controla la progressió del cicle cel·lular a través de Srk1 i Cdr2 (Rupeš et al. 1999), alhora que actua com un sensor del flux d'actina i la seva polarització (Gómez-Hierro et al. 2015).

També s'ha observat que Ssp1 és necessària en condicions de privació de glucosa (Hanyu et al. 2009) i nitrogen (Yanagida et al. 2011), així com en una àmplia varietat d'estressos: pH, temperatura i osmòtic (independentment de la via Sty1); durant els quals es segresta des del citoplasma a la membrana plasmàtica. Es sap que en aquestes condicions, Ssp1 activa l'ortòloga de AMPK Ssp2.

3.2.Ckk2

Ckk2 és una proteïna de 354 aas, 40.41 kDa. Va ser descrita per primer cop pel nostre grup com la homòloga de CaMKK2 de mamífer (Cisneros-Barroso et al. 2014), d'on en sorgeix el nom. En conseqüència, el nostre grup va caracteritzar el paper de Ckk2.

Vam demostrar que, davant altes concentracions de calci, Ckk2 s'activa a través de Ca^{2+}/CaM (Cisneros-Barroso et al. 2014). Aquesta, al seu torn, és la responsable d'activar Cmk1 si primerament s'ha unit a Ca^{2+}/CaM , la qual dona resposta a un estrès per calci (que veurem a continuació).

3.3.Cmk1

Cmk1 és una proteïna de 335 aas, 38.16 kDa, homòloga de CaMKI. No és essencial per a la viabilitat cel·lular i té una activitat dependent de Ca^{2+}/CaM i la fosforilació per Ckk2 (Cisneros-Barroso et al. 2014).

Estudis del nostre grup van descriure la funció de Cmk1 íntimament lligada amb la de la fosfatasa calcineurina (*ppb1*), element important en la resposta a Ca^{2+}/CaM (Cisneros-Barroso et al. 2014). Aquesta resposta ha d'estar limitada a la resposta a un increment de calci, i per això hi ha una forta regulació de la via

INTRODUCCIÓ

mitjançant una gran quantitat de quinases que inhibeixen les dianes de calcineurina. La calcineurina desfosforila i activa Prz1, que es trasllada al nucli i activa la transcripció de gens involucrats en la homeòstasi de Ca^{2+} .

El gen *cmk1* és un dels que es transcriuen a través de Prz1. La quinasa Cmk1 fosforila Prz1, la qual és inhibida i exportada del nucli. Això resulta en la finalització de l'expressió de gens de resposta a calcineurina en un cicle de retroalimentació negativa (Cisneros-Barroso et al. 2014).

L'activació de la via Ckk2/Cmk1 també està involucrada en aturar el cicle cel·lular en resposta a estrès (Rasmussen 2000). Concretament, hem descobert que Cmk1 fosforila Cdc25 en resposta a un increment de calci (Cisneros-Barroso et al. 2014).

3.4.Cmk2

Cmk2 és una proteïna també descrita pel nostre grup, de 504 aas, 56.61 kDa. És homòloga de les CaMK, tot i que la seva activitat no depèn de Ca^{2+}/CaM .

El gen *cmk2* està relacionat amb el control de cicle en resposta a estrès oxidatiu. Concretament, el nostre grup ha establert que Cmk2 és substrat de Sty1 en resposta a estrès oxidatiu (Alemany et al. 2002). És per aquest motiu que la seva funció es descriurà en més profunditat en l'apartat de les MAPK.

3.5.Srk1

Un altre component d'aquesta família descrit també pel nostre grup és la Srk1. Srk1 és una proteïna de 580 aas, 66.14 kDa, homòloga de MK2 i amb activitat independent de Ca^{2+}/CaM .

Srk1 és la quinasa principal en la que es centra aquest treball. És substrat de Sty1, que com hem dit, forma part del grup de les MAPK. Degut al seu paper en la resposta a estrès i en la regulació del cicle cel·lular, aquesta quinasa està descrita més àmpliament en l'apartat de les MAPK.

4. MAPKs en *Schizosaccharomyces pombe*

Les vies de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) estan involucrades en la resposta a estímuls que requereixen d'una adaptació per a la supervivència: resposta a estrès, danys en la integritat cel·lular i resposta a feromones. En *S. pombe*, existeixen 3 vies de senyalització per MAPK, una per a cada tipus d'estímul (Fig. 12).

Les vies es divideixen en 3 nivells. Un nivell superior destinat a la captació de les diferents senyals, el qual determina el mecanisme de resposta necessari (sensors). Aquest nivell està format tant per MAPKKK com per GTPases de la família Ras o Rho (WILKINSON and MILLAR 2000). En un nivell inferior trobem la seqüència de quinases que transmeten la senyal (transductors) i un nivell final format per les proteïnes que duen a terme la resposta (efectors).

La via de transducció de la senyal està formada per la fosforilació seqüencial de 3 quinases altament conservades: la MAPKKK (Ser/Thr), la MAPKK (Thr/Tyr) i la MAPK (Ser/Thr) (González-Rubio et al. 2019). La MAPK és la efectora principal de la via i és la responsable final d'activar la resposta als diferents estímuls: fosforilació de factors de transcripció, de proteïnes de cycle cel·lular i d'estabilitat del RNA, entre altres. Aquests programes d'expressió gènica i regulació del cycle són imprescindibles per a la supervivència cel·lular.

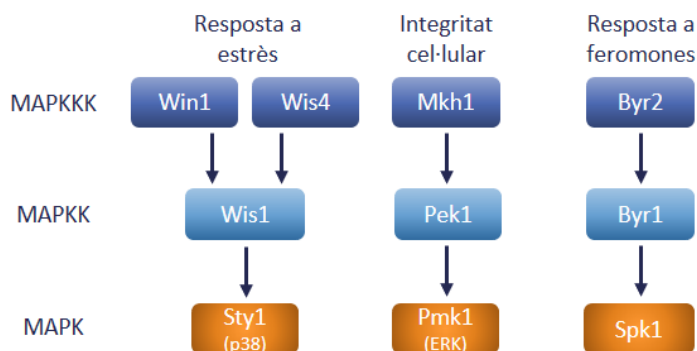


Figura 12. Representació de les 3 vies de resposta a estímuls per les MAPK.

INTRODUCCIÓ

Aquests nivells estan relacionats amb les 3 fases de resposta a un estímul. En una fase primària, l'estímul provoca canvis directes sobre la morfologia cel·lular. En cas de sobreviure, s'activa la fase de resposta, en la que les diferents vies de les MAPK determinen el mesures que s'han de prendre a la cèl·lula. Finalment, en la fase d'adaptació es restableixen les activitats cel·lulars normals per al creixement i la proliferació, pel que és necessari aturar la cascada de senyalització.

Com ja hem dit, 3 tipus d'estrès es canalitzen a través de 3 vies diferents de les MAPK (Fig. 12). Una primera via que actua en resposta a diferents tipus d'estrès (SAPK); una via que respon als danys en la integritat cel·lular i una última via dedicada a la resposta a feromones.

4.1. Stress-activated protein kinase (SAPK) i Sty1

Igual que en mamífers, en *S. pombe* la via SAPK s'activa davant d'un gran nombre de tipus d'estressos ambientals. Està destinada a mantenir la homeòstasis cel·lular (Shieh et al. 1997; Warbrick and Fantes 1991) i desencadenar una resposta adaptativa (canvis fisiològics i d'expressió gènica) a aquest estrès (Ho and Gasch 2015). És digne de menció que l'adaptació a un determinat tipus d'estrès pot comportar un augment de la resistència a altres stressos, el que es coneix com a protecció creuada. Això justifica que una mateixa via doni resposta a diferents tipus d'estrès: osmòtic (KCl i sorbitol (Shiozaki and Russell 1995)), per toxicitat (cations (Wang et al. 2005) i metalls (Rodríguez-Gabriel and Russell 2005)), per ROS (H₂O₂ (Degols, Shiozaki, and Russell 1996)), per xoc tèrmic (augment (Degols et al. 1996) i disminució de temperatura (Soto et al. 2002)), per radiació (UV (Degols and Russell 1997)), per pressió (gravitacional (Soto et al. 2007) i hidrostàtica (George, Brooks, and Humphrey 2007)) i per restricció nutricional (glucosa, nitrogen (Celton-Morizur et al. 2006) i calòrica (Zuin et al. 2010)).

Els elements sensors (Fig. 13) de la via SAPK no estan profundament caracteritzats, excepte en el cas de l'estrès oxidatiu. La via s'inicia amb les quinases d'histidina Mak1, Mak2/Phk1 i Mak3/Phk2 (Buck et al. 2001; Quinn et al. 2002). Mak2 i Mak3 són capaces de fosforilar Mcs4 a través de Mpr1/Spy1 (Shiozaki, Shiozaki, and Russell 1997). Mcs4 és la responsable principal d'activar Wis4 (Shieh et al. 1997; Zhou et al. 2010).

Els elements transductors de la via (Fig. 13) comencen amb les MAPKKK Win1 i Wis4, que fosforilen la MAPKK Wis1 en dos llocs a la zona C-terminal (Ser469 i Thr473) (Samejima et al. 1998; Shieh et al. 1997). Finalment, Wis1 fosforila la MAPK Sty1 (Thr171 i Tyr173) (Zhou et al. 2010).

Win1 és una proteïna de 1436 aas, 163.27 kDa. Wis4/Wak1/Wik1 és una proteïna de 1401 aas, 160.54 kDa. Sembla que presenten funcions redundants en la resposta a estrès.

Wis1/Spc2/Smf2 és una proteïna de 605 aas, 64.76 kDa, homòloga de les MAPKK de mamífer. La seva activació provoca que sigui importada al nucli. Un cop ha realitzat la seva funció, s'exporta de nou al citoplasma.

Sty1/Spc1/Phh1 és una proteïna de 349 aas, 40.22 kDa, homòloga de p38 de mamífer. Un cop fosforilada, la Ran intercanviadora de GDP/GTP Pim1 la importa al nucli, on queda retinguda per Atf1. Un cop passat l'estímul, l'exportina Crm1 transporta Sty1 fora del nucli (Gaits and Russell 1999; Nguyen et al. 2002) per ser inhibida en el citoplasma per les fosfatases Pyp1, Pyp2 (Millar, Buck, and Wilkinson 1995) i PP2C (Ptc1 i Ptc3) (Shiozaki and Russell 1995).

En ocasions, l'activació de Sty1 es dona per inhibició d'aquestes fosfatases (Samejima, Mackie, and Fantès 1997). Així, la resposta a estrès es pot donar independentment de les MAPKK en resposta a cadmi (Zhou et al. 2010) i a baixes

INTRODUCCIÓ

concentracions de glucosa i nitrogen (Petersen and Nurse 2007), probablement a través de la via TOR i Gcn2.

L'activació de Sty1 provoca canvis en l'expressió dels gens del *core environmental stress response* (CESR) (Chen et al. 2003) (normalment a través d'Atf1 (Sánchez-Mir et al. 2018)). Dins dels efectors de Sty1 (Fig. 13) també trobem les proteïnes quinases Cmk2 i Srk1, així com Plo1 de forma indirecta (Asp and Sunnerhagen 2003). D'aquestes proteïnes es parlarà en els següents apartats.

En menor mesura, Sty1 activa proteïnes d'unió al mRNA com Csx1, la qual s'uneix i estabilitza el RNA de Atf1 i Pcr1 (Rodríguez-Gabriel et al. 2003). També redueix la fosforilació del factor d'inici de traducció eIF2 α (Dunand-Sauthier et al. 2005), eIF3a i el factor d'elongació de la traducció eEF2 (Asp, Nilsson, and Sunnerhagen 2008).

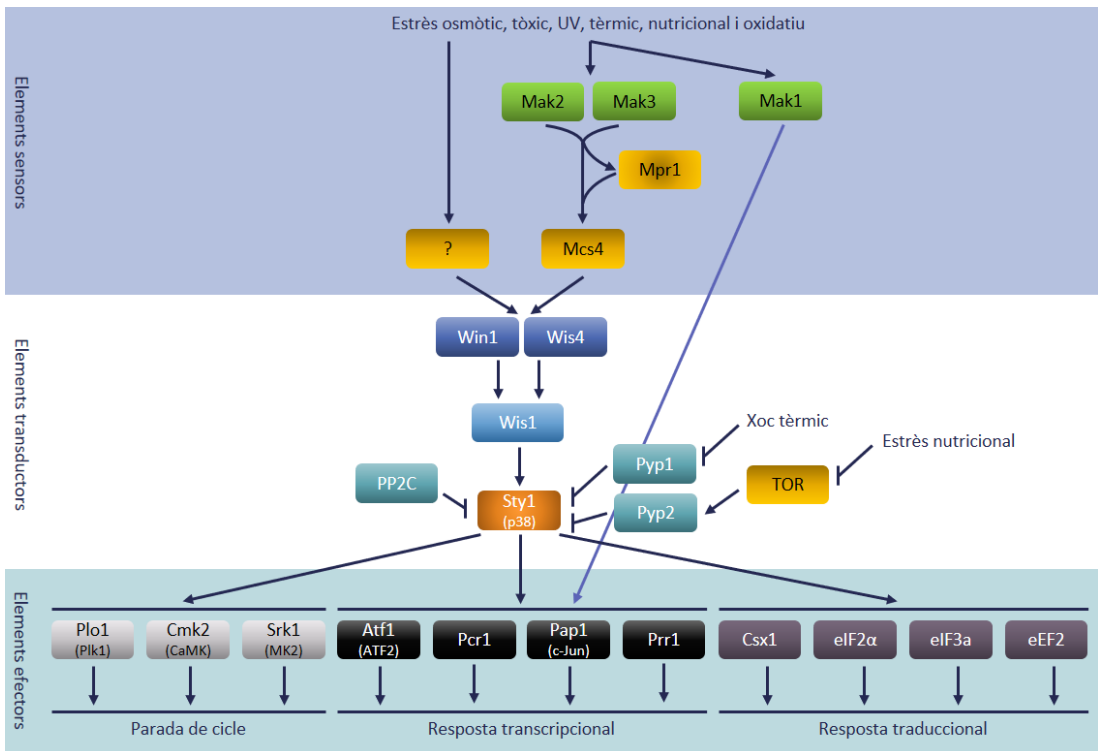


Figura 13. Representació de la via de les SAPK.

Recentment s'ha comprovat que Sty1 també regula directament el cicle cel·lular, ja que és capaç de fosforilar Cdr1 i col·laborar en la seva deslocalització dels nodes (Opalko and Moseley 2017), aturant el cicle cel·lular davant un estrès. Aparentment, també se la relaciona amb el procés de recuperació un cop passat l'estrès, ja que es sap que és capaç de fosforilar i inhibir Rum1, el que permet la progressió vers la mitosi (Matsuoka et al. 2002).

4.1.1. Gens CESR i factors de transcripció

La resposta a diferents tipus d'estrès passa per una reacció global de la cèl·lula anomenada *core environmental stress response* (CESR). Aquesta engloba tots els processos que col·loren en la homeòstasis cel·lular. Entre aquests processos trobem els canvis en l'expressió de certs gens. Entre aquests es va observar la inducció de 140 i la repressió d'uns altres 100 gens (Chen et al. 2003).

Així, es va observar que augmentava l'expressió de gens implicats en el metabolisme de carbohidrats, antioxidants, ubiquïtinització i *heat shock*, així com factors de transcripció (Atf1 i Pcr1). Alhora es reprimien gens implicats en la síntesi de proteïnes, transport, transcripció, senyalització i organització del citoesquelet (Chen et al. 2003). Tots aquests gens estan sota el control de 4 factors de transcripció:

Pap1 és un factor de transcripció de 552 aas, 61.53 kDa, homòleg de c-Jun de mamífer, que regula la transcripció de gens de resposta a un lleu estrès oxidatiu. De forma dependent de Sty1, Pap1 es transporta al nucli en activar-se, tot i que no s'ha demostrat que en sigui una diana directa. Sembla que Mak1 podria tenir un efecte independent de les MAPK sobre aquesta activació (Buck et al. 2001). Un cop acabada la resposta, és exportat i Crm1 el manté al citoplasma (Toone et al. 1998).

INTRODUCCIÓ

Prr1 és un factor de transcripció de 539 aas, 60.05 kDa, que regula la transcripció de gens de resposta a estrès oxidatiu. Sembla que Sty1 no és la única activadora de Prr1, i degut a la seva similitud amb Mcs4, podria ser substrat d'alguna de les Mak. Alhora, està relacionat íntimament amb Pap1, activant-la i realitzant un paper similar al seu (Ohmiya et al. 1999).

Atf1 és un factor de transcripció de 566 aas, 59.7 kDa, i és el principal efector de la via Sty1. El gen *atf1/mts1/sss1/gad7* presenta una elevada homologia amb la família de factors de transcripció ATF/CREB de mamífer (Hai and Hartman 2001) (53% d'identitat amb ATF2) (Takeda et al. 1995). En *S. pombe*, la fosforilació de Atf1 per Sty1 la estabilitza (Lawrence et al. 2007; Shiozaki and Russell 1996; Wilkinson et al. 1996), però no és la única MAPK capaç de realitzar aquesta funció. Pmk1 també la fosforila en resposta a estrès osmòtic (Takada et al. 2007), de manera que les rutes de resposta a estrès i d'integritat cel·lular convergeixen en l'activació de Atf1.

Pcr1 és un factor de transcripció de 171 aas, 19.35 kDa, que forma heterodímers amb Atf1 (Kano et al. 1996; Lawrence et al. 2007; Watanabe and Yamamoto 1996). Tot i això, el fet que Pcr1 no sigui essencial sembla indicar que Atf1 pot actuar com a homodímer.

En condicions basals, Atf1 es troba unida a Fbh1, part del sistema d'ubiquïtinització. Això provoca una continua degradació i producció de la proteïna. En resposta a un estrès osmòtic, Sty1 catalíticament activa s'uneix als promotors i regions reguladores dels gens del CESR (Reiter et al. 2008) i recluta Atf1 per induir l'expressió, perdent la unió amb Fbh1 (Lawrence, Jones, and Wilkinson 2009). Atf1 interacciona amb el DNA a través d'un domini b-Zip que s'uneix a seqüències CRE.

Atf1 està relacionat amb l'expressió de gens per al desenvolupament sexual (Kon et al. 1998) (*ste11* (Takeda et al. 1995)), *srk1* (Asp and Sunnerhagen 2003) i la

reparació de danys en la paret cel·lular. També provoca l'expressió de *pyp2*, provocant un cicle de retroalimentació negativa en l'activació de Sty1 (Wilkinson et al. 1996).

Hi ha 4 classes de CESR en funció de si depenen de Sty1, Atf1, ambdós o cap (Chen et al. 2003):

- 1) Classe 1: l'expressió d'aquests gens depèn de Sty1 i Atf1 tant per a la seva expressió basal com per inducció per estrès.
- 2) Classe 2: l'expressió d'aquests gens depèn de Sty1 i Atf1 únicament en el cas d'inducció per estrès.
- 3) Classe 3: l'expressió d'aquests gens depèn únicament de Sty1 en el cas d'inducció per estrès.
- 4) Classe 4: l'expressió d'aquests gens no depèn de Sty1 ni d'Atf1 sota cap circumstància.

4.1.2. MAPK-activated proteins (MAPKAP)

Tot i que la via principal d'acció de Sty1 és a través de factors de transcripció, també s'han descrit proteïnes quinasa activades per MAPK (MAPKAP), un conjunt de quinases efectores de la via.

4.1.2.1. Plo1

Plo1 és una proteïna de 683 aas, 77.3 kDa, ortòloga de Plk1 de mamífers i està relacionada amb la via SAPK en resposta a estrès de nitrogen (Petersen and Nurse 2007) i tèrmic (Petersen and Hagan 2005).

Presenta dos dominis POLO BOX a la regió C-terminal que li permeten la correcta localització i interacció amb els substrats. A l'extrem N-terminal presenta el seu domini quinasa (May et al. 2002).

Com ja hem explicat, està relacionada amb la via SIN. A més de la formació del fus mitòtic (Ohkura, Hagan, and Glover 1995), el reclutament de Mid1 al còrtex

INTRODUCCIÓ

medial, la fosforilació del APC (May et al. 2002), la contracció del CAR i la síntesi del septe primari (Tanaka et al. 2001); s'ha relacionat amb l'entrada a mitosi (Reynolds and Ohkura 2003). La seva fosforilació (Ser402) promou que el SPB (Cut12) la recluti i reguli l'activitat de Wee1 i Cdc25 (entre altres), activant el MPF (Maclver et al. 2003). L'activació de la via Wis1/Sty1 provoca aquesta fosforilació al final de la resposta a estrès i promou la recuperació de la cèl·lula a unes condicions normals (Petersen and Hagan 2005).

4.1.2.2.Cmk2

Cmk2/Mkp2, que presenta homologia amb les CaMK tot i tenir activitat independent de Ca^{2+} /CaM, és substrat de Sty1 (Asp and Sunnerhagen 2003), que la fosforila en el seu domini regulador (Thr411). Malgrat Cmk2 no és essencial en condicions normals (Alemany et al. 2002), sí que és necessària en resposta a estrès oxidatiu (Sánchez-Piris et al. 2002) i estrès per toxicitat per metalls (Sanchez-Marinas et al. 2018).

La seva presència fluctua al llarg del cicle cel·lular, presentant un màxim en post-anafase i un mínim en entrada en G2. Aparentment està relacionada amb un bloqueig de cicle en la fase G2 dependent de Cdc2 (Alemany et al. 2002). També regula negativament la traducció de gens específics de resposta a estrès modulant Cpc2.

4.1.2.3.Srk1

Srk1 és una proteïna de 580 aas, 66.14 kDa, homòloga de MK2 de mamífer. Presenta homologia amb les CaMK tot i tenir activitat independent de Ca^{2+} /CaM. És una Ser/Thr-quinasa amb un consens de fosforilació de RXXS/T. Els nostre grup ha descrit el paper per a Srk1 en resposta a estrès osmòtic (López-Avilés et al. 2005, 2008).

Inicialment, el nostre grup va observar que Srk1 fosforila i inhibeix Cdc25 (Fig. 14, Nucli) a la mateixa diana que Chk1 i Cds1. En resposta a dany del DNA, aquestes quinases fosforilen Cdc25 en una diana diferent a la de Cdc2 i inhibeixen la seva

activitat (Christensen et al. 2000; Cussiol, Soares, and de Oliveira 2020; O'Connell et al. 1997; Peng et al. 1997).

Aquesta fosforilació també provoca que Cdc25 quedi segrestada al citoplasma per Rad24, que l'estabilitza (Gómez-Hierro et al. 2015). Tot això evita que Cdc25 realitzi la seva funció i atura l'entrada a mitosi (López-Avilés et al. 2005). En aquest procés, l'estabilització de Cdc25 fa que aquesta s'acumuli al citoplasma. Un cop finalitzat l'arrest cel·lular, l'activitat de Srk1 disminueix i l'elevada concentració de Cdc25 permet que, a través de Cdc2, s'activi de forma ràpida i potent.

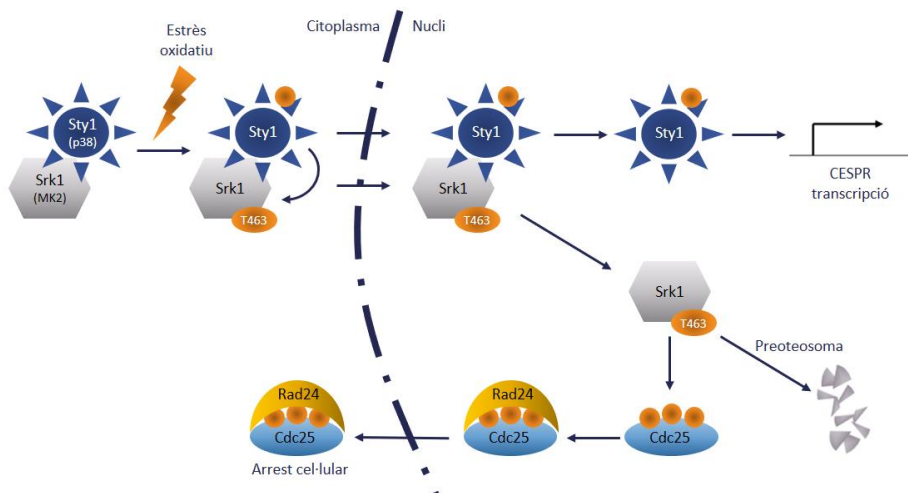


Figura 14. Representació de la via de Srk1 en fase vegetativa (*Ssp1*) i en resposta a estrès oxidatiu (*Sty1*).

Modificació de López-Avilés 2008.

Sabent que Srk1 era substrat de Sty1 en resposta a estrès (Asp et al. 2008; Asp and Sunnerhagen 2003; Smith et al. 2002), es va observar la relació entre aquestes dues proteïnes. En el nostre laboratori es va observar que, en condicions basals, Srk1 es troba unida a i estabilitzada per Sty1 (López-Avilés et al. 2008) (Fig. 14, Citoplasma). En resposta a un estrès, Sty1 s'activa, fosforila Srk1 a la regió reguladora C-terminal (Thr463) (López-Avilés et al. 2008). Això permet que les dues quinases es transloquin al nucli. Srk1 aleshores es troba lliure i

INTRODUCCIÓ

activa, on pot inhibir Cdc25 i el cicle cel·lular com ja havíem observat (López-Avilés et al. 2005).

L'activitat de Srk1 al final de la resposta a estrès disminueix ja que la forma lliure d'aquesta quinasa és inestable, de manera que pot ser degradada per la via del proteosoma (López-Avilés et al. 2008) (Fig. 14).

No s'ha demostrat que Srk1 tingui una funció fora de la resposta a estrès. Les cèl·lules amb aquesta quinasa delecionada, però, presenten una mida inferior a la normal en condicions de creixement favorables. Això fa pensar que, tot i que el seu paper principal és la resposta a estrès, Srk1 podria estar regulant el cicle cel·lular a través de Ssp1 (Gómez-Hierro et al. 2015). Durant la meiosi, també s'ha observat que Srk1 s'acumula a les asques zigòtiques i s'acaba concentrant a les espores (Asp and Sunnerhagen 2003).

4.2.Ruta d'integritat cel·lular i Pmk1

La ruta d'integritat cel·lular s'activa en resposta a danys en la paret cel·lular.

Els elements sensors (Fig. 15) de la via s'inicien per una disminució de l'activitat de Rho (tant Rho1 com Rho2), la qual es tradueix en una activació de les PKC Pkc1 i Pkc2 (Perez and Cansado 2011; Viana et al. 2013). Aquestes quinases son les responsables de fosforilar Mkh1 (Toda et al. 1996).

Els elements transductors (Fig. 15) de la via comencen amb la MAPKKK Mkh1, que fosforila la MAPKK Pek1 (Thr238). Finalment, Pek1 fosforila la MAPK Pmk1 (Thr186, Tyr188) (Sugiura et al. 1999; Toda et al. 1996).

Mkh1 és una proteïna de 1116 aas, 125.13 kDa.

Pek1/Skh1/Mkk1 és una proteïna de 363 aas, 40.71 kDa. La forma desfosforilada de Pek1 és capaç d'inhibir Pmk1 (Sugiura et al. 1999).

Pmk1/Spm1 és una proteïna de 422 aas, 48.26 kDa, homòloga de ERK (Takada et al. 2010) de mamífer.

L'activació de Pmk1 (Fig. 15) provoca canvis en l'expressió dels gens controlats per Atf1, com passa amb la resposta a estrès (Takada et al. 2007). Així, s'expressen gens que permeten la biogènesi i l'organització de la paret cel·lular. Entre els gens diana d'Atf1 també es troba Ecm33. Aquesta està involucrada en la regulació negativa de la mateixa via d'integritat cel·lular a través d'una senyalització per calci.

Pmk1 té un efecte directe sobre la citocinesi a través de Nrd1, una proteïna de 529 aas, 57.76 kDa. Aquesta s'uneix i estabilitza el mRNA de Cdc4, que codifica per a la cadena lleugera de la miosina II. Pmk1 inhibeix la funció de Nrd1, el que redueix l'expressió de Cdc4 i evita la formació del CAR (Satoh et al. 2009).

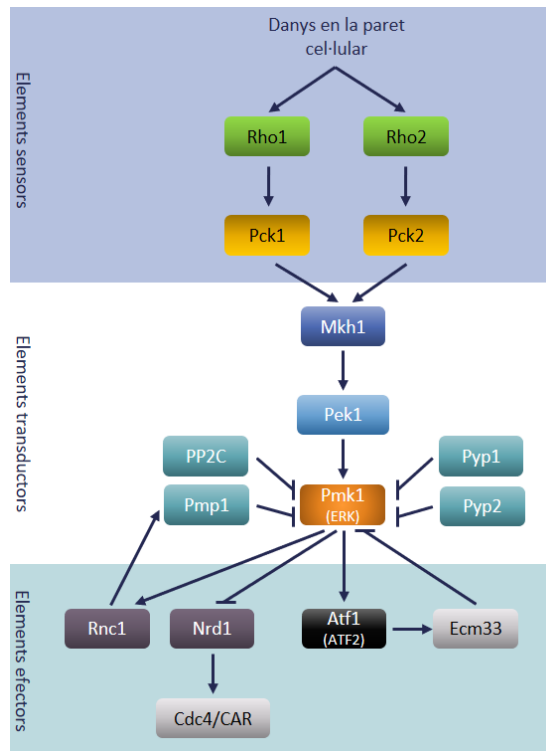


Figura 15. Representació de la ruta d'integritat cel·lular.

INTRODUCCIÓ

Finalment, Pmk1 també regula la seva pròpia inhibició en un cicle de retroalimentació negativa. S'uneix a Rnc1, una proteïna de 398 aas, 43.38 kDa. Aquesta s'uneix al mRNA de Pmp1 (una fosfatasa que desfosforila Pmk1) i n'augmenta la seva traducció (Sugiura et al. 2003).

4.3.Ruta de senyalització per feromones i Spk1

La ruta de senyalització per feromones s'activa per iniciar la diferenciació sexual i la conjugació en *S. pombe* en resposta a una manca de nitrogen. En funció del sexe de la cèl·lula, aquestes secreten el factor M (h-, pel transportador Mam1) o el factor P (h+).

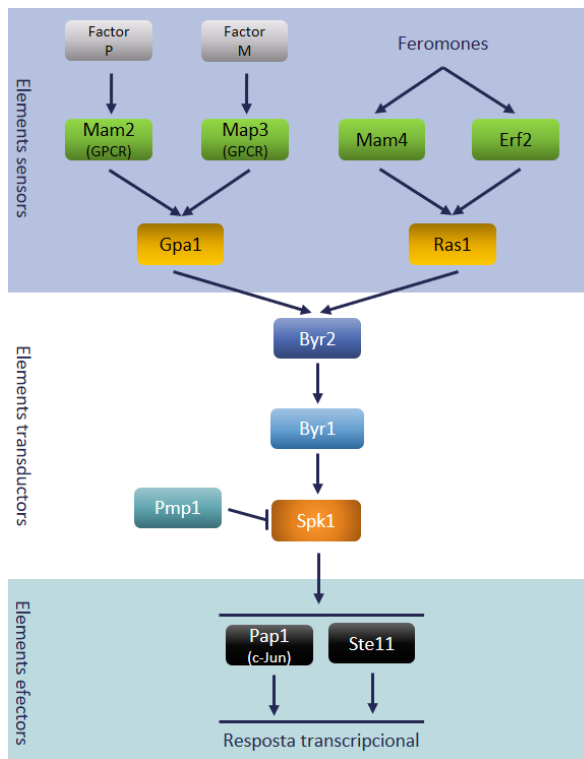


Figura 16. Representació de la ruta de senyalització per feromones.

Els elements sensors de la via (Fig. 16) s'inicien amb els receptors de feromones: Mam2 per al factor P i Map3 per al factor M; els quals pertanyen a la família de

receptors acoblats a proteïna G (GPCR). Aquests receptors activen la subunitat $G\alpha$, Gpa1, la qual activa la via de les MAPK (Dudin, Merlini, and Martin 2016). Les palmitoil-tranferasses Mam4 i Erf2 també s'han descrit com activadores de la via de Ras1, la qual fosforila Byr2 (Franco et al. 2017; Gilbreth et al. 1996).

Els elements transductors de la via (Fig. 16) comencen amb la MAPKKK Byr2, que fosforila a la MAPKK Byr1. Finalment, Byr1 fosforila la MAPK Spk1 (Neiman et al. 1993).

Byr2/Ste8 és una proteïna de 659 aas, 73.63 kDa.

Byr1/Ste1/Ste3 és una proteïna de 340 aas, 38.19 kDa.

Spk1 és una proteïna de 372 aas, 42 kDa. No és essencial per al creixement vegetatiu, però sí és necessària per a la conjugació. Es localitza principalment al nucli, però també als SPB i al citosol.

Spk1 es caracteritza per ser un supressor de l'estaurosporina, un inhibidor natural de quinases. Es creu que aquesta interacciona amb Pap1, que podria ser una de les dianes de Spk1 (Toda, Shimanuki, and Yanagida 1991). Una altra diana és Ste11/Aff1/Stex, un altre factor de transcripció íntimament relacionat amb la diferenciació sexual (Kjaerulff et al. 2005) (Fig. 16).

4.4.Regulació negativa de les MAPK

És molt important que la resposta a diferents estímuls duta a terme per les MAPK sigui transitòria i es limiti al tipus i duració dels mateixos (Millar et al. 1995; Shiozaki and Russell 1995). Donat que aquesta resposta es dona a través d'un conjunt de quinases, és lògic que la regulació negativa que permet modular la intensitat i duració de la senyal la portin a terme un conjunt de fosfatases. Durant la fase d'adaptació, aquestes s'activen i restableixen les condicions basals (Fig. 13, 15 i 16).

INTRODUCCIÓ

4.4.1. Tirosina-fosfatases: Pyp1 i Pyp2

Pyp1 és una proteïna de 550 aas, 61.59 kDa. S'expressa de forma constitutiva a la cèl·lula i alhora es troba fortament induïda a través de Sty1.

Pyp2 és una proteïna de 711 aas, 79.36 kDa. S'expressa únicament en resposta a estrès a través de Sty1 i Atf1 (Degols et al. 1996; Wilkinson et al. 1996).

Ambdues van ser descrites com a reguladores negatives de la mitosi (Ottillie et al. 1992), actuant com a mecanisme de retroalimentació negativa desfosforilant Sty1 (Tyr173) i Pmk1 (Madrid et al. 2007; Millar et al. 1995).

En algunes situacions, com en l'estrès per calor, oxidatiu i nutricional; es fa servir la inhibició d'aquesta via per activar Sty1 (Nguyen and Shiozaki 1999) (Petersen and Nurse 2007).

4.4.2. Fosfatases d'especificitat dual (PP2C): Ptc1 i Ptc3

Ptc1 és una proteïna de 347 aas, 38.68 kDa. Ptc3 és una proteïna de 414 aas, 44.86 kDa, que és sobre-expressada a través de Sty1 i Atf1 (Gaits and Russell 1999). Ambdues son homòlogues de la proteïna fosfatasa 2C (PP2C), la qual depèn de Mg^{2+} (Shiozaki and Russell 1995).

Actuen com a mecanisme de retroalimentació negativa desfosforilant Sty1 (Thr171). També modulen la seva activació quan Pyp1, que es troba inhibint Sty1, se'n separa i permet la seva ràpida i forta activació. Les fosfatases Ptc1 i Ptc3 atenuen aquesta activació (Nguyen and Shiozaki 1999; Shiozaki et al. 1994).

També estan involucrades en el control de Pmk1 (Madrid et al. 2007; Takada et al. 2007).

4.4.3.Fosfatases d'especificitat dual: Pmp1

Pmp1/Dsp1 és una proteïna de 278 aas, 31.63 kDa, homòloga de PAC-1 (Sugiura et al. 1998). La seva traducció s'indueix a través de Rnc1 en resposta a Pmk1 (Sugiura et al. 2003). Alhora, Pmp1 s'uneix, desfosforila i inhibeix Pmk1, actuant així en un cicle de retroalimentació negativa (González-Rubio et al. 2019; Sugiura et al. 1998; Toda et al. 1996).

Tot i que no s'ha establert una relació directa amb Spk1, també s'ha descrit un paper inhibitor de la via de senyalització per feromones (Didmon et al. 2002).

4.4.4.Altres reguladors: Ecm33

Ecm33 és una proteïna de superfície ancorada a glicosil-fosfatidilinositol, de 421 aas, 43.35 kDa. S'expressa en resposta a estrès a través d'Atf1 (Takada et al. 2010). Ecm33 regula la homeòstasis de Ca^{2+} en la cèl·lula, de manera que la seva activació redueix l'activitat de Pmk1.

5.Lsk1 i regulació de la RNA-polimerasa II

Degut a la identificació de la Lsk1 com a proteïna rellevant en el resultat d'aquesta tesi, és necessari incloure'n una breu introducció.

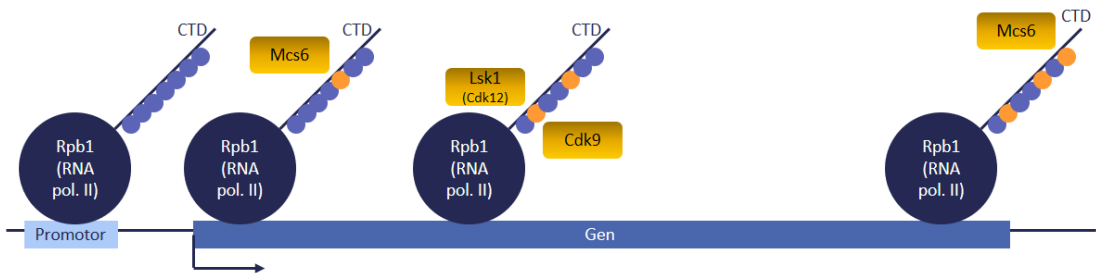


Figura 17. Representació de la regulació de Rpb1.

Lsk1/Ctk1 és una proteïna de 593 aas, 67.37 kDa, homòloga de Cdk12 de mamífer. És la subunitat catalítica del complex que fosforila i activa la RNA-polimerasa II (Rpb1 en *S. pombe*), juntament amb Lsc1 i Lsg1.

Lsc1/Ctk3 és una proteïna de 331 aas, 38.19 kDa, que actua com a ciclina reguladora associada a Lsk1. Lsg1/Ctk3 és una proteïna de 218 aas, 24.64 kDa, que actua com a subunitat reguladora gamma.

Rpb1 és una proteïna de 1752 aas, 194.16 kDa, homòloga de la RNA-polimerasa II de mamífer. Presenta entre 20 i 50 repeticions (29 en *S. pombe*) d'una seqüència de 7 aminoàcids (YSPTSPS) coneguda com a CTD. L'activitat de la polimerasa es regula a través de la fosforilació de les serines d'aquesta seqüència.

En el moment en que la polimerasa abandona el promotor i s'inicia l'elongació, és necessari que Mcs6/Cdk7 fosforili la Ser5 (Peterlin and Price 2006). A mesura que avança l'elongació, Lsk1 fosforila la Ser2 d'aquesta seqüència. La Ser7 és fosforilada al final de l'elongació per Mcs6 i sembla que la seva funció és important només en RNAs petits i no codificants (Coudreuse et al. 2010). Aquestes fosforilacions no són necessàries per a la funció catalítica de la RNA-

polimerasa II, però sí en regulen els diferents processos (Harlen and Churchman 2017).

Tant la deleció de *lsk1* (*latrunculin sensitive kinase 1*) com de *lsc1* (Karagiannis and Balasubramanian 2007) i *lsg1* (Saberianfar, Cunningham-Dunlop, and Karagiannis 2011) provoquen sensibilitat a latrunculina en *S. pombe*.

També s'ha vist que Rpb1 es fosforila en resposta a aquest tipus d'estrès (Karagiannis and Balasubramanian 2007).

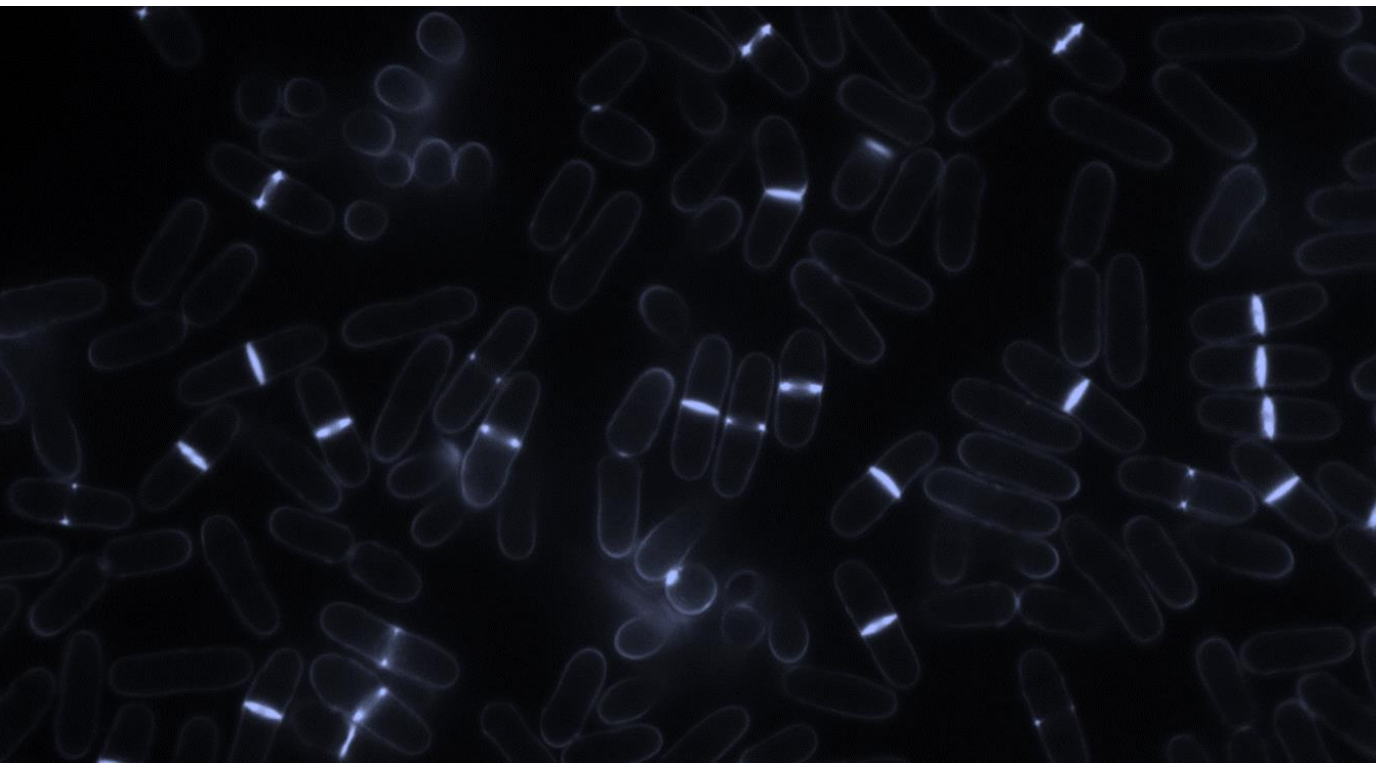
Es sap que l'activació d'aquesta via afavoreix l'èxit en completar la citocinesi (Karagiannis and Balasubramanian 2007; Saberianfar et al. 2011). De fet, s'ha vist que la seva homòloga en humans evita la fallada en la citocinesi. Això implicaria que Lsk1 és un regulador positiu del SIN.

També s'ha vist que la fosforilació de les Ser2 del CTD regula l'expressió de proteïnes involucrades en citocinesi: la proteïna d'interacció amb Clp1 Nsk1, la proteïna del SPB Cut12 i la mateixa Lsk1 (Saberianfar et al. 2011). També indueix l'expressió la proteïna d'interacció amb actina Aip1.

Això és consistent amb el fet que les soques amb *lsk1* deleccionat son incapaces de mantenir l'anell contràctil en presència de latrunculina (Karagiannis et al. 2005).

INTRODUCCIÓ

ANTECEDENTS



Antecedents

El nostre grup es centra en l'estudi dels mecanismes moleculars pels qual les CaMKs regulen el cicle cel·lular i la resposta a diferents tipus d'estrès. Entre altres, hem descrit el paper de *Srk1* com a substrat de *Sty1* en resposta a estrès osmòtic (López-Avilés et al. 2008), bloquejant l'entrada a mitosi a través de la inhibició de *Cdc25* (López-Avilés et al. 2005). Estudis preliminars van indicar que la *Srk1* podia tenir un funció en resposta a agents disruptors del citoesquelet com és la latrunculina.

La latrunculina és una família de toxines naturals produïda, entre altres, per esponges del gènere *Latrunculina*, d'on en deriva el nom (Anon n.d.; Coué et al. 1987). Aquesta droga s'uneix als monòmers d'actina i els bloqueja, evitant la seva polimerització. Degut al caràcter dinàmic del citoesquelet, aquest bloqueig resulta en el col·lapse del citoesquelet d'actina. Existeixen diversos tipus de latrunculina, però les més utilitzades son la latrunculina A (LatA) i la latrunculina B (LatB), de les quals es sap que la primera és més potent que la segona.

Tal com hem indicat, en estudis inicials es va observar que la deleció del gen *srk1* ($\Delta srk1$) provoca sensibilitat a concentracions de latrunculina que no afecten a la viabilitat dels *wild type* (WT) (Bimbó et al. 2005) (Fig. 18A).

Per aquest motiu es va voler establir el paper de *Srk1* en la resposta a estrès de citoesquelet. Per fer-ho, es va estudiar el citoesquelet de miosina de soques WT i soques $\Delta srk1$ exposades a concentracions de LatB no letals. Es va observar la formació correcta dels CAR com una anell situat a la zona medial de la cèl·lula que es contrau progressivament. Aquelles cèl·lules que presentaven anells contràctils amb una morfologia diferent a la descrita es qualificaven com a aberrants (Fig. 18B).

ANTECEDENTS

Es va veure que les cèl·lules WT entraven sense problema en mitosi: formen un anell contràctil als 105 minuts que es contrau als 150 minuts i resulta en dues cèl·lules filles als 210 minuts (Fig. 18B). Les soques $\Delta srk1$ també son capaces d'entrar en mitosi tot i estar exposades a LatB. En canvi, presenten dificultats en mantenir l'anell contràctil, el qual col·lapsa sense poder completar la citocinesi. En aquest cas es quantifica un augment dels anells aberrants que s'observen (Fig. 18C). Aquests resultats ens indicaven que *Srk1* podria tenir un paper en la estabilització i progressió de la citocinesi.

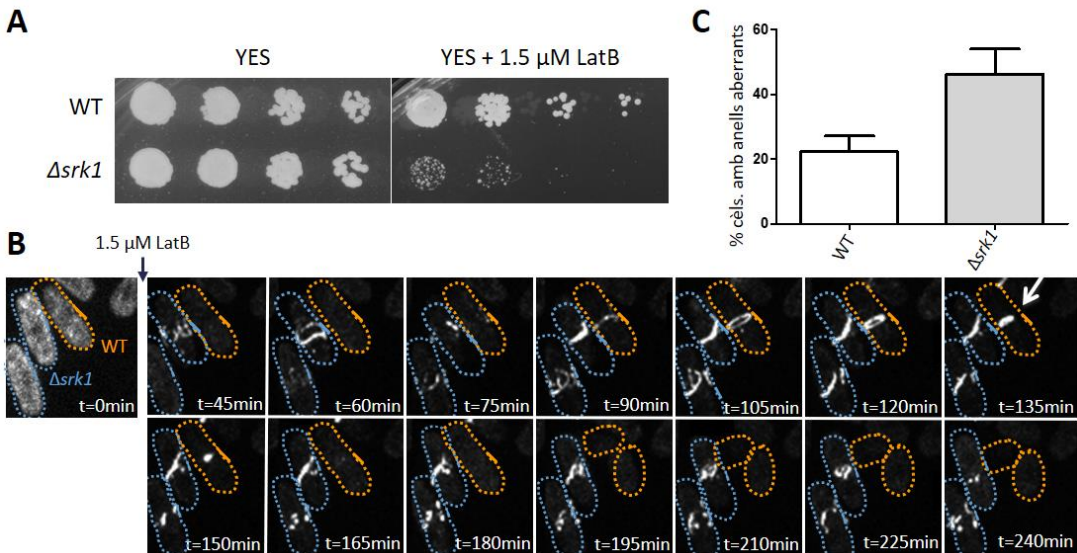


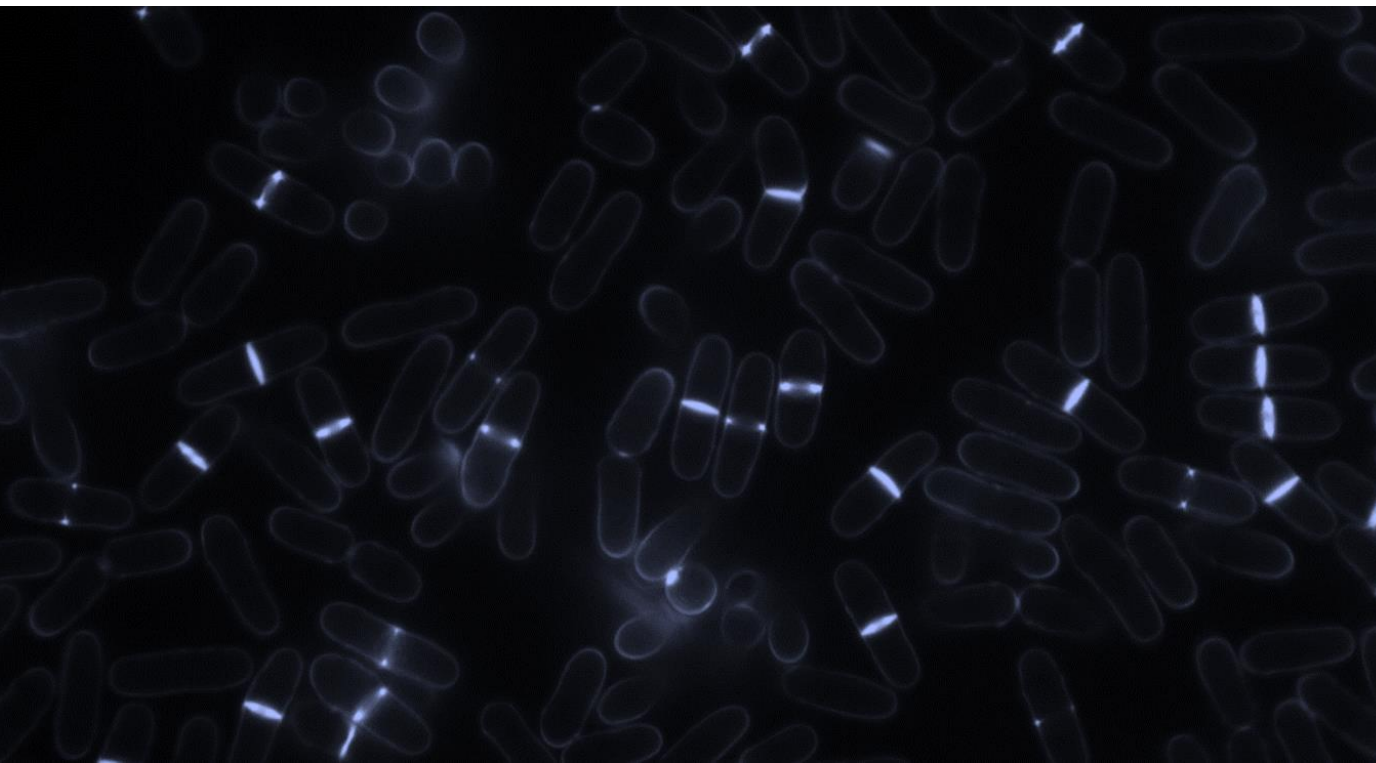
Figura 18. Antecedents.

(A) Dilució seriada de soques de *S. pombe* amb deleció de *srk1* en diferents concentracions de LatB.

(B) Captura en el temps d'una soca WT (taronja) i $\Delta srk1$ (blau) exposades a LatB amb la cadena lleugera de la miosina marcada amb fluorescència per monitoritzar la divisió cel·lular.

(C) Quantificació de les cèl·lules amb anells aberrants en una soca WT i $\Delta srk1$ exposades a LatB.

OBJECTIUS



Objectius

Per tal d'identificar i descriure el paper de Srk1 en resposta a pertorbacions del citosquelet, ens vam plantejar els següents objectius específics:

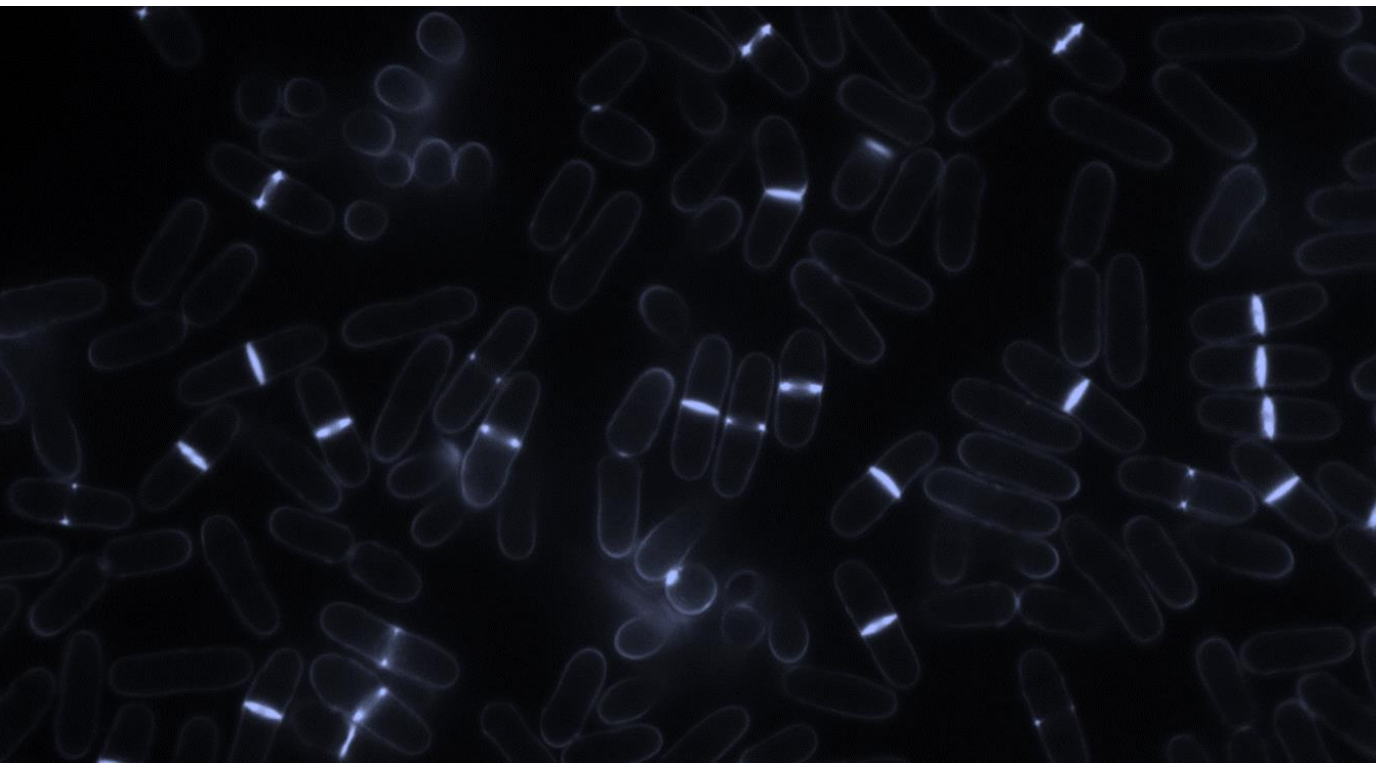
- 1- Activació de Srk1 en resposta a latrunculina.

- 2- Mecanisme d'acció de la Srk1 en resposta a LatB:
 - a. Proteïnes d'unió a Srk1: Lsk1.
 - b. Unió *in vivo* de Srk1 i Lsk1.
 - c. Proliferació de soques amb mutacions en *srk1* i *lsk1* en resposta a LatB.
 - d. Fosforilació de Lsk1 per Srk1.
 - e. Activació de Lsk1 en resposta a Srk1.

- 3- Regulació negativa de la via SAPK.

OBJECTIUS

MATERIALS I MÈTODES



Materials i mètodes

1. Cultius bacterians

Tècniques emprades per al manteniment i manipulació de soques bacterianes.

1.1. Soques utilitzades

DH5 α : Soca de *E. coli* usada àmpliament en clonatges, dissenyada per a l'amplificació de plasmidis.

BL21 Rosetta: Soca de *E. coli* usada àmpliament per a la sobre-expressió de proteïnes recombinants. Presenta resistència al cloramfenicol. La variant Rosetta està dissenyada per millorar l'expressió de proteïnes eucariotes amb codons que *E. coli* no acostuma a emprar.

1.2. Condicions de cultiu

Totes les soques de *E. coli* les hem cultivat en medi ric, LB. Als medis s'afegeix antibiòtic per seleccionar les colònies que ens interessin. Per seleccionar les soques que han incorporat un plasmidi enfront les que no, al medi s'afegeix ampicil·lina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el cas de treballar amb BL21, addicionalment es treballa amb cloramfenicol 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Els cultius es creixen a 37 $^{\circ}\text{C}$, i en cas de tractar-se de medi líquid, en agitació suau. Els cultius en fase de creixement exponencial es fan servir per crear *stocks*. Per fer-ho, es barreja 1.5 mL de cultiu amb 0.5 mL de glicerol al 60% en aigua i es congelen a -80 $^{\circ}\text{C}$.

LB: 1% triptona, 0.5% extracte de llevat; 1% NaCl; esterilitzat per autoclau (115 $^{\circ}\text{C}$ durant 15 minuts). Per a preparar medi sòlid, s'afegeix 1.5% d'agar al medi.

1.3. Transformació en bacteri

Tècnica emprada per incorporar plasmidis a les diferents soques de bacteris. Per fer-ho, primer s'han de preparar les bactèries competents. Això implica obtenir un cultiu en fase exponencial i, en fred, canviar el medi successivament a MgCl_2 100 mM i CaCl_2 100 mM. Aquestes cèl·lules es conserven a -80°C , de manera que abans cal fer un canvi de medi final a CaCl_2 85 mM, glicerol 15%.

En el moment de transformar el plasmidi desitjat, aquest s'incuba amb la suspensió cel·lular en gel durant 1 hora. Després d'un *heat shock* de 42°C durant 45 segons, la suspensió es fa créixer en un 1 mL de LB a 37°C . Finalment, el cultiu es concentra i es sembra en el medi adequat.

2.Cultius *S. pombe*

Tècniques emprades per al manteniment i manipulació de soques de *S. pombe*.

2.1.Soques utilitzades

Les soques utilitzades son modificacions genètiques de la soca *wild type* (WT) de *S. pombe* amb auxotròfies d'adenina (ade), leucina (leu) i uracil (ura), que poden presentar un dels dos sexes del llevat: h+ o h-.

Nom comú	Soca	Característiques	Origen
WT	<i>Wild type</i>	h- ade- leu- ura-	Stock de laboratori
$\Delta srk1$	<i>srk1::ura</i>	h+ leu-	Stock de laboratori
$\Delta sty1$	<i>sty1::kan</i>	h+ ade- leu- ura-	Stock de laboratori
$\Delta sty1 \Delta srk1$	<i>sty1::ura srk1::kan</i>	ade- leu-	Stock de laboratori
<i>srk1-HA</i>	<i>srk1-HA:kan</i>	h+ leu- ura-	Stock de laboratori
<i>srk1-TA</i>	<i>srk1-TA-HA:ura+</i>	h-	Stock de laboratori
<i>srk1-TD</i>	<i>srk1-TD-HA:ura+</i>	h-	Stock de laboratori
<i>srk1-KA</i>	<i>srk1-KA-HA:kan</i>	h- ade- leu- ura-	Stock de laboratori
$\Delta sty1 srk1-KA$	<i>sty1::ura+ srk1-KA-HA:kan</i>		Generat durant aquesta tesi
$\Delta lsk1$	<i>lsk1::hph</i>	h- leu- ura-	Generat durant aquesta tesi
$\Delta srk1 \Delta lsk1$	<i>srk1::ura lsk1::hph</i>	h- leu-	Generat durant aquesta tesi
$\Delta sty1 \Delta lsk1$	<i>sty1::kan lsk1::hph</i>	leu-	Generat durant aquesta tesi
$\Delta srk1 lsk1\text{-myc pREP1-}srk1$	<i>srk1::kan lsk1-13myc:hph pREP1-<i>srk1</i>-HA:leu+</i>		Generat durant aquesta tesi
$\Delta srk1 lsk1\text{-myc pREP1-}srk1\text{-KA}$	<i>srk1::kan lsk1-13myc:hph pREP1-<i>srk1</i>-KA-HA:leu+</i>		Generat durant aquesta tesi
WT pREP81- <i>wis1</i>	<i>Wild type pREP81-<i>wis1</i>-HA:leu+</i>	h- ade- ura-	Generat durant aquesta tesi
WT pREP1- <i>srk1</i>	<i>Wild type pREP1-<i>srk1</i>-HA:leu+</i>	h- ade- ura-	Generat durant aquesta tesi
$\Delta lsk1$ pREP1- <i>srk1</i>	<i>lsk1::hph pREP1-<i>srk1</i>-HA:leu+</i>	h- ura-	Generat durant aquesta tesi
$\Delta wis1$	<i>wis1::ura+</i>	h+ leu-	Stock de laboratori
$\Delta wis1 \Delta srk1$	<i>wis1::kan srk1::ura+</i>	h+	Stock de laboratori
<i>wis1-5A</i>	<i>wis1-5A-HA:kan</i>	h+ ura-	Stock de laboratori
<i>wis1-S463A</i>	<i>wis1-S463A-HA:ura+</i>	h- ade- leu-	Stock de laboratori
<i>sid2-250</i>	<i>sid2-250</i>	h- ura-	Stock de laboratori

Taula 1. Llistat de les soques emprades: nom comú amb la nomenclatura abreviada; soca amb el genotip associat; característiques de sexe i auxotròfies conegudes i origen de la soca.

Les deleccions dels diferents gens (Δgen) s'aconsegueixen substituint el gen endogen per diferents gens selectors: resistència a sulfat de G418 (kan), resistència a higromicina (hph) i prototròfia per uracil (ura+).

Les soques que em emprat en aquest treball s'indiquen el la Taula 1.

2.2. Condicions de cultiu

Les soques de *S. pombe* es cultiven en medi ric YES. Als medis podem afegir antibiòtic per seleccionar les colònies que ens interessin. Els antibiòtics que fem servir son sulfat de G418 o higromicina, ambdós a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En els casos en que volem fer servir alguna auxotròfia per seleccionar una soca concreta, fem servir medi mínim (MM). Aquest es pot complementar amb els mateixos aminoàcids que el YES, però se'n retira un en funció de si es vol seleccionar per auxotròfia per adenina (LUH), leucina (UHA) o uracil (LHA).

Els cultius es creixen a 25 o 32°C, i en cas de tractar-se de medi líquid, en agitació suau. Els cultius es mantenen sempre en fase exponencial. Per fer-ho, es mantenen a una densitat òptica inferior a 1 en una longitud d'ona de 595 nm ($OD_{\lambda=595\text{ nm}} < 1$). Per crear *stocks* es barreja 1 mL de cultiu amb 1 mL de glicerol al 60% en YES i es congelen a -80°C.

Els medis es suplementen amb latrunculina A (Abcam AB144290) o B (Sigma-Aldrich L5288 o Abcam AB144291) per testar l'efecte d'aquesta droga en els diferents mutants. Per als *spots assay*, es suplementa el medi sòlid encara calent amb latrunculina B 1.5 μM , 2 μM i 2.5 μM . Com a control positiu, es suplementa amb KCl 1 M.

YES: 0.5% extracte de llevat, 3% glucosa, 225 mg/L adenina (ade), histidina (his), leucina (leu), lisina (lys) i uracil (ura); esterilitzat per autoclau (115°C durant 15 minuts). Per a preparar medi sòlid, s'afegeix 1.5% d'agar al medi.

MM: 0.3% hidrogenftalat de potassi, 2% glucosa, 0.22% hidrogenfosfat de sodi, 0.5% clorur d'amoni, 225 mg/L lisina; esterilitzat per autoclau (115°C durant 15 minuts). Suplementat amb sals, vitamines i minerals. Per a preparar medi sòlid, s'afegeix 1.5% d'agar al medi.

2.3.Transformació en llevat

Tècnica emprada per incorporar DNA a les diferents soques de llevat. Per fer-ho, partim d'un cultiu de *S. pombe* exponencial. A continuació, es prepara la soca canviant el medi a sorbitol 1 M fred i es fan alíquotes per a cada condició. Finalment, s'incorpora el DNA a la mescla, s'electropora a 1500 V durant 5 ms i es sembra en plaques del medi adequat.

En aquest cas, es transforma DNA lineal per modificar el genoma de la soca (integració de DNA) o DNA plasmídic per sobre-expressar una proteïna, i els dos mètodes impliquen certes diferències.

2.3.1.Integració de DNA

Per estudiar el paper de *srk1* i *lsk1 in vivo*, generem diverses soques noves de *S. Pombe*. Per generar aquestes soques, s'han de generar els inserts que s'integraran al genoma del llevat (Bähler et al. 1998).

Els inserts s'obtenen per amplificació per PCR. Els oligonucleòtids incorporen les regions d'homologia amb el genoma de *S. pombe* que permetran la integració per recombinació homòloga. Els oligonucleòtids i motlles emprats per a les diferents soques generades en aquest treball es troben a la Taula 2. Els productes de PCR es corren en un gel d'agarosa, es purifiquen i es quantifiquen.

En aquest cas, les soques transformades amb el DNA lineal es sembren en medi ric per afavorir la integració del producte de la PCR. 24 hores després, es fa una rèplica en medi selectiu. Les colònies que aconseguixen créixer es repliquen 3 cops en YES i es sotmeten a una selecció final. Es comprova que els fragments

s'han integrat al lloc correcte per PCR amb oligonucleòtids que combinen el genoma de *S. pombe* i l'insert.

2.3.2. Sobre-expressió en llevat

Tècnica emprada per observar els efectes de l'expressió, amb diferents intensitats, d'una proteïna concreta en *S. Pombe*. Per fer-ho, incorporem plasmidis de sobre-expressió de proteïna en llevat amb el gen de la nostra proteïna d'interès.

pREP: Plasmidi dissenyat per sobre-expressar proteïnes en llevat mitjançant un promotor *nmt*, el qual s'inhibeix en presència de tiamina (B1), amb un gen de selecció *leu+*. La potència del promotor varia des d'una expressió màxima amb el Pnmt1 (pREP1) fins a una expressió més reduïda amb el Pnmt81 (pREP81). Degut a la característica episomal del nostre plasmidi, hem de mantenir el cultiu en medi selectiu constant, un MM sense leucina (UHA).

A l'hora d'obtenir mostres d'aquestes soques, s'obté una mostra inicial en medi amb B1 on no es sobre-expressa el nostre gen (ja sigui *srk1* o *srk1-KA*). A continuació es realitza un canvi de medi a UHA sense tiamina i es manté el cultiu exponencial durant 20 hores abans de recollir la mostra per a extracte proteic.

2.4. Creuament de soques

Tècnica emprada per combinar mutacions de dues soques diferents. Basada en la reproducció sexual de *S. pombe* i la recombinació meiòtica, es parteix de dues soques amb sexes oposats que contenen genotips que volem combinar (per exemple, els mutants simples de $\Delta sk1$ i $\Delta srk1$ per obtenir el doble mutant $\Delta srk1 \Delta sk1$). Aquestes es sembren una sobre l'altra en un medi restrictiu (SSA) que afavoreix la formació d'espores en 48 hores. Un cop aquestes es poden observar, s'inicia un tractament amb glusulasa al 0.5% durant 24 hores, seguida d'una exposició de 5 minuts a etanol 7%, i es sembren en medi ric. Un cop les espores

han germinat, es comprova el genotip de les colònies filles amb els medis de selecció adequats.

SSA: 1% dextrosa, 0.05% àcid aspàrtic, 0.2% dihidrogenfosfat de potassi, 0.02% hidrogenfosfat de sodi, 0.05% sulfat de magnesi heptahidratat, 0.01% clorur de calci dihidratat, 0.2% sulfat d'amoni, 4.2 mM hidròxid de sodi, 1.5% agar, 225 mg/L adenina (ade), histidina (his), leucina (leu), lisina (lys) i uracil (ura); esterilitzat per autoclau (115°C durant 15 minuts). Suplementat amb sals, vitamines i minerals. Per a preparar medi sòlid, s'afegeix 1.5% d'agar al medi.

2.5. "Spots assay"

Tècnica emprada per establir les diferències en la capacitat proliferativa entre soques de *S. pombe* en diferents condicions. Per fer-ho, cal un cultiu exponencial de cada una d'aquestes soques.

En una placa de 96 pous estèril, es prepara una columna amb els cultius a 0.4 ODs/mL ($\lambda=595$ nm). A continuació, es prepara un banc de dilucions (1/6) des de la primera columna. Un cop fet això, s'esterilitza el Replica Plater for 96 well plate (Sigma-Aldrich MW03301) i es fa servir per sembrar gotes iguals de cada una de les dilucions preparades en plaques amb les condicions que es volen estudiar. Les plaques s'incuben duran 7 dies i es prenen imatges cada 24 hores per fer un seguiment del creixement.

Per estudiar els efectes de la latrunculina B en la proliferació dels diferents mutants es fan servir concentracions de 1.5 μ M, 2 μ M i 2.5 μ M en YES. Degut a que el reactiu es prepara amb DMSO, es comprova que la concentració de DMSO equivalent a la major concentració de la droga no té cap efecte sobre cap dels mutants utilitzats.

3.Tècniques de manipulació de DNA

3.1.PCR

Tècnica emprada per amplificar fragments de DNA lineal seguint el protocol de la *i*-Taq™ DNA Polymerase (iNtRON 25022). Els productes de PCR es corren en un gel d'agarosa, es purifiquen i es quantifiquen.

Els fragments amplificats s'han generat amb dues finalitats: el clonatge o la integració en *S. pombe*.

3.1.1.Fragments per a clonatge.

Els inserts s'obtenen per amplificació per PCR fent servir oligonucleòtids que incorporen les dianes dels enzims de restricció. Els oligonucleòtids i motlles emprats per a les diferents soques generades en aquest treball es troben a la Taula 2.

Com a DNA motlle es fan servir uns plasmidis de sobre-expressió amb el cDNA de *lsk1* proporcionats pel Dr. Akira Yamashita per a les formes WT de la proteïna. Per a la forma mutada del fragment N-terminal de Lsk1, es fa servir un fragment de DNA dissenyat per nosaltres (Integrated DNA Technologies).

3.1.2.Fragments per a integració.

Els inserts s'obtenen per amplificació per PCR. Els oligonucleòtids incorporen les regions d'homologia del genoma del lloc en que volem realitzar la integració a cada extrem del fragment que volem integrar al genoma. Els oligonucleòtids i motlles emprats per a les diferents insercions generades en aquest treball es troben a la Taula 2.

Com a DNA motlle es fan servir els plasmidis que contenen el gen de selecció que substituirà el gen endogen per crear la delecció (pFa6a-hph-MX6) o el gen de l'epítot seguit d'un gen de selecció (pFa6a-13myc-hph-MX6). Aquests plasmidis

estan dissenyats específicament per poder realitzar deleccions o integracions d'epítops en *S. pombe*.

pFa6a-hph-MX6: Plasmidi dissenyat per deleccionar gens de llevat mitjançant el gen de resistència a higromicina (hph). Les regions d'homologia emprades es troben al 5'-UTR (*forward*) i al 3'UTR (*reverse*) del gen, permetent la substitució del gen endogen pel gen hph. Les soques que integren aquest gen es seleccionen en YES amb higromicina.

pFa6a-13myc-hph-MX6: Plasmidi dissenyat per incorporar l'epítop 13myc en gens de llevat, afegint el gen de resistència a higromicina. Les regions d'homologia emprades es troben al 3'-UTR (*forward* i *reverse*) del gen, permetent la integració dels gens de myc i hph a continuació del gen endogen. Les soques que integren aquest gen es seleccionen en YES amb higromicina.

Finalitat	Producte final	Insert amplificat	Primers emprats	Seqüència	Regió incorporada	Motlle emprat
Clonatge	Plasmidi pGEX- <i>Isk1</i> N-terminal	<i>Isk1</i> N-terminal	<i>Isk1 forward</i>	CGCGCGGAATTCATATGTCATACTCGAAGAGTACA ATTTATCGCCG	Diana EcoRI	pGEX- <i>Isk1</i> N-terminal Dr. Akira Yamashita
			<i>Isk1(N) reverse</i>	GCGCGCGCGGCCGCAAATAGGGGGAGGAGAAG ATGAAGGTCTCCGCG	Diana NotI	
Clonatge	Plasmidi pGEX- <i>Isk1</i> C-terminal	<i>Isk1</i> C-terminal	<i>Isk1(C) forward</i>	CGCGCGGAATTCATATGGTTCTAATATACTGA ATAACAATGGTG	Diana EcoRI	pGEX- <i>Isk1</i> C-terminal Dr. Akira Yamashita
			<i>Isk1 reverse</i>	GCGCGCGCGGCCGCATCTTTTAGATTTTCGTTTT TACTTTCCCATTCATGCC	Diana NotI	
Clonatge	Plasmidi pGEX- <i>Isk1</i> N9A	<i>Isk1</i> -N9A	<i>Isk1 forward</i>	CGCGCGGAATTCATATGTCATACTCGAAGAGTACA ATTTATCGCCG	Diana EcoRI	Fragment de Integrated DNA Technologies
			<i>Isk1(MUT) reverse</i>	GCGCGCGTGCACCTTATTCATGAGGGATAGAAGG	Diana Sall	
Inserció	Soca Δ <i>Isk1</i>	Gen de la higromicina	<i>Isk1 prom. forward</i>	TTAACGATTAATTTCTTTCTTTTATCCCATCGAAT TTTCGCTCACAGATTGCGTGAATCTCTTCATTGT TTAGGAA CGGATCCCGGGTTAATTAA	Homologia amb el 5'UTR de <i>Isk1</i>	pFa6a-hph-MX6
			<i>Isk1 term. reverse 1</i>	GCATCAGACAAATTTGTTACTCTGCCTAGTGTTAA CAAAATATAGAAAGATAGACCCGAGTAAAGCGA GACAAAGAAATGAATTCGAGCTGTTAAAC	Homologia amb el 3'UTR de <i>Isk1</i>	
Inserció	Soca <i>Isk1 tag</i>	Gen de l'epítop myc i la higromicina	<i>Isk1 term. forward</i>	GAAAAACATGCAAGGAAGTTGGCATGAATGGGA AAGTAAAAAACGAAAATCTAAAAGA CGGATCCCCGGTTAATTAA	Homologia amb el 3'UTR de <i>Isk1</i>	pFa6a-13myc-hph-MX6
			<i>Isk1 term. reverse 2</i>	GTCAAATAAACAGTGGAACATTAATTATCATGA GCTATTAGTTCTTATTCATCGAATTCGAGCTCG TTAAAC	Homologia amb el terminador de <i>Isk1</i>	

Taula 2. Taula amb les seqüències corresponents les PCRs que apareixen en aquesta tesi: finalitat de la PCR, producte que permet obtenir, fragment amplificat, primers emprats, seqüència, regió incorporada a l'insert i motlle de la PCR.

En taronja es troben les dianes de restricció (clonatge) i les regions d'homologia amb el motlle (inserció). Subratllat es troben les seqüències iniciadores i terminadores de la traducció.

3.2. Clonatge

Tècnica emprada per incorporar un insert en un plasmidi.

3.2.1. Plasmidis utilitzats

Els plasmidis es troben emmagatzemats en soques de bacteris DH5 α . Després d'obtenir un cultiu bacterià de mida apropiada (Cultius bacterians), es purifica el plasmidi amb el kit NucleoBond[®] Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel 740412.50).

pGEX-KG (ATCC[®] 77103[™]): Plasmidi bacterià dissenyat per expressió de proteïnes de fusió amb GST. Utilitza un gen de resistència a ampil·lina com a gen de selecció.

3.2.2. Digestió, lligació i selecció dels clonatges

Tant el plasmidi com els diferents inserts es digereixen amb els enzims de restricció corresponents: EcoRI (Thermo Fisher FD0274), NotI (Thermo Fisher FD0594) i Sall (Thermo Fisher FD0644). Els fragments de DNA es corren en un gel d'agarosa, es purifiquen i es quantifiquen. Finalment, es lliga el plasmidi amb els diferents inserts en una proporció 1:3 amb la T4 DNA Ligase (Invitrogen 15224-017).

Un cop obtingudes les lligacions, aquestes es transformen en bacteris DH5 α (Cultius bacterians) i es sembren en medi selectiu (amb ampil·lina). Les colònies que han incorporat el plasmidi es fan créixer i aquest es purifica amb el kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel 740588.50). La presència de l'insert en el plasmidi es confirma mitjançant PCR (com en la obtenció dels inserts) o per digestió (com en el clonatge), que es corren en un gel d'agarosa.

3.3. Electroforesi en gel d'agarosa

Tècnica basada en la mobilitat electroforètica del DNA dins d'un camp elèctric en gels d'agarosa (Hayward and Smith 1972). La mida similar de les bases

nitrogenades i la presència regular de grups fosfat a les cadenes de DNA confereixen una densitat de càrrega idèntica per totes les molècules de DNA. Això permet separar molècules de DNA lineal exclusivament en funció de la seva mida. Per tant, les mostres es preparen amb un colorant que permet observar com corre la mostra.

Les mostres es separen en gels d'agarosa 1% en tampó TAE amb una petita quantitat de GelRed (Biogen BT-41003), una molècula fluorescent quan s'exposa a llum ultraviolada (UV) que és capaç d'intercalar-se al DNA.

Per visualitzar com s'ha separat el DNA, es prenen imatges amb el Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad). En cas de voler purificar alguna banda, hem evitat aquest pas per reduir l'exposició del gel a radiació UV i les conseqüents mutacions. En aquest cas, hem observat el gel en un White/UV Transilluminator (UVP), protegint-lo amb el suport de polietilè, i hem tallat les bandes desitjades. Aquest és el cas dels productes de PCR i de les diferents digestions. El DNA s'ha purificat en aigua *DNAse free* amb el kit NucleoSpin® Gel and PCR-Clean-up (Macherey-Nagel 740609.50).

Per a determinar el pes molecular de les bandes observades es fa servir el marcador de pesos moleculars GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher SM0311).

TAE: 1.81% EDTA, 24.2% Tris, 5.7% àcid acètic.

3.4. Quantificació de DNA

Les mostres de DNA es quantifiquen amb el NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher).

3.5. Quantificació de la dotació genòmica de nuclis purificats

Tècnica emprada per estudiar la quantificació d'ADN de nuclis cel·lulars sense la interferència de la resta de components de la cèl·lula. Per fer-ho, fem servir el

MATERIALS I MÈTODES

protocol descrit a l'apartat 3.4 de l'article de Sabatinos i Forsburg (Sabatinos and Forsburg 2015).

Partim d'un cultiu de llevat en les condicions d'interès (Cultius *S. pombe*). Recollim les cèl·lules en etanol 70% i es conserven en fred. Es fa un rentat amb KCl 0.6 M, es resuspèn en la solució enzimàtica i s'incuba 1 hora a 37°C. Es canvia el medi per KCl 0.1 M i tritó 0.1% i s'incuba 5 minuts. Es fa un rentat amb PBS, es resuspèn en tampó de nuclis i s'incuba 16 hores a 37°C. Finalment, es sonica 5 segons amb una amplitud del 50% en Sonifier® Power Supply (BRANSON 100-412-194 REV. 01).

La quantitat de DNA continguda als nuclis es quantifica per *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) amb una tinció amb SYTOX™ Green nucleic acid stain (Invitrogen S7020).

Solució enzimàtica: 0.6 M KCl, 1 mg/mL enzims de lisis, 0.5 mg/mL zimoliasa, preparat al moment.

PBS: 8.5 g/L NaCl, 1 g/L hidrogenfosfat de sodi, 0.35 g/L dihidrogenfosfat de sodi.

Tampó de nuclis: PBS, 0.1 mg/mL RNAsa A.

4. Tècniques de manipulació de proteïna

4.1. Obtenció d'extractes proteics

Tècnica emprada per estudiar el contingut proteic de *S. pombe*. Per fer-ho, partim d'un cultiu de llevat en les condicions d'interès (Cultius *S. pombe*). Recollim les cèl·lules del cultiu en una membrana mitjançant una rampa de buit, i transferim la membrana ràpidament a un *Eppendorf* amb àcid tricloroacètic 20% (TCA) fred per fixar-les. A continuació es retira el TCA i es neutralitza amb trizma base 1 M. Els pellets es poden conservar a -80°C.

Per obtenir l'extracte proteic, es resuspèn el pellet en tampó de lisi. A continuació, les cèl·lules es sotmeten a una lisi física mitjançant *glass beads* (Sigma-Aldrich G8772) amb el Mini-Beadbeater-16 (Biospec Products). El sobrenedant s'obté per centrifugació i es quantifica el contingut proteic de la mostra mitjançant Lowry (Olson 2016).

Tampó de lisi: 67 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 1% ortovanadat, *Protease Inhibidor Cocktail* (PIC).

4.2. Immunoprecipitació (IP) de proteïnes

Tècnica emprada per separar una proteïna concreta (i aquelles proteïnes que hi interaccionen) d'un extracte mitjançant la unió a anticossos específics. Per fer-ho, partim d'un extracte proteic quantificat i fem servir dos tipus de tècniques en funció de l'epítot escollit.

En el cas de voler precipitar una proteïna endògena de *S. Pombe*, fem servir una soca que presenta l'epítot HA conjugat amb ella (Srk1-HA). Això ens permet fer servir el Pierce™ HA Epitope Tag Antibody Agarose conjugate (Thermo Fisher 26181), amb una proporció de 40 µL de *beads* per 1000 µg de proteïna. L'extracte

s'incuba 16 hores en agitació en fred amb les *beads*, que després de netejar-les, s'analitzen per WB.

En el cas de voler precipitar una proteïna amb alguna modificació o que no es pugui fer servir l'epítot HA, fem servir un anticòs primari específic contra l'epítot desitjat. Per exemple, un anticòs dirigit contra la forma fosforilada de Srk1 en Thr463 amb una proporció de 6 µL d'anticòs per 1000 µg de proteïna. L'extracte s'incuba 16 hores en agitació en fred amb els anticòs primaris i aquests es precipiten amb 30 µL de Pierce™ Protein A/G Agarose (Thermo Fisher 20422) durant 2 hores. Després de netejar-les, s'analitzen per WB.

4.3. Obtenció de proteïnes recombinants

Tècnica emprada per obtenir proteïnes purificades mitjançant un expressió en bacteri.

4.3.1. Expressió de proteïnes en bacteri

Un cop clonades les seqüències de les proteïnes d'interès en plasmidis de sobre-expressió de proteïnes recombinants (en el nostre cas, pGEX-KG), aquests es transformen en bacteris *E. coli* dissenyats per a la sobre-expressió d'aquest tipus de proteïna (BL21 Rosetta). Els cultius es creixen en LB amb ampicil·lina i cloramfenicol i la sobre-expressió s'indueix afegint IPTG 0.5 mM durant 4 hores. Finalment, les cèl·lules del cultiu es recullen per centrifugació (Tècniques de manipulació de DNA i Cultius bacterians).

4.3.2. Purificació de proteïnes recombinants

Per purificar les proteïnes expressades i fusionades a la proteïna GST, els pellets es resuspenen en 5 mL de NET-N amb inhibidors i es soniquen 5 segons amb una amplitud del 50% en Sonifier® Power Supply (BRANSON 100-412-194 REV. 01). Això es repeteix 5 cops (vigilant que la suspensió no s'escalfi) per

alliberar la proteïna a la fase soluble, que es separa de la insoluble per centrifugació.

A continuació, s'incuba la fracció soluble amb 500 µL de Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare 17-0756-01) durant 16 hores en agitació en fred. Després de netejar les *beads*, es recullen 3 eluïts de la proteïna purificada i es guarden les *beads* en el mateix buffer.

Per comprovar que la proteïna s'ha sobre-expressat i purificat correctament, es prenen mostres que es corren per SDS-PAGE i es visualitzen amb una tinció per Coomassie.

NET-N: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% igePAL.

Inhibidors: 1 mM PMSF, 1 µM aprotinina, 10 µM leupeptina, 10 µM ortovanadat.

Eluït 1: 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 30 mM glutatió-DTT durant 1 hora.

Eluït 2: 50 mM Tris-HCl, pH 9.6, 120 mM NaCl, 30 mM glutatió-DTT durant 1 hora.

Eluït 3: 50 mM Tris-HCl, pH 9.6, 120 mM NaCl, 40 mM glutatió-DTT durant 16 hores.

4.4. Assaig quinasa

Tècnica emprada per analitzar si una quinasa és capaç d'incorporar una modificació fosfat a una proteïna substrat concreta *in vitro*.

Per fer-ho, és necessari purificar les proteïnes d'interès. Per evitar possibles interaccions amb altres quinases de *S. pombe*, es purifiquen les proteïnes recombinants mitjançant l'expressió en bacteri.

A continuació, es prepara l'assaig amb les condicions òptimes per que es produeixi la fosforilació. L'assaig es realitza amb els següents components: tampó quinasa (Tris-HCl 2 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 0.5 mM), ATP 2.5 mM, 32P-gATP

juntament amb la quinasa i el substrat d'interès, en un volum final de 25 µL. La reacció s'incuba a 32°C durant 30 minuts i s'atura per adició de tampó de mostra per a electroforesi en SDS-PAGE. La fosforilació es comprova corrent les mostres en un SDS-PAGE. Aquest gel es tenyeix per Coomassie per comprovar la presència de les proteïnes. El patró de la radioactivitat és capturat per films fotogràfics (GE Healthcare 28906844) a diferents temps d'exposició i es revelen (AGFA CURIX 60).

També es pot realitzar l'assaig quinasa en fred, emprant sols ATP 2.5 mM. Això ho permet l'existència d'un anticòs que reconeix específicament el nostre substrat fosforilat. En aquest cas, comptem amb un anticòs contra els substrats d'AKT fosforilats (Cell Signaling 9614), el qual ens serveix perquè AKT i Srk1 comparteixen consens de fosforilació (RXXS/T). La fosforilació dels substrats es comprova per WB.

4.4.1. Proteïnes analitzades

La proteïna analitzada com a possible quinasa és Srk1, la qual fosforila serines i treonines precedides en dues posicions per arginina (RXXS/T).

La proteïna analitzada com a possible substrat és Lsk1 dividida en dos fragments: l'extrem N-terminal i l'extrem C-terminal.

```
GAATTCATATGTCATACTCGAAGAGTACAATTTATCGCCGACAAGGCGCAGAACCAAATAGCCACTTTCGG
CGTACCGTCGAAGAAAAGTCTCAGCTTTCTGGTACAAAATGAGGAGTCTTTAGGAGGCCACACCCTGTCCT
CTAATGCTTTCAAAAATAATTCATCTAGTATATCGCCATCCTCATCTGCGAAGGATCCTCGAGAACAGCGGA
AAAGAGCATTTCCTCTCAACGATACACATTCTCCCGAGCAAGACAGCATGAAAGACCTTTTCGTTCTCGA
AAATCTAGAAGGAGAAAGGGTAAAAAGGCATTCAGTCCTAGACCTGGCGCACCTCCATCACCTTCCTTTT
ACCGCTCAGGTGCTCAAAAACGAGCACGTAATTTAGCTGCCAAGGATTACTTTGCCAAACGCTCTGAAGC
CGCTTCTGCGCCTCCGTCTCACCTATATCACCGTCCGCAAACAGAAATGATGCAAAAAGGCAAGCTTCTT
CTTTTCGAAGGTCTCCGCTAGTTCTGTACATATGAAGCCTTCAGCTTTTAACGGTCTCGAAAAGGTATCGCGG
AGACCTGCAGCTTCTCTCCCCTATT CCTTCTATCCCTCATGAATAAGTCGAC
```

Figura 19. Seqüència del cDNA del fragment N-terminal de Lsk1 amb les mutacions que canvien els 9 llocs consens de fosforilació per Srk1 per alanines (taronja). Les dianes de restricció EcoRI (inici) i Sall (final) es troben marcades en blau; i les seqüències iniciadores i terminadores de la traducció, subratllades.

El fragment N-terminal també s'ha expressat amb mutacions que eliminen 9 llocs consens de fosforilació RXXS/T i els canvien per alanina. La seqüència emprada per aquesta purificació (Fig. 19) va ser encarregada a Integrated DNA Technologies.

4.5.SDS-PAGE

Tècnica descrita per Laemmli (Laemmli 1970) basada en la mobilitat electroforètica de les proteïnes dins d'un camp elèctric en gels desnaturalitzants. Per poder separar les proteïnes exclusivament en funció de la seva mida, és necessari abans homogeneïtzar la seva densitat de càrrega.

Per fer-ho, les proteïnes es mesclen amb un tampó de càrrega, els diferents components del qual permeten aquest fet. La presència de 2.5% SDS desnaturalitza les proteïnes i elimina la influència de la conformació en mobilitat electroforètica de les molècules. Alhora, s'uneix a les proteïnes i els confereix una densitat càrrega negativa equiparable en totes les molècules. La mescla final conté també tampó fosfat 10 mM (que contribueix a conferir càrrega negativa) i 0.05% DTT (que elimina els ponts disulfur i ajuda a desplegar-les). Finalment, un 10% de glicerol proporciona viscositat a la mostra, mentre que 1/80 part de blau de bromfenol permet veure la mobilitat del front. Per completar el procés que permet igualar la densitat de càrrega de les proteïnes, les mostres es bullen 5 minuts a 95°C.

Un cop preparades les mostres, aquestes es corren en un gel de poliacrilamida en tampó electròlit mitjançant un camp elèctric. Les proteïnes més petites seran capaces de travessar el gel més ràpid i presentaran una migració més ràpida, mentre que les proteïnes grans presentaran una mobilitat més lenta.

Per visualitzar com es separen les proteïnes, els gels es sotmeten a una tinció per Coomassie o es fan servir per a WB.

Per a determinar el pes molecular de les bandes observades es fan servir els marcadors de pesos moleculars Unstained Low Range (Bio-Rad 1610304), Precision Plus All Blue (Bio-Rad 161-0373) i/o Precision Plus Unstained (Bio-Rad 161-0363).

Tampó electròlit: 14.4% glicina, 3% tris, 1% SDS.

4.6. Western Blot

Tècnica emprada per analitzar la presència de proteïnes separades en un SDS-PAGE per immunodetecció sobre una membrana.

4.6.1. Transferència

Tècnica emprada per transferir proteïnes des de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una membrana de nitrocel·lulosa (Bio-Rad 162-0115) mantenint el patró de bandes obtingut en l'electroforesi.

Per fer-ho, es posa el gel en contacte amb la membrana i a cada banda es col·loca un Whatman™ (GE Healthcare 3030-917) xop de tampó de transferència per evitar que s'assequin i serveixi de medi per a generar el camp elèctric. El muntatge es submergeix en tampó de transferència i es sotmet a un camp elèctric per a que les proteïnes migrin del gel a la membrana.

L'electrotransferència es realitza a 70 V durant 90 minuts en fred, però el voltatge i el temps poden variar en funció de les proteïnes que vulguem analitzar. Per comprovar que la transferència ha tingut lloc de forma correcta, tenim la membrana amb Ponceau (Sigma-Aldrich P7170-1L).

Tampó de transferència: 14.4% glicina, 3% tris, 0.2% SDS, 20% etanol.

4.6.2. Immunodetecció

Tècnica emprada per detectar específicament proteïnes sobre una membrana. Per fer-ho, cal bloquejar les interaccions inespecífiques de la membrana amb

solució de bloqueig (llet o BSA al 5% en TBS-T). Els anticossos primaris es preparen en la mateixa solució de bloqueig a les concentracions adequades i s'incuben durant 16 hores en fred (excepte l'anticòs contra GST, que només necessita 1 hora a temperatura ambient). Els anticossos primaris emprats en aquest treball s'indiquen en la Taula 3. Un cop fet, es renten les membranes 3 cops amb TBS-T.

A continuació, s'incuben les membranes amb l'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient. Els anticossos secundaris emprats són contra ratolí (Bio-Rad 1706516) i contra conill (Bio-Rad 1706515) i es troben conjugats amb HRP. Es preparen en la mateixa solució que els anticossos primaris a les concentracions adequades. Finalment, les membranes es tornen a rentar 3 cops amb TBS-T i un cop amb TBS.

La HRP conjugada emetrà químicoluminescència en reaccionar amb el substrat EZ-ECL (Biological Industries 20-500-120) específicament als llocs d'unió dels anticossos a la membrana. El patró d'aquesta luminescència és capturat per films fotogràfics (AGFA EWPJH) a diferents temps d'exposició i es revelen (AGFA CURIX 60).

Epítip	Origen	Casa comercial	Referència	Bloqueig	Primari	Secundari
GST	Ratolí	Sigma-Aldrich	SAB4200237	Llet	1/10,000	1/10,000
HA	Ratolí	Sigma-Aldrich	12CA5	Llet	1/5,000	1/4,000
Myc	Ratolí	Thermo Fisher	46-0603	Llet	1/5,000	1/3,000
P-Akt substrate	Conill	Cell Signaling	9614	BSA	1/10,000	1/4,000
P-RNA polimerasa II	Conill	Sigma-Aldrich	PLA0128	BSA	1/10,000	1/4,000
PSTAIR (Cdk1/Cdc2)	Conill	Millipore	06-923	Llet	1/5,000	1/5,000
P-Sty1	Conill	Cell Signaling	9211	Llet	1/3,000	1/3,000

Taula 3. Llistat dels anticossos primaris emprats: epítip que reconeixen, origen de l'anticòs, casa comercial i referència, substància de bloqueig i dilucions dels anticossos primaris i secundaris emprades.

El patró de les bandes observat en revelar els films indica la presència i quantitat relativa de la proteïna que detecta el nostre anticòs, així com l'especificitat del mateix.

Solució de bloqueig: 5% llet o BSA en TBS-T, en funció de l'anticòs.

TBS: 2.4% Tris, 8.8% NaCl.

TBS-T: TBS suplementat amb 0.05% Tween (Sigma-Aldrich P1379-1L).

4.7. Tinció per Coomassie Blue

Tècnica emprada per tenyir proteïnes (De St. Groth, Webster, and Datyner 1963). El tint interacciona per forces electrostàtiques amb els grups amino i carboxil dels aminoàcids, tenyint així les proteïnes de color blau.

Els gels de poliacrilamida que venen d'una SDS-PAGE s'incuben amb la solució de Coomassie Blue durant 5 minuts i després es mantenen en destenyidor durant 16 hores. Per afavorir aquest procés, s'afegeix un tros de paper a la cubeta per a que absorbeixi l'excedent.

Per capturar el patró de la tinció, es prenen imatges amb el Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

Coomassie Blue: 0.24% Brilliant Blue G250, 45% metanol, 10% àcid acètic.

Destenyidor: 5% metanol, 7.5% àcid acètic.

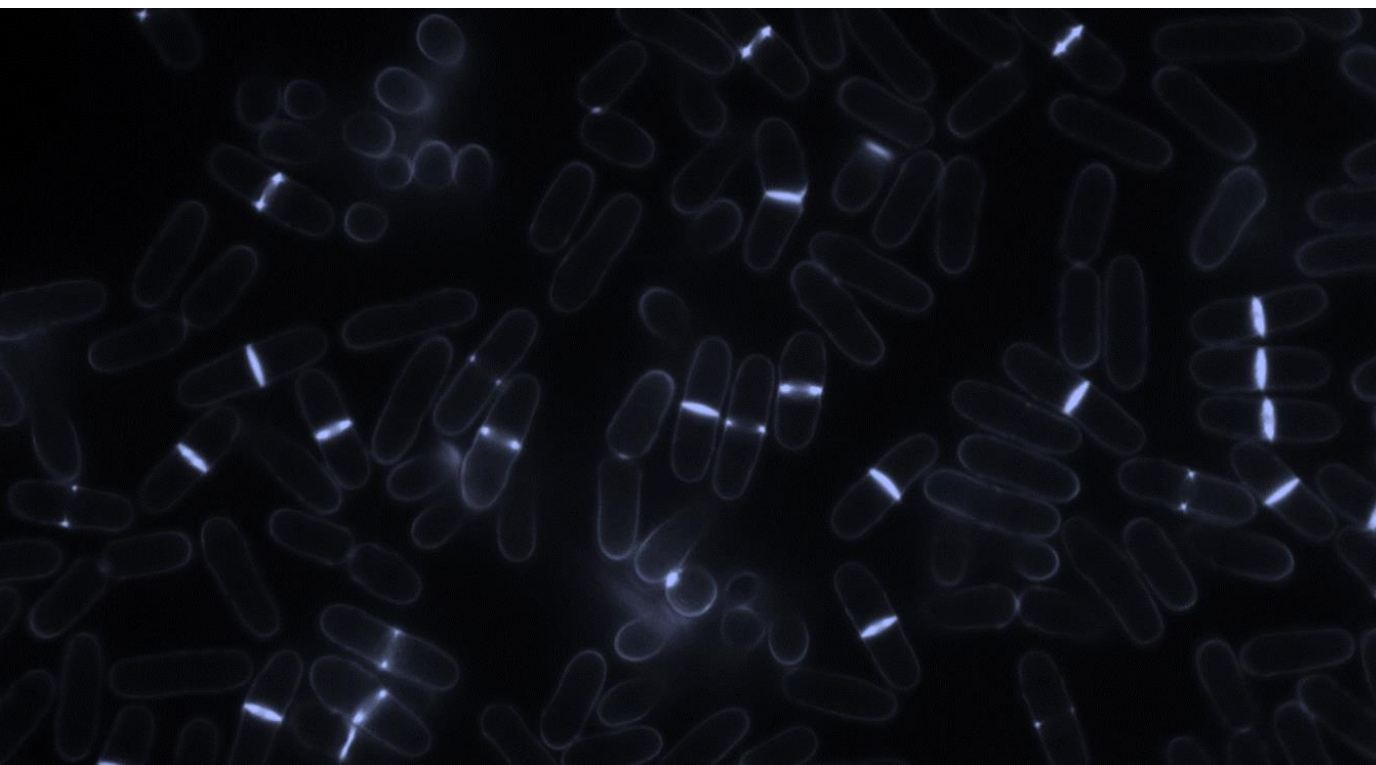
4.8. Mètode “*Tandem Affinity Purification*” (TAP)

Tècnica emprada per separar una proteïna concreta (i aquelles proteïnes que hi interaccionen) d'un extracte mitjançant la unió a anticossos específics. Per fer-ho, partim d'un extracte proteic en que la proteïna d'interès s'ha expressat recombinada amb, en ordre: un pèptid d'unió a calmodulina, un lloc de tall enzimàtic i la proteïna A (Puig et al. 2001).

Per purificar la proteïna d'interès, es fa una primera purificació mitjançant una columna amb Pierce™ Protein A/G Agarose (Thermo Fisher 20422). Després d'eliminar els contaminants, es realitza una digestió per alliberar la nostra proteïna i aquelles que s'hi uneixen.

L'eluit obtingut es sotmet a una segona purificació mitjançant una columna amb Calmodulin Affinity Resin (Stratagene 1-800-424-5444). Després d'eliminar els contaminants, s'elueixen les proteïnes retingudes amb EGTA i s'identifiquen al Servei de Proteòmica de la Facultat de Medicina.

RESULTATS



Resultats

1. Activació de Srk1 en resposta a latrunculina

Com hem explicat a Antecedents, en estudis inicials es va observar que la deleció del gen *srk1* ($\Delta srk1$) provoca sensibilitat a concentracions de latrunculina que no afecten a la viabilitat dels *wild type* (WT) (Fig. 18A). Es van analitzar també soques que presentaven diverses mutacions en el gen *srk1*.

Primer, es va analitzar la proliferació d'una soca que presenta la treonina 463 mutada a alanina, que vam anomenar *srk1-TA* (Fig. 20A). Aquesta soca no pot ser fosforilada i activada per Sty1, pel que Srk1-TA és inactiva.

També es va analitzar la proliferació d'una soca que presenta el centre catalític de Srk1 mutat, de manera que no pot unir l'ATP i és catalíticament inactiva. La vam anomenar *srk1-KA* (Fig. 20A).

Com en el cas de $\Delta srk1$, les soques descrites que no presenten activitat de Srk1 presenten sensibilitat a latrunculina. Això corrobora que tant la presència de Srk1 com la seva activitat són necessàries en la resposta a LatB (Fig. 20A).

Finalment, es va analitzar la proliferació d'una soca que presenta la treonina 463 mutada a àcid aspàrtic, que vam anomenar *srk1-TD* (Fig. 20A). Aquesta soca simula una fosforilació constitutiva per Sty1. Curiosament, aquesta presenta un fenotip similar a WT.

Ja que l'activitat de Srk1 és necessària per a la supervivència de les cèl·lules en presència de la droga, vam analitzar l'activació de Srk1. Es sap que Sty1 fosforila Srk1 a la treonina 463 en resposta a estrès osmòtic (López-Avilés et al. 2008). Per això es fa servir un cultiu exposat a KCl 1 M com a control positiu de l'activació de Srk1. Es va immunoprecipitar la Srk1 fosforilada en Thr463 amb un anticòs específic i es va detectar per WB en comparació amb la Srk1 total de l'extracte

RESULTATS

(Fig. 20B). Es va observar que la presència de latrunculina provoca un augment en la fosforilació de Srk1, equivalent a l'exposició a KCl.

Com ja hem explicat, la fosforilació de Srk1 es dona a través de Sty1 en resposta a estrès osmòtic (Fig. 14). El que es va observar, però, es que la soca $\Delta sty1$ no només no presentava sensibilitat a LatB, sinó que n'era resistent a la seva presència (Fig. 20A).

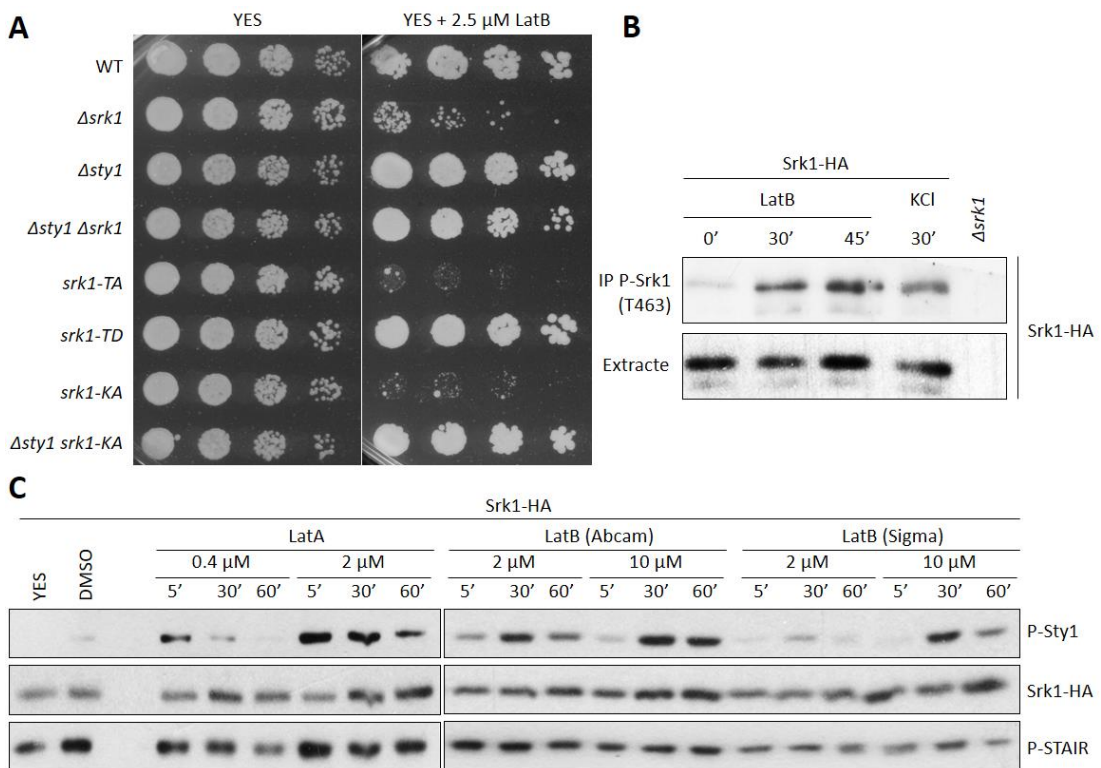


Figura 20. Activació de Srk1 en resposta a latrunculina.

(A) Dilució seriada de soques de *S. pombe* amb deleció de *srk1*, *sty1* i diferents dobles mutants; en diferents concentracions de LatB. També s'analitza una soca amb una mutació en *srk1* que no permet la fosforilació per Sty1 (*srk1-TA*); que simula una fosforilació constitutiva de Srk1 (*srk1-TD*); i que té el centre catalític de Srk1 inactiu (*srk1-KA*).

(B) Nivells de Srk1 en *S. pombe* WT exposat a LatB a diferents temps, on s'ha immunoprecipitat (IP) emprant un anticòs contra la Srk1 fosforilada en la posició 463. Srk1 total emprada com a control de càrrega.

(C) Nivells de Srk1 i P-Sty1 en *S. pombe* WT exposat a diferents concentracions de latrunculina A i B, i a diferents temps. P-STAIR emprat com a control de càrrega.

El fenotip de resistència que proporciona la deleció de *sty1* domina tant sobre el fenotip de $\Delta srk1$ com de *srk1-KA*. Això ens indica que malgrat estar Srk1 i Sty1 en la mateixa via, l'activitat de Sty1 és dominant.

Els fenotips oposats de les dues soques, però, ens va fer pensar inicialment que la resposta es podria donar a través d'una quinasa diferent de Sty1. És per això que vam decidir provar diferents tipus de latrunculina (LatA i LatB) de diferents cases comercials (Sigma-Aldrich i Abcam) a l'hora de comprovar si Sty1 es fosforilava davant aquest tipus d'estrès. Donat que la LatA és més potent que la LatB, el rang de concentracions utilitzat de la primera és més baix i va de 0.4 μM a 2 μM . De LatB es van utilitzar de dues cases comercials diferents, i el rang de concentracions emprat oscil·la entre els 2 i els 10 μM . Donat que la droga es dissol en DMSO, es va fer servir aquest com a control.

Es va analitzar una soca amb la Srk1 marcada amb l'epítol HA. Es va observar que la presència de latrunculina no afecta als nivells de Srk1, però sí que provoca una fosforilació de Sty1 que en la majoria de casos assoleix un màxim als 30 minuts (Fig. 20C).

Tot això demostra que la resposta a estrès per latrunculina es dona a través de la via Sty1/Srk1.

2. Mecanisme d'acció de la *Srk1* en resposta a LatB

La deleció de *srk1* provoca que aquesta soca presenti sensibilitat a latrunculina (Fig. 20A). Això ens indica que *S. pombe* respon a través d'aquesta quinasa a aquest tipus d'estrès.

S'ha descrit que *Srk1* fosforila i inhibeix *Cdc25* en resposta a estrès osmòtic (López-Avilés et al. 2005). Aquesta resposta evita l'entrada en mitosi en resposta a estrès i permet a la cèl·lula adaptar-s'hi. Malgrat això, hem observat que ni les soques WT ni les soques $\Delta srk1$ presenten problemes en l'entrada a mitosi (Fig. 18B), el contrari que en estrès osmòtic. Això ens suggereix que la resposta a estrès de citoesquelet d'actina es dona a través d'un substrat diferent.

Per establir quin pot ser aquest substrat, ens fixem en el fenotip que presenten les soques $\Delta srk1$ exposades a LatB. Hem observat que les soques $\Delta srk1$, a diferència de les WT, presenten dificultats en mantenir l'anell contràctil i en completar la citocinesi (Fig. 18B). Això ens suggereix que el substrat de *Srk1* a través del qual es dona aquesta resposta està involucrat en la sortida de mitosi

2.1. Proteïnes d'unió a *Srk1*: *Lsk1*

Per tal de descriure la funció de *Srk1* en resposta a LatB, ens vam plantejar identificar possibles nous substrats de *Srk1*. El nostre grup va realitzar un assaig de TAP. Aquest va proporcionar un llistat amb proteïnes de *S. pombe* amb capacitat d'unió a *Srk1 in vivo*, entre les que es van trobar proteïnes involucrades en la traducció, en la importació al nucli, regulació de la mitosi i en el control de metabolisme.

Dins d'aquest conjunt de proteïnes, ens va cridar l'atenció la quinasa *Lsk1* (*latrunculin sensitive kinase 1*, *Cdk12* en mamífer) ja que, com el seu nom indica, comparteix fenotip amb la nostra quinasa d'interès i, a més, té un paper relacionat amb la citocinesi (Viladevall et al. 2009).

Concretament, la soca amb una mutació en aquest gen presenta problemes en mantenir l'anell contràctil i completar la citocinesi (Karagiannis et al. 2005), com és el cas de la deleció de *srk1*. La fosforilació del seu substrat (el CTD de Rpb1), a més, s'ha relacionat amb l'expressió de gens de citocinesi (Saberianfar et al. 2011).

2.2.Unió *in vivo* de Srk1 i Lsk1

El primer pas va ser comprovar si Srk1 s'uneix a Lsk1, a través d'immunoprecipitació en aquest cas.

Per comprovar aquesta interacció es va transformar el plasmidi pREP1-*srk1* i pREP1-*srk1*-KA en la soca Δ *srk1* *lsk1*-myc. Es va sobre-expressar tant la forma activa com inactiva de Srk1 durant 20 hores i es va immunoprecipitar Srk1 amb *beads* conjugades amb anticòs anti-HA. Les mostres es van analitzar per WB, on es va analitzar la presència dels epítops HA (per Srk1) i myc (per Lsk1) amb anticossos específics.

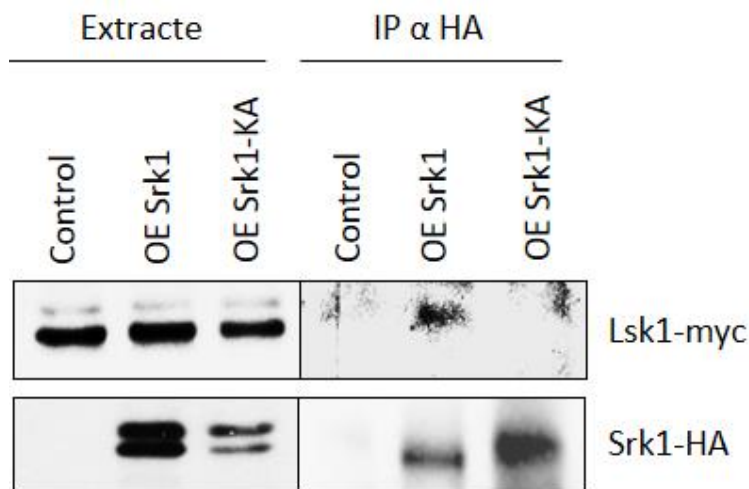


Figura 21. Nivells de Srk1 i Lsk1 (extracte) en soques de *S. pombe* que sobre-expressen (OE) les formes catalíticament activa (*srk1*) i inactiva (*srk1*-KA) de Srk1 i on s'ha immunoprecipitat Srk1 (IP α HA).

RESULTATS

L'anàlisi de l'extracte (Fig. 21) ens confirma que treballem amb una soca que conté Lsk1 marcada amb l'epítot myc, i que només allà on sobre-expressem *srk1*-HA s'observa aquesta proteïna. També comprovem que la IP és específica i només s'observa Srk1-HA allà on està sobre-expressada.

Els resultats mostren (Fig. 21, IP) que Lsk1 co-precipita amb Srk1, però només quan aquesta presenta un centre catalític actiu. Això ens indica que aquestes proteïnes interaccionen *in vivo*, però només quan Srk1 és capaç d'unir-se a ATP.

Un cop comprovada la interacció de Lsk1 i Srk1 vam analitzar la seva interacció gènica.

2.3.Proliferació de soques amb mutacions en *srk1* i *lsk1* en resposta a LatB

A continuació, vam voler comprovar la relació que té *lsk1* amb la via SAPK (Fig. 22).

Vam comprovar que la deleció de *lsk1* presenta una sensibilitat a la droga major que Δ *srk1*. Igualment, el fenotip de Δ *lsk1* domina sobre el fenotip de Δ *srk1* i, curiosament, també sobre Δ *sty1* en els dobles mutants (Fig. 22).

Això demostra que *lsk1* té un paper fonamental en la resposta a latrunculina. El fet que trobem Srk1 unit a Lsk1 podria indicar que Srk1 podria estar modulant alguna funció de Lsk1.

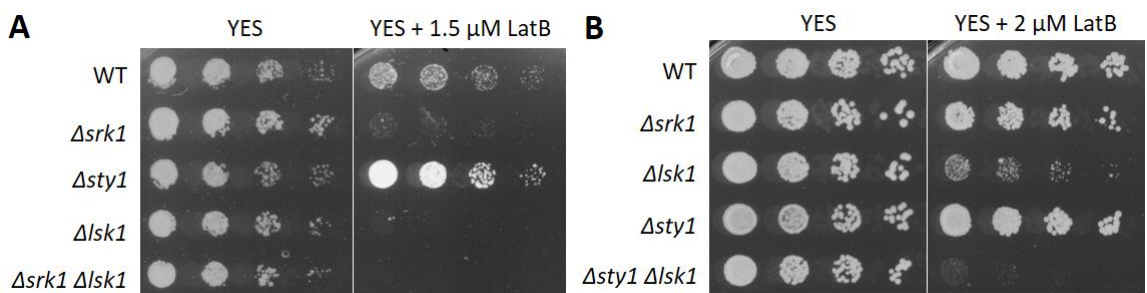


Figura 22. Dilució seriada de soques de *S. pombe* amb deleció de *srk1*, *sty1*, *lsk1* i diferents dobles mutants; en diferents concentracions de LatB.

En el cas de Sty1, observem que l'efecte positiu sobre la proliferació que provoca la pèrdua de *sty1* (observat com a resistència) és superat per l'efecte negatiu de la pèrdua de *lsk1*. Per aquest motiu, no sabem si aquestes quinases estan realment relacionades de forma lineal.

2.4.Fosforilació de Lsk1 per Srk1

La proteïna analitzada com a possible quinasa és Srk1, la qual fosforila serines i treonines precedides en dues posicions per arginina (RXXS/T).

La proteïna analitzada com a possible substrat és Lsk1. En aquesta proteïna hem trobat 11 llocs consens de fosforilació per Srk1, dels quals la majoria (9) es troben a l'extrem N-terminal. Per determinar en quin lloc Srk1 podria estar fosforilant a Lsk1 i degut a la distribució tan poc homogènia dels consens, es divideix la proteïna en dos fragments: un fragment N-terminal i un fragment C-terminal (Fig. 23).

Així, per analitzar si Lsk1 pot ser fosforilada per Srk1, es va realitzar un assaig de fosforilació *in vitro* obtenint la Srk1 i els fragments N-terminal i C-terminal de la Lsk1 mitjançant purificació de proteïnes recombinants expressades en bacteri.

Es va observar que Srk1 és capaç de fosforilar Lsk1 en el seu extrem N-terminal (Fig. 24), confirmant que n'és substrat.

```

MSYSKSTIYRRQGTEPNSHFRRTVEEKSQLSGTNEESLGGHTLSSNAFKNNSSSISPSSSAKDPREQRKRTFPL
NDTHSSRARQHERPFRSRKSRRRKGGKKAFSPRPGSPPSPSFYRSGSQKRARNLITKDYFAKRSESSSASVSPIS
PSANRNDSKRQASSFRSPPSSVHMKPSAFNGRKVSRRPSSSPPPIPSIPHETTSDDTQKKSSVSSGFENKHG
KFFHIPNERRSRFDQPPSKRMALTSTARESVAPLPSPPSGPIYTYTPKPAYEKIDQIGEGTYGKVKAINTVT
GDLVALKRIRLEQEKDGFPITTVREVKILQRLRHKNIVRLLEIMVEKSSVYMVFEYMDHDLTGVLLNSQLHFTPG
NIKHLSKQIFEALAYLHHRGVLHRDIKGSNILLNNNGDLKFADFGLARFNTSSKSANYTNRVITLWFRPPELLLG
ETAYDTAVDIWSAGCIVMELFTGKPPFQGRDEISQLEVIYDMMGTPDVHSWPVKNLPWYELLKPVEEKKSR
FVETFKEILSPAAILCQKLLALNPFCRPSAHETLMHEYFTSESPPPEAVILKNMQGSWHEWESKKRRKSKR

```

Figura 23. Seqüència proteica de Lsk1 amb els fragments N-terminal (blau) i C-terminal (groc) marcats. Les serines i treonines que es troben en el consens de fosforilació de Srk1 es troben marcades en taronja.

RESULTATS

Un cop confirmat que la diana de fosforilació de Lsk1 per Srk1 es trobava a l'extrem N-terminal del substrat, es va purificar aquest fragment de nou, però amb els 9 llocs consens de fosforilació (RXXS/T) mutats per alanines, impeditint la seva fosforilació. Aquesta fragment es va anomenar Lsk1-N9A (Fig. 23).

En aquest cas, l'assaig es va analitzar per WB. Els nivells de proteïna es van comprovar amb l'epítip emprat per purificar les proteïnes, GST. Donat que el consens de fosforilació de Srk1 és el mateix que el d'AKT, es va fer servir un anticòs dissenyat contra les dianes d'AKT fosforilades.

Els resultats mostren que la fosforilació en l'extrem N-terminal (Fig. 24) desapareix en la forma mutada (Fig. 25). Això ens indica que la diana de Srk1 és algun d'aquests llocs mutats.

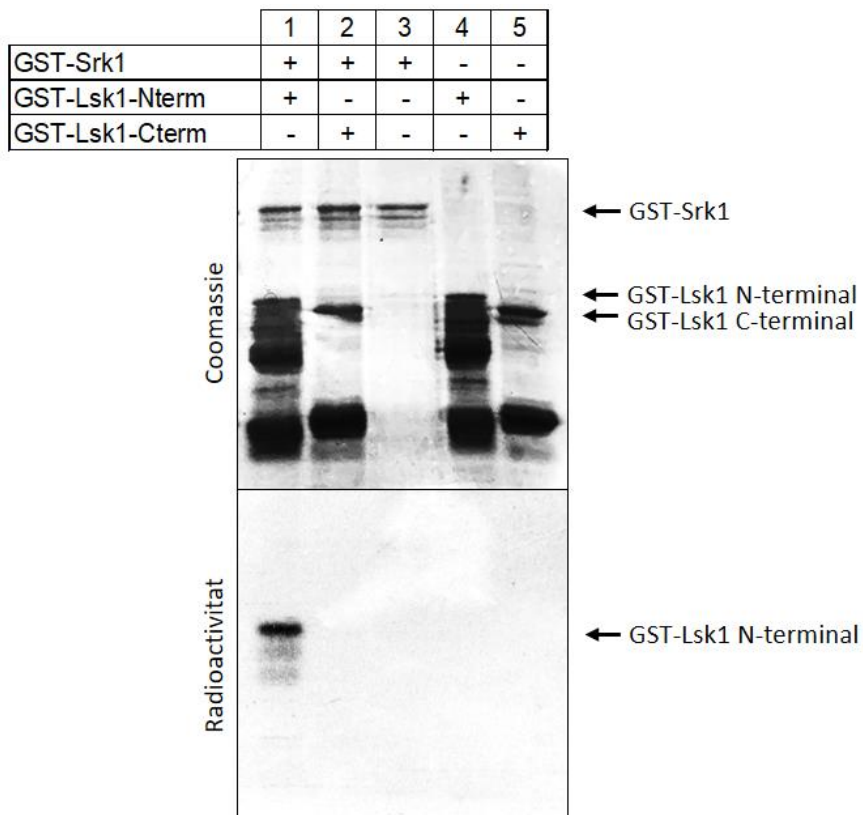


Figura 24. Nivells de Srk1 i dels fragments de Lsk1 (Coomassie) i de radioactivitat en un assaig quinasa *in vitro*.

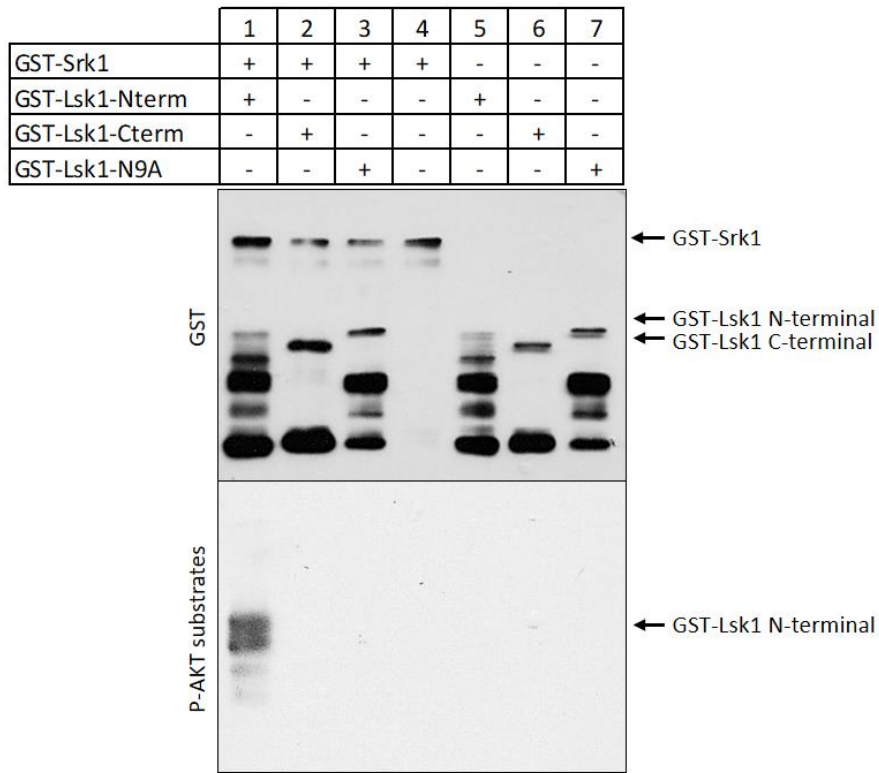


Figura 25. Nivells de Srk1 i dels fragments de Lsk1 (GST) i de substrats de AKT fosforilats (amb el mateix consens de fosforilació de Srk1) en un assaig quinasa *in vitro*.

2.5. Activació de Lsk1 en resposta a Srk1

Sabem que Lsk1 és homòloga de Cdk12 i fosforila el CTD de la RNA-polimerasa II, la proteïna Rpb1 de *S. pombe* (Karagiannis and Balasubramanian 2007). Per tant, en el cas de que Srk1 fosforili i activi Lsk1, aquesta activació es pot monitoritzar amb la fosforilació de la RNA-polimerasa II en el residu de Ser2 del CTD.

Per analitzar aquesta relació, vam sobre-expressar la Srk1 en cèl·lules WT i en cèl·lules que presentaven la deleció de *lsk1*.

Aquesta sobre-expressió es va aconseguir transformant el plasmidi pREP1-*srk1* en la soca WT i la soca Δ *lsk1* i es va induir la sobre-expressió de la forma activa de Srk1 durant 14 i 18 hores. Les mostres es van analitzar per WB, on es va

RESULTATS

analitzar la presència de l'epítot HA (per *Srk1*) i la forma fosforilada de RNA-polimerasa II amb anticossos específics de la Ser2.

Els resultats (Fig. 26) mostren que en el moment en que l'augment de *Srk1* actiu és suficient com per poder ser detectada, la RNA-polimerasa II es fosforila, però només en aquella soca que conté *lsk1*. Això demostra que *Srk1* provoca la fosforilació de la RNA-polimerasa II a través de *Lsk1*.

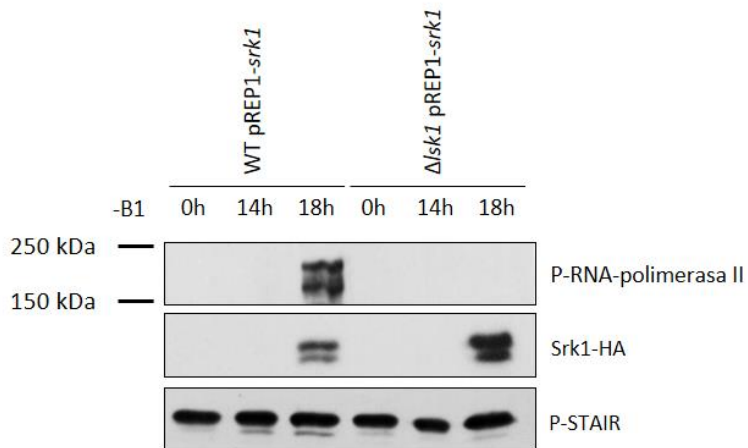


Figura 26. Nivells de P-RNA-polimerasa II i *Srk1* en soques de *S. pombe* que sobre-expressen *Srk1*. P-STAIR emprat com a control de càrrega.

3.Regulació negativa de la via SAPK

Tal com hem indicat anteriorment, la deleció de la MAPK Sty1 provoca resistència a la LatB.

Per tal d'analitzar i corroborar si la deleció dels components superiors de la via es comporten igual que la deleció de *sty1* en presència de LatB, vam realitzar un assaig de proliferació en dilucions del la soca amb deleció de la MAPKK *wis1*. Així, vam poder comprovar que soca $\Delta wis1$ és resistent a la presència de latrunculina, com és el cas de $\Delta sty1$ (Fig. 27A).

En resposta a estrès osmòtic, la MAPKK Wis1 s'activa per fosforilació, com li passa a Sty1. Un cop es respon a l'estrès, la fosforilació de Sty1 disminueix, però Wis1 es manté fosforilada. En estudis anteriors del grup es va estudiar la possibilitat de que Srk1 regulés negativament Wis1, fosforilant-la en resposta a estrès osmòtic.

Per aquest motiu, es van mutar a alanina el residu de fosforilació consens per Srk1 (RXXS/T) en el gen *wis1* endogen. Aquesta soca es va anomenar *wis1-5A* (Fig. 27B). Quan es va analitzar aquesta soca en resposta a estrès osmòtic, però, no es va veure cap diferència en el patró d'activació de la MAPK Sty1 (Fig. 27C).

Malgrat aquests resultats en estrès osmòtic, ens vam plantejar analitzar aquest mutant, *wis1-5A*, en la resposta a LatB.

D'altra banda, també es va analitzar un mutant de Wis1 que presenta la serina 463 mutada a alanina (*wis1-S463A*) i que hem descrit en el nostre grup com un lloc de fosforilació negativa de Wis1 (Resultats no publicats). El mutant *wis1-S463A* manté la via de les MAPK hiperactiva (Fig. 27D) i és sensible a estrès osmòtic (Fig. 27E). Aquesta posició està conservada en mamífer (Gopalbhai et al. 2003) (Fig. 27F) i, igual que en *S. pombe*, no correspon a cap consens de fosforilació conegut ni es sap quina quinasa fosforila aquest residu.

RESULTATS

Es van analitzar aquests dos mutants *wis1-5A* i *wis1-S463A* en resposta a LatB. Tal i com s'esperava, el mutant *wis1-S463A* no presenta resistència a LatB (Fig. 27A). La inhibició de la via per $\Delta wis1$ provoca resistència a LatB, pel que mantenir la via hiperactiva amb la mutació del lloc de fosforilació per inhibir Wis1 (*wis1-S463A*) té la conseqüència inversa.

Sorprenentment, el mutant *wis1-5A* és molt sensible a LatB (Fig. 27A), indicant que la fosforilació en aquests 5 residus podria estar inhibint la via en resposta a LatB. Per aquest motiu, a continuació vam estudiar el nivell d'activació de la via a través de la fosforilació de Sty1. Vam observar que el nivell de fosforilació de Sty1 és més alt en les cèl·lules *wis1-5A* que en les cèl·lules WT (Fig. 27G).

Com ja hem dit, el mutant *wis1-5A* presenta els residus de S/T del consens de fosforilació RXXS/T mutats a alanina. Com van descartar que Srk1 tingués un paper en la fosforilació de Wis1 (Fig. 27C), es va estudiar quines quinases amb una funció relacionada amb la citocinesi comparteixen aquest consens de fosforilació.

Una de les quinases que respon a aquestes característiques és la quinasa Sid2. Com ja hem explicat, aquesta és una quinasa del SIN que col·labora en l'assemblatge (Bohnert et al. 2013) i contracció del CAR i la formació del septe (Sparks et al. 1999).

El gen *sid2* és un gen essencial, de manera que per estudiar els efectes de la seva deleció hem de treballar amb un mutant termosensible, *sid2-250*. En analitzar el nivell d'activació de Sty1 en aquest mutant, vam observar que la Sty1 està més activada que en el WT, igual que en el mutant *wis1-5A* (Fig. 27E).

Això suggereix que Sid2 podria estar regulant negativament la via SAPK a través de la fosforilació de Wis1 en algun dels 5 llocs consens mutats.

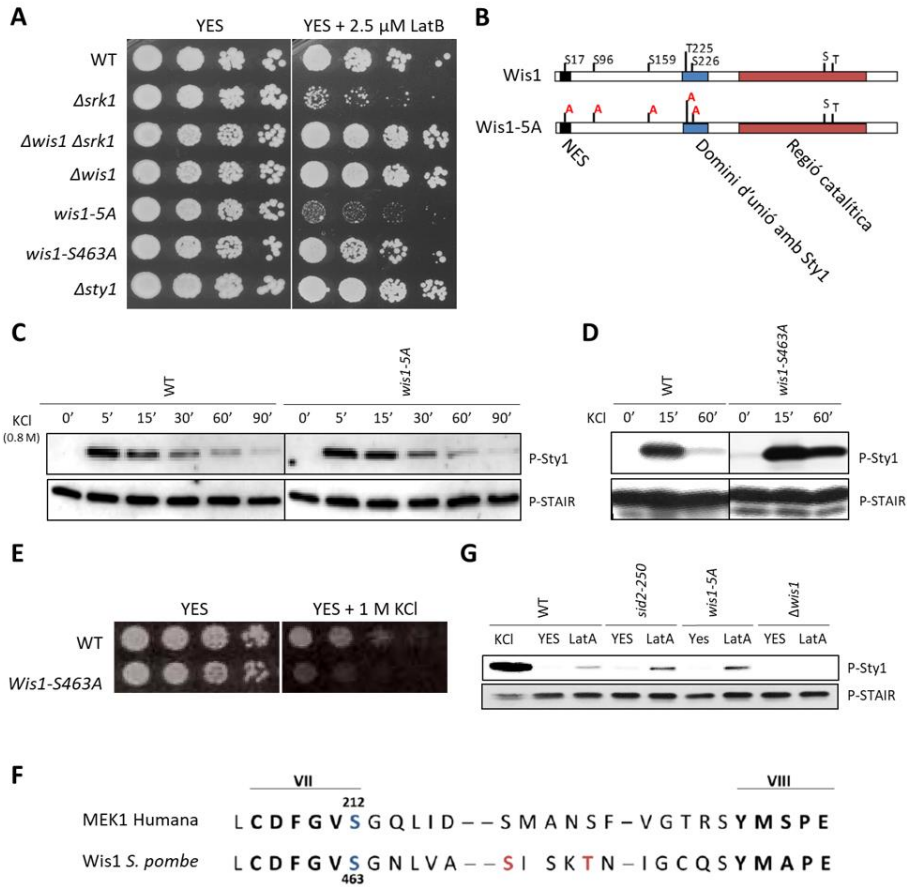


Figura 27. Regulació negativa de la via SAPK.

(A) Dilució seriada de soques de *S. pombe* amb deleció de *srk1*, *sty1*, *wis1* i diferents dobles mutants; en 2.5 μ M LatB. També s'analitza una soca amb una mutació en *wis1* que elimina 5 llocs consens de fosforilació per AKT (*wis1-5A*); i que té el lloc d'inhibició per fosforilació mutat a alanina (*wis1-S463A*).

(B) Localització dels llocs consens de fosforilació de *Srk1* en *Wis1* mutats a alanines per formar la soca *wis1-5A*.

(C) Nivells de P-Sty1 en diferents soques de *S. pombe* exposades a KCl 0.8 M a diferents temps. P-STAIR emprat com a control de càrrega.

(D) Nivells de P-Sty1 en diferents soques de *S. pombe* exposades a KCl a diferents temps. P-STAIR emprat com a control de càrrega.

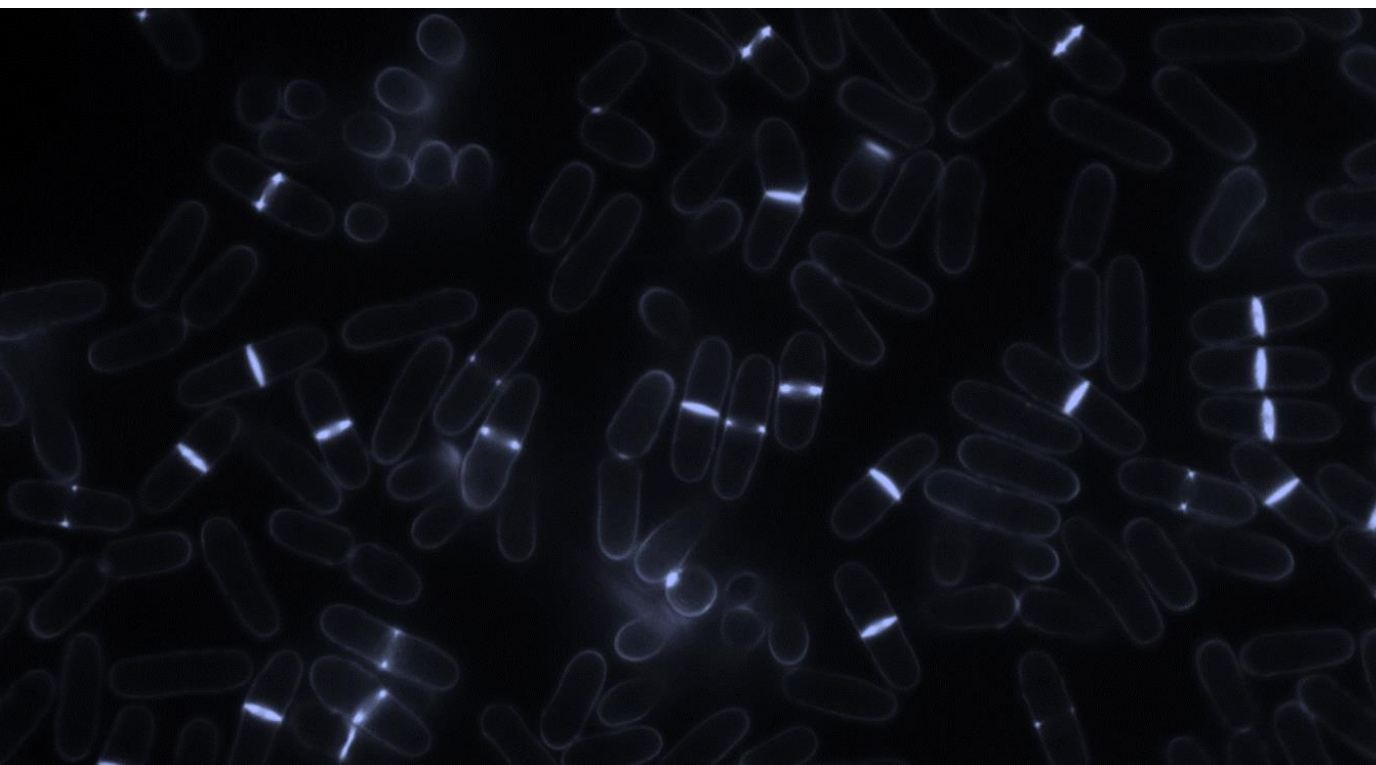
(E) Dilució seriada de soques de *S. pombe* WT i el mutant *wis1-S463A*; en 1 M KCl.

(F) Comparació de la seqüència de MEK1 (humana) i *Wis1* (*S. Pombe*) on s'observa que el lloc de fosforilació S212 de la quinasa humana es troba conservat en el lloc S463 de la de llevat.

(G) Nivells de P-Sty1 en diferents soques de *S. pombe* exposades a LatA 2 μ M durant 60 minuts. P-STAIR emprat com a control de càrrega.

RESULTATS

DISCUSSION



Discussió

1. Activació de la via SAPK en resposta a latrunculina

La via de les SAPK és la responsable de la resposta i adaptació a un gran nombre d'estressos (Ho and Gasch 2015). Actua a través de Sty1, homòloga de la MAPK p38 de mamífer. S'ha descrit que la quinasa *Srk1* està relacionada amb aquesta via, ja que la seva expressió s'indueix en resposta a estrès a través de Sty1 (Smith et al. 2002). També es sap que en condicions basals, Sty1 es troba unida a *Srk1*, i en resposta a estrès osmòtic, aquestes es separen i *Srk1* atura el cicle cel·lular a través de *Cdc25* (López-Avilés et al. 2005, 2008).

En aquest treball plantegem un paper per a *Srk1* i la via de les SAPK en l'adaptació a un estrès de citoesquelet provocat per latrunculina. En estudis inicials (Fig. 18A) es va observar que la deleció del gen *srk1* ($\Delta srk1$) provoca sensibilitat a concentracions de LatB que no afecten a la viabilitat dels *wild type* (WT) (Bimbó et al. 2005). En treballs anteriors del grup es va identificar el lloc de fosforilació de *Srk1*, de manera que es sap que Sty1 fosforila *Srk1* en la treonina 463 en resposta a estrès osmòtic (López-Avilés et al. 2008).

El mutant que canvia aquest residu per una alanina i que, per tant, no pot ser fosforilat i activat (*srk1-TA*), presenta una sensibilitat similar a la deleció de *srk1* (Fig. 20A). Succeeix el mateix per a la soca que presenta una mutació que no permet la unió d'ATP al centre catalític (*srk1-KA*) i que, per tant, és inactiva. Això ens suggereix que *Srk1* forma part del mecanisme de resposta a LatB en *S. pombe*, i que la seva activitat quinasa és necessària per realitzar la seva funció.

L'activació tant de *Srk1* com de Sty1 està relacionada amb una fosforilació de les mateixes. Per tant, si la via SAPK es troba activa, aquestes dues quinases hauran de trobar-se fosforilades. L'exposició de *S. pombe* a diferents tipus de latrunculina provoca una fosforilació de Sty1 (Fig. 20C). Aquesta fosforilació

DISCUSSIÓ

també s'observa per a *Srk1* (Fig. 20B). Això confirma que la via SAPK es troba activa en resposta a estrès de citoesquelet d'actina.

És interessant destacar, aleshores, que tot i tenir una relació lineal, les quinases *Srk1* i *Sty1* tenen papers oposats en aquesta resposta, ja que la deleció de *srk1* provoca sensibilitat a la droga i la soca Δ *sty1* és resistent a la presència d'aquesta droga. El mutant que presenta tant el gen *sty1* com el *srk1* deleccionats també presenta resistència a la presència de la latrunculina. El fet de que predomini el fenotip de Δ *sty1* confirma que ambdues quinases es troben dins de la mateixa via en aquesta resposta i és consistent amb la dominància de *Sty1* sobre *Srk1* dins de la mateixa.

Aquestes observacions es poden explicar amb estudis recents que estableixen una relació funcional entre la GTPasa *Cdc42* i la MAPK *Sty1*. *Cdc42* es localitza als extrems de la cèl·lula en *S. pombe* i coordina el creixement bipolar. El tractament de les cèl·lules amb LatA provoca la deslocalització d'aquesta proteïna i atura el creixement cel·lular. *Sty1* és la responsable d'aquesta deslocalització, de manera que la manca de la MAPK evita que *Cdc42* es dispersi (Mutavchiev, Leda, and Sawin 2016). D'aquesta manera, *Cdc42* continua promovent el creixement cel·lular malgrat la presència de latrunculina, el que es tradueix en la resistència que nosaltres hem observat.

Aquest treball continua els estudis previs del grup sobre la *Srk1* i es centra en el seu paper en la resposta a la latrunculina.

2. Mecanisme d'acció de la *Srk1* en resposta a *LatB*

La latrunculina és una droga que s'uneix als monòmers d'actina i els bloqueja, evitant la seva polimerització. Degut al caràcter dinàmic del citoesquelet, aquest bloqueig resulta en el col·lapse del citoesquelet d'actina. Per elucidar el paper de *Srk1* en la resposta a latrunculina, es va fer servir un anàlisi de microscòpia per observar la dinàmica del citoesquelet de miosina.

Es va veure que tant les cèl·lules WT com les soques $\Delta srk1$ no presentaven cap problema en l'entrada a mitosi un cop els cultius s'exposen a latrunculina. Les soques $\Delta srk1$, a diferència de les WT, presenten dificultats en mantenir l'anell contràctil en presència de la droga, el qual col·lapsa sense poder completar la citocinesi (Fig. 18B i C). Això indica que *Srk1* és necessària per completar la citocinesi.

L'únic substrat conegut de *Srk1* és *Cdc25* (López-Avilés et al. 2008). Sabent que el paper de *Cdc25* controla l'entrada en mitosi, aquest fet sembla indicar que *Srk1* està actuant a través d'un altre substrat involucrat en la sortida de mitosi. Donat que un substrat de *Srk1* ha de ser capaç d'unir-se a ella *in vivo*, es va realitzar un assaig TAP per tal d'identificar proteïnes amb afinitat amb la quinasa. Entre les proteïnes que es van obtenir de l'anàlisi, l'estudi es va centrar en els candidats involucrats en mitosi i, més concretament, en la citocinesi.

És per això que es va començar a estudiar la *Lsk1*. Aquesta homòloga de *Cdk12* de mamífer presenta diverses característiques en la seva funció que la relacionen amb *Srk1*. Per començar, la seva deleció presenta sensibilitat a la presència de latrunculina (Bimbó et al. 2005). De la mateixa manera, dins el seu paper de la regulació de la RNA-polimerasa II es troba la coordinació d'esdeveniments del final de la divisió cel·lular (Viladevall et al. 2009). Concretament, igual que en el cas de *srk1*, la deleció de *lsk1* implica una inestabilitat en el CAR que impedeix la compleció de la citocinesi (Karagiannis et al. 2005). Finalment, estudis previs

DISCUSSIÓ

relacionen l'activació de la via SAPK amb una fosforilació de Lsk1 en el seu extrem N-terminal (Sukegawa, Yamashita, and Yamamoto 2011).

Totes aquestes evidències ens porten a la hipòtesi de que Srk1 té com a substrat Lsk1 en resposta a un estrès de citoesquelet.

Per començar, s'ha de comprovar la unió de Srk1 i Lsk1 mitjançant una altra tècnica. Per verificar que aquesta unió observada en el TAP realment es produeix, s'ha immunoprecipitat Srk1 en soques de *S. pombe* que sobre-exprimen les formes activa (*srk1*) i inactiva (*srk1-KA*) de Srk1 (Fig. 21). S'ha confirmat que Lsk1 co-precipita només amb la forma activa de Srk1, el que demostra que Lsk1 s'uneix a Srk1 *in vivo* si aquesta té l'activitat quinasa intacta o la seva conformació activa. Això és coherent amb una relació quinasa-substrat entre aquestes dues proteïnes.

Els resultats de les dilucions seriades en plaques de LatB ens confirmen que Δ *lsk1* és sensible a la presència de la droga (Fig. 22). En aquest cas és important destacar que tant el doble mutant amb *srk1* com amb *sty1* presenten la mateixa sensibilitat de Δ *lsk1*. Això ens fa pensar que el paper de Lsk1 és fonamental en la resposta a estrès de citoesquelet d'actina.

Com ja hem dit, estudis previs relacionen l'activació de la via SAPK amb la fosforilació de Lsk1 en el seu extrem N-terminal (Sukegawa et al. 2011). De fet, alguns estableixen que l'activació de la via Wis1/Sty1 condueix a la fosforilació de la RNA-polimerasa II i, segons estudis *in vitro*, aquesta podria deure's a la fosforilació directa de Lsk1 en el seu extrem N-terminal per Sty1 (Sukegawa et al. 2011).

Tenint en compte, però, que en l'assaig quinasa que mostren es va fer servir una Sty1 purificada d'un extracte de *S. pombe* i que el nostre grup va demostrar que en condicions basals Sty1 es troba unida a Srk1 (López-Avilés et al. 2008), aquests resultats no són incompatibles amb la nostra hipòtesi. És per aquest motiu que

es va decidir treballar amb pèptids purificats de bacteri per a l'assaig quinasa. Per caracteritzar la regió de fosforilació del substrat, es va dividir la Lsk1 en dos fragments (Fig. 23), i es va confirmar que Srk1 fosforilava Srk1 en l'extrem N-terminal (Fig. 24).

Es va decidir, aleshores, purificar aquest fragment amb 9 llocs consens de fosforilació per Srk1 (RXXS/T) mutats a alanines (Fig. 23, taronja). L'assaig quinasa confirma que Srk1 fosforila Lsk1 *in vitro* en una d'aquestes 9 posicions de l'extrem N-terminal (Fig. 25), el que confirma que Lsk1 és substrat de Srk1 *in vitro*.

L'activació de Lsk1 comporta la fosforilació del seu substrat: la Rpb1 o RNA-polimerasa II (Saberianfar et al. 2011). Per comprovar que Srk1 és capaç d'activar Lsk1 *in vivo*, es va sobre-expressar *srk1* en *S. pombe*. En aquest cas, la RNA-polimerasa II apareix fosforilada en la serina 2 (Fig. 26). Donat que aquesta fosforilació desapareix en la soca que té *lsk1* deletat, es demostra que la sobre-expressió de Srk1 provoca la fosforilació de Rpb1 a través de Lsk1.

Experiments futurs podrien confirmar que aquesta fosforilació també es dona en resposta a una exposició a latrunculina. Igualment, ens interessa determinar si la eliminació dels 9 llocs consens de fosforilació de Lsk1 endògena també presenta dificultats en la compleció de la citocinesi en presència de latrunculina, el que confirmaria que aquesta regulació és la responsable del fenotip observat.

3.Regulació negativa de la via SAPK

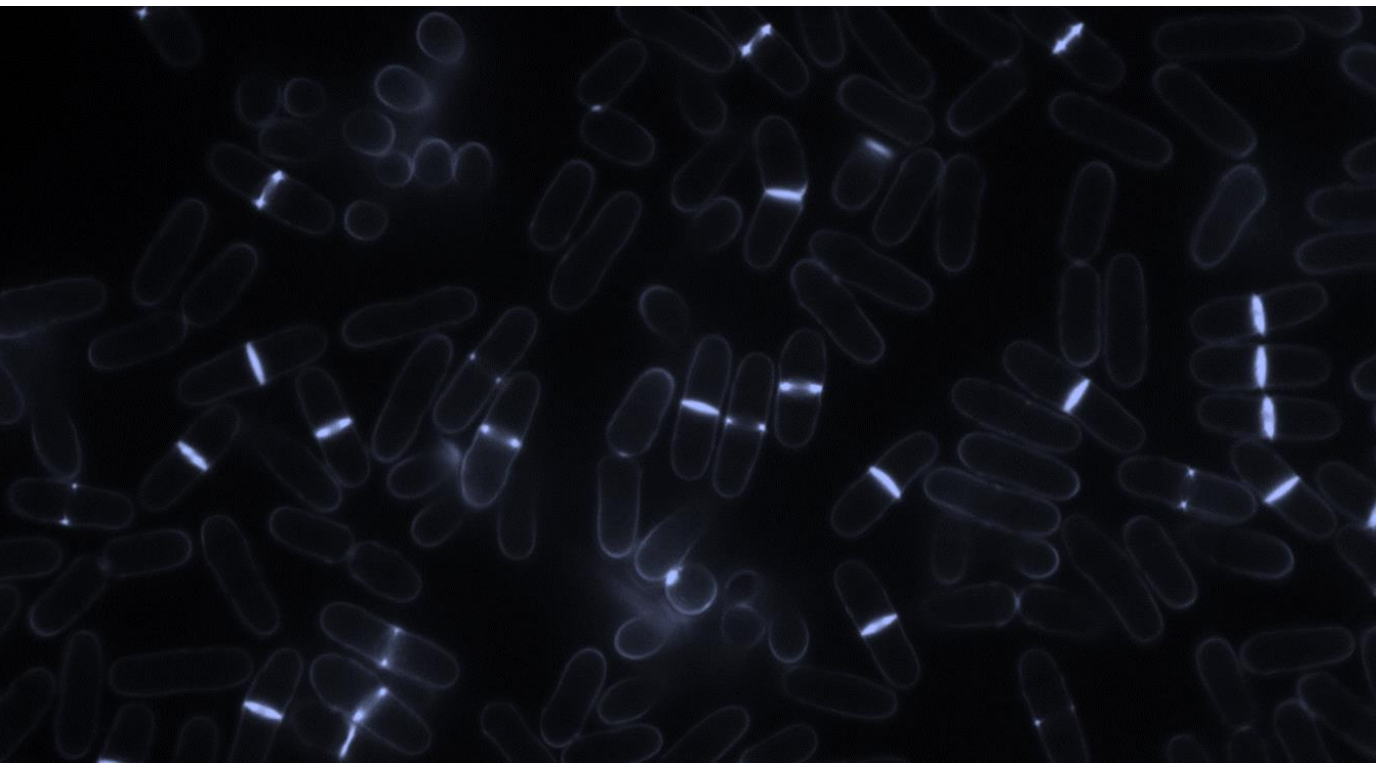
És conegut que $\Delta wis1$ és resistent a l'exposició a latrunculina (Bimbó et al. 2005), com $\Delta sty1$ (Fig. 27A). Es sap que en mamífer, la fosforilació de la homòloga de Wis1 al lloc equivalent a la serina 463 provoca una inhibició de la MAPKK (Gopalbhai et al. 2003) (Fig. 27F). És per això que disposem d'una soca que presenta aquest residu mutat a alanina (*wis1-S463A*). Per una altra banda, el nostre grup sospitava que Srk1 podia tenir un paper en la inhibició per fosforilació de Wis1. Per aquest motiu es va generar una soca que presentava els consens de fosforilació per Srk1 (RXXS/T) en Wis1 mutats a alanines (*wis1-5A*) (Fig. 27B).

Es va testar l'efecte que tenien aquestes dues mutacions sobre la resposta a latrunculina (Fig. 27A). Els resultats de les dilucions seriades mostren com la mutació en Ser463 no presenta un fenotip diferent a WT, mentre que la mutació dels consens de fosforilació per Srk1 presenta sensibilitat. Donat que el grup va descartar que Srk1 fosforilés Wis1, es va plantejar que una altra quinasa involucrada en el control de la mitosi i amb el mateix consens de fosforilació que Srk1 fos la responsable d'una regulació negativa de la via. La quinasa de la via SIN Sid2 compleix amb aquests requisits.

Per comprovar-ho, es va treballar amb una soca que té *wis1* deletat, així com amb la mutació dels llocs consens de fosforilació (*wis1-5A*). També es va treballar amb la deleció condicional *sid2-250*. Les soques es van exposar a latrunculina i es va observar que l'activació de Sty1 és major en les soques que no presenten *sid2* igual que en el mutant *wis1-5A* (Fig. 27G). Això suggereix que Sid2 podria estar regulant negativament la via SAPK a través de la fosforilació de Wis1 en algun dels 5 llocs consens mutats en resposta a latrunculina.

Actualment estem treballant en assajos quinasa *in vitro* per confirmar la relació quinasa-substrat entre Sid2 i Wis1. També tenim interès en identificar la quinasa responsable de la fosforilació en la Ser463.

CONCLUSIONS



Conclusions

Amb tot podem concloure que:

- ❖ La via de les SAPK està involucrada en la resposta a defectes en el citosquelet d'actina provocats per la latrunculina.
- ❖ La pèrdua de la MAPK Sty1 (p38) provoca resistència a latrunculina. Això es correlaciona amb els resultats publicats recentment on Sty1 és un element de *checkpoint* de perturbacions del citosquelet d'actina, inhibint Cdc42 als pols.
- ❖ El paper de la MAPK Sty1 és dominant sobre la funció de Srk1 en resposta a latrunculina.
- ❖ La Srk1 (MK2) ha de ser activada per fosforilació a la Thr463 per respondre a latrunculina.
- ❖ La Srk1 és necessària per a la resposta a defectes en el citosquelet d'actina provocats per la latrunculina, ja que està implicada en el manteniment i estabilitat de l'anell contràctil.
- ❖ La Srk1 s'uneix *in vivo* a la quinasa Lsk1 (Cdk12) i fosforila *in vitro* el domini N-terminal de Lsk1 en algun dels 9 llocs consens de fosforilació per Srk1 (RXXS/T).
- ❖ La sobre-expressió de Srk1 provoca la fosforilació de la RNA-polimerasa II a través de Lsk1.
- ❖ Existeix una regulació negativa de la via SAPK a través de la fosforilació de Wis1 que podria donar-se a través de Sid2 en resposta a latrunculina.

Les conclusions indicades es poden resumir en el model de la figura 28.

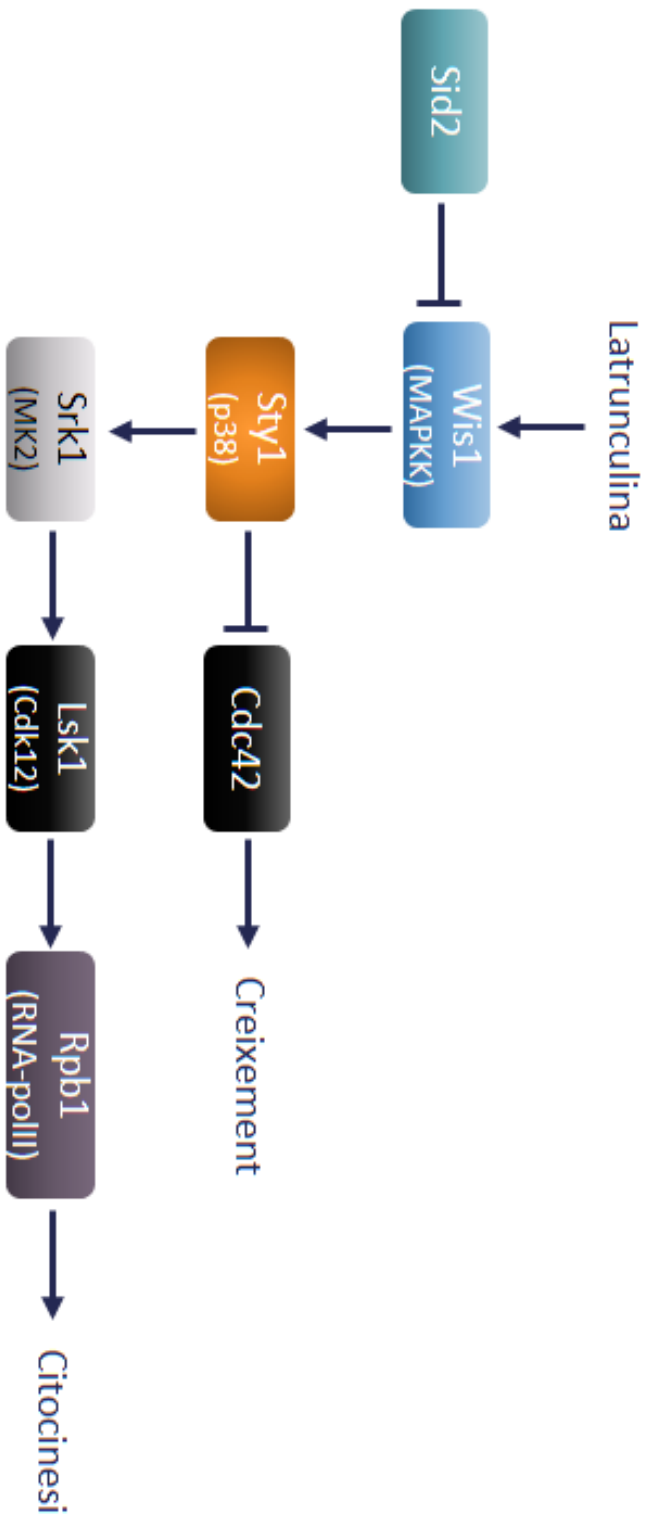
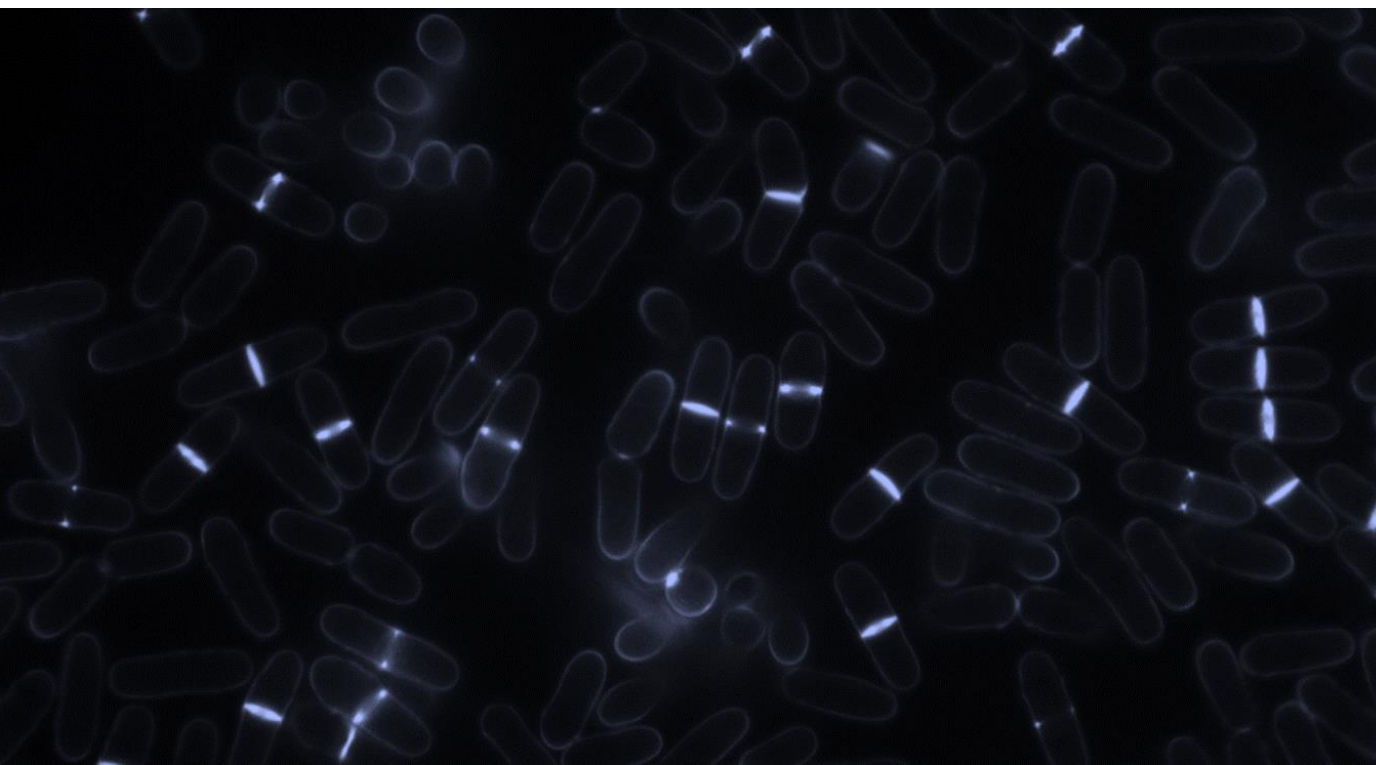


Figura 28. Representació de les conclusions descrites en referència a la resposta a estrès per latrunculina.

BIBLIOGRAFIA



Bibliografia

Akamatsu, Matthew, Julien Berro, Kai Ming Pu, Irene R. Tebbs, and Thomas D. Pollard. 2014. "Cytokinetic Nodes in Fission Yeast Arise from Two Distinct Types of Nodes That Merge during Interphase." *Journal of Cell Biology* 204(6):977–88.

Alemaný, Vicenç, Maribel Sanchez-Piris, Oriol Bachs, and Rosa Aligue. 2002. "Cmk2, a Novel Serine/Threonine Kinase in Fission Yeast." *FEBS Letters* 524(1–3):79–86.

Almonacid, Maria, Séverine Celton-Morizur, Jennifer L. Jakubowski, Florent Dingli, Damarys Loew, Adeline Mayeux, Jun Song Chen, Kathleen L. Gould, Dawn M. Clifford, and Anne Paoletti. 2011. "Temporal Control of Contractile Ring Assembly by Plo1 Regulation of Myosin II Recruitment by Mid1/Anillin." *Current Biology* 21(6):473–79.

Almonacid, Maria, James B. Moseley, Julie Janvore, Adeline Mayeux, Vincent Fraiser, Paul Nurse, and Anne Paoletti. 2009. "Spatial Control of Cytokinesis by Cdr2 Kinase and Mid1/Anillin Nuclear Export." *Current Biology* 19(11):961–66.

An, Hanbing, Jennifer L. Morrell, Jennifer L. Jennings, Andrew J. Link, and Kathleen L. Gould. 2004. "Requirements of Fission Yeast Septins for Complex Formation, Localization, and Function." *Molecular Biology of the Cell* 15(12):5551–64.

Anon. n.d. "Die Vererbung von Homothallie Und Heterothallie Bei Schizosaccharomyces Pombe. (1949 Edition) | Open Library." Retrieved January 16, 2020a (https://openlibrary.org/books/OL6163559M/Die_Vererbung_von_Homot

BIBLIOGRAFIA

hallie_und_Heterothallie_bei_Schizosaccharomyces_Pombe.).

Anon. n.d. "Latrunculin a | C22H31NO5S - PubChem." Retrieved February 20, 2020b (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/latrunculin_a).

Anon. n.d. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2001 - Press Release - NobelPrize.Org." Retrieved January 21, 2020c (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2001/press-release/>).

Arai, Ritsuko and Issei Mabuchi. 2002. "F-Actin Ring Formation and the Role of F-Actin Cables in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Journal of Cell Science* 115(5):887–98.

Arasada, Rajesh and Thomas D. Pollard. 2014. "Contractile Ring Stability in *S.Pombe* Depends on F-BAR Protein Cdc15p and Bgs1p Transport from the Golgi Complex." *Cell Reports* 8(5):1533–44.

Asp, E. and P. Sunnerhagen. 2003. "Mkp1 and Mkp2, Two MAPKAP-Kinase Homologues in *Schizosaccharomyces Pombe*, Interact with the MAP Kinase Sty1." *Molecular Genetics and Genomics* 268(5):585–97.

Asp, Eva, Daniel Nilsson, and Per Sunnerhagen. 2008. "Fission Yeast Mitogen-Activated Protein Kinase Sty1 Interacts with Translation Factors." *Eukaryotic Cell* 7(2):328–38.

Bahler, J., A. B. Steever, S. Wheatley, Y. L. Wang, J. R. Pringle, K. L. Gould, and D. McCollum. 1998. "Role of Polo Kinase and Mid1p in Determining the Site of Cell Division in Fission Yeast." *Journal of Cell Biology* 143(6):1603–16.

Bähler, Jürg and John R. Pringle. 1998. "Pom1p, a Fission Yeast Protein Kinase That Provides Positional Information for Both Polarized Growth and Cytokinesis." *Genes and Development* 12(9):1356–70.

Bähler, Jürg, Jian-Qiu Wu, Mark S. Longtine, Nirav G. Shah, Amos Mckenzie III,

- Alexander B. Steever, Achim Wach, Peter Philippsen, and John R. Pringle. 1998. "Heterologous Modules for Efficient and Versatile PCR-Based Gene Targeting InSchizosaccharomyces Pombe." *Yeast* 14(10):943–51.
- Balasubramanian, M. K., D. McCollum, and U. Surana. 2000. "Tying the Knot: Linking Cytokinesis to the Nuclear Cycle." *Journal of Cell Science* 113 (Pt 9):1503–13.
- Basi, G. and G. Draetta. 1995. "P13suc1 of Schizosaccharomyces Pombe Regulates Two Distinct Forms of the Mitotic Cdc2 Kinase." *Molecular and Cellular Biology* 15(4):2028–36.
- Benito, Javier, Cristina Martín-Castellanos, and Sergio Moreno. 1998. "Regulation of the G1 Phase of the Cell Cycle by Periodic Stabilization and Degradation of the P25(Rum1) CDK Inhibitor." *EMBO Journal* 17(2):482–97.
- Berlin, Ana, Anne Paoletti, and Fred Chang. 2003. "Mid2p Stabilizes Septin Rings during Cytokinesis in Fission Yeast." *Journal of Cell Biology* 160(7):1083–92.
- Bimbó, Andrea, Yonghui Jia, Siew Lay Poh, R. Krishna Murthy Karuturi, Nicole den Elzen, Xu Peng, Liling Zheng, Matthew O'Connell, Edison T. Liu, Mohan K. Balasubramanian, and Jianhua Liu. 2005. "Systematic Deletion Analysis of Fission Yeast Protein Kinases." *Eukaryotic Cell* 4(4):799–813.
- Blanco, Miguel A., Alberto Sánchez-Díaz, José M. De Prada, and Sergio Moreno. 2000. "APC(Ste9/Srw1) Promotes Degradation of Mitotic Cyclins in G1 and Is Inhibited by Cdc2 Phosphorylation." *EMBO Journal* 19(15):3945–55.
- Bohnert, K. Adam, Agnieszka P. Grzegorzewska, Alaina H. Willet, Craig W. Vander Kooi, David R. Kovar, and Kathleen L. Gould. 2013. "SIN-Dependent

BIBLIOGRAFIA

Phosphoinhibition of Formin Multimerization Controls Fission Yeast Cytokinesis." *Genes and Development* 27(19):2164–77.

Breeding, Connie S., James Hudson, Mohan K. Balasubramanian, Sean M. Hemmingsen, Paul G. Young, and Kathleen L. Gould. 1998. "The Cdr2+ Gene Encodes a Regulator of G2/M Progression and Cytokinesis in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular Biology of the Cell* 9(12):3399–3415.

Bridge, P. D. and J. W. May. 1984. "A Numerical Classification of Fission Yeasts of the Genus *Schizosaccharomyces* Lindner." *Journal of General Microbiology* 130(8):1921–32.

Buck, V., J. Quinn, T. S. Pino, H. Martin, J. Saldanha, K. Makino, B. A. Morgan, and J. B. A. Millar. 2001. "Peroxide Sensors for the Fission Yeast Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway." *Molecular Biology of the Cell* 12(2):407–19.

La Carbona, Stéphanie, Catherine Le Goff, and Xavier Le Goff. 2006. "Fission Yeast Cytoskeletons and Cell Polarity Factors: Connecting at the Cortex." *Biology of the Cell* 98(11):619–31.

Carnahan, Robert H. and Kathleen L. Gould. 2003. "The PCH Family Protein, CDc15p, Recruits Two F-Actin Nucleation Pathways to Coordinate Cytokinetic Actin Ring Formation in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Journal of Cell Biology* 162(5):851–62.

Celton-Morizur, Séverine, Victor Racine, Jean Baptiste Sibarita, and Anne Paoletti. 2006. "Pom1 Kinase Links Division Plane Position to Cell Polarity by Regulating Mid1p Cortical Distribution." *Journal of Cell Science* 119(22):4710–18.

Cerutti, L. and V. Simanis. 1999. "Asymmetry of the Spindle Pole Bodies and

- Spg1p GAP Segregation during Mitosis in Fission Yeast." *Journal of Cell Science* 112 (Pt 14):2313–21.
- Chang, F. 2001. "Establishment of a Cellular Axis in Fission Yeast." *Trends in Genetics : TIG* 17(5):273–78.
- Chang, Fred, David Drubin, and Paul Nurse. 1997. "Cdc12p, a Protein Required for Cytokinesis in Fission Yeast, Is a Component of the Cell Division Ring and Interacts with Profilin." *Journal of Cell Biology* 137(1):169–82.
- Chang, Fred, Alison Woollard, and Paul Nurse. 1996. "Isolation and Characterization of Fission Yeast Mutants Defective in the Assembly and Placement of the Contractile Actin Ring." *Journal of Cell Science* 109(1):131–42.
- Chen, Chun Ti, Anna Feoktistova, Jun Song Chen, Young Sam Shim, Dawn M. Clifford, Kathleen L. Gould, and Dannel McCollum. 2008. "The SIN Kinase Sid2 Regulates Cytoplasmic Retention of the *S. Pombe* Cdc14-like Phosphatase Clp1." *Current Biology* 18(20):1594–99.
- Chen, Dongrong, W. Mark Toone, Juan Mata, Rachel Lyne, Gavin Burns, Katja Kivinen, Alvis Brazma, Nic Jones, and Jürg Bähler. 2003. "Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress." *Molecular Biology of the Cell* 14(1):214–29.
- Chen, Jun Song, Matthew R. Broadus, Janel R. McLean, Anna Feoktistova, Liping Ren, and Kathleen L. Gould. 2013. "Comprehensive Proteomics Analysis Reveals New Substrates and Regulators of the Fission Yeast Clp1/Cdc14 Phosphatase." *Molecular and Cellular Proteomics* 12(5):1074–86.
- Chica, Nathalia, Ana Elisa Rozalén, Livia Pérez-Hidalgo, Angela Rubio, Bela Novak, and Sergio Moreno. 2016. "Nutritional Control of Cell Size by the

BIBLIOGRAFIA

- Greatwall-Endosulfine-PP2A-B55 Pathway." *Current Biology* 26(3):319–30.
- Chin, David and Anthony R. Means. 2000. "Calmodulin: A Prototypical Calcium Sensor." *Trends in Cell Biology* 10(8):322–28.
- Christensen, Per U., Nicola J. Bentley, Rui G. Martinho, Olaf Nielsen, and Antony M. Carr. 2000. "Mik1 Levels Accumulate in S Phase and May Mediate an Intrinsic Link between S Phase and Mitosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(6):2579–84.
- Cisneros-Barroso, Eugenia, Tula Yance-Chávez, Ayako Kito, Reiko Sugiura, Alba Gómez-Hierro, David Giménez-Zaragoza, and Rosa Aligue. 2014. "Negative Feedback Regulation of Calcineurin-Dependent Prz1 Transcription Factor by the CaMKK-CaMK1 Axis in Fission Yeast." *Nucleic Acids Research* 42(15):9573–87.
- Clifford, Dawn M., Benjamin A. Wolfe, Rachel H. Roberts-Galbraith, W. Hayes McDonald, John R. Yates, and Kathleen L. Gould. 2008. "The Clp1/Cdc14 Phosphatase Contributes to the Robustness of Cytokinesis by Association with Anillin-Related Mid1." *Journal of Cell Biology* 181(1):79–88.
- Coffman, Valerie C., Aaron H. Nile, I. Ju Lee, Huayang Liu, and Jian Qiu Wu. 2009. "Roles of Formin Nodes and Myosin Motor Activity in Mid1p-Dependent Contractile-Ring Assembly during Fission Yeast Cytokinesis." *Molecular Biology of the Cell* 20(24):5195–5210.
- Coleman, Thomas R., Zhaohua Tang, and William G. Dunphy. 1993. "Negative Regulation of the Wee1 Protein Kinase by Direct Action of the Nim1/Cdr1 Mitotic Inducer." *Cell* 72(6):919–29.
- Correa-Bordes, Jaime, Marie Pierre Gulli, and Paul Nurse. 1997. "P25(Rum1) Promotes Proteolysis of the Mitotic B-Cyclin P56(Cdc13) during G1 of the Fission Yeast Cell Cycle." *EMBO Journal* 16(15):4657–64.

- Correa-Bordes, Jaime and Paul Nurse. 1995. "P25rum1 Orders S Phase and Mitosis by Acting as an Inhibitor of the P34cdc2 Mitotic Kinase." *Cell* 83(6):1001–9.
- Cortés, Juan C. G., Mariona Ramos, Masako Osumi, Pilar Pérez, and Juan Carlos Ribas. 2016. "Fission Yeast Septation." *Communicative and Integrative Biology* 9(4).
- Coudreuse, Damien, Harm Van Bakel, Monique Dewez, Julie Soutourina, Tim Parnell, Jean Vandenhaute, Brad Cairns, Michel Werner, and Damien Hermand. 2010. "A Gene-Specific Requirement of RNA Polymerase II CTD Phosphorylation for Sexual Differentiation in *S. Pombe*." *Current Biology* 20(12):1053–64.
- Coué, Martine, Stephen L. Brenner, Ilan Spector, and Edward D. Korn. 1987. "Inhibition of Actin Polymerization by Latrunculin A." *FEBS Letters* 213(2):316–18.
- Crandall, Marjorie, Richard Egel, and Vivian L. Mackay. 1977. "Physiology of Mating in Three Yeasts." *Advances in Microbial Physiology* 15(C):307–98.
- Cueille, N., E. Salimova, V. Esteban, M. Blanco, S. Moreno, A. Bueno, and V. Simanis. 2001. "Flp1, a Fission Yeast Orthologue of the *S. Cerevisiae* CDC14 Gene, Is Not Required for Cyclin Degradation of Rum1p Stabilisation at the End of Mitosis." *Journal of Cell Science* 114(14):2649–64.
- Cussioli, José Renato Rosa, Bárbara Luísa Soares, and Francisco Meirelles Bastos de Oliveira. 2020. "From Yeast to Humans: Understanding the Biology of Dna Damage Response (DDR) Kinases." *Genetics and Molecular Biology* 43(1).

BIBLIOGRAFIA

- Daga, Rafael R. and Juan Jimenez. 1999. "Translational Control of the Cdc25 Cell Cycle Phosphatase: A Molecular Mechanism Coupling Mitosis to Cell Growth." *Journal of Cell Science* 112(18):3137–46.
- Degols, G. and P. Russell. 1997. "Discrete Roles of the Spc1 Kinase and the Atf1 Transcription Factor in the UV Response of *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular and Cellular Biology* 17(6):3356–63.
- Degols, G., K. Shiozaki, and P. Russell. 1996. "Activation and Regulation of the Spc1 Stress-Activated Protein Kinase in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular and Cellular Biology* 16(6):2870–77.
- Dekker, Nick, Dave Speijer, Christian H. Grün, Marlene Van Den Berg, Annett De Haan, and Frans Hochstenbach. 2004. "Role of the α -Glucanase Agn1p in Fission-Yeast Cell Separation." *Molecular Biology of the Cell* 15(8):3903–14.
- Deng, Lin, Suzanne Baldissard, Arminja N. Kettenbach, Scott A. Gerber, and James B. Moseley. 2014. "Dueling Kinases Regulate Cell Size at Division through the SAD Kinase Cdr2." *Current Biology* 24(4):428–33.
- Didmon, Mark, Kevin Davis, Peter Watson, Graham Ladds, Peter Broad, and John Davey. 2002. "Identifying Regulators of Pheromone Signalling in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Current Genetics* 41(4):241–53.
- Ding, Rubai, Robert R. West, Mary Morphew, Berl R. Oakley, and J. Richard McIntosh. 1997. "The Spindle Pole Body of *Schizosaccharomyces Pombe* Enters and Leaves the Nuclear Envelope as the Cell Cycle Proceeds." *Molecular Biology of the Cell* 8(8):1461–79.
- Dudin, Omayya, Laura Merlini, and Sophie G. Martin. 2016. "Spatial Focalization of Pheromone/MAPK Signaling Triggers Commitment to Cell–Cell Fusion."

Genes and Development 30(19):2226–39.

- Dunand-Sauthier, Isabelle, Carol A. Walker, Jana Narasimhan, Amanda K. Pearce, Ronald C. Wek, and Tim C. Humphrey. 2005. "Stress-Activated Protein Kinase Pathway Functions to Support Protein Synthesis and Translational Adaptation in Response to Environmental Stress in Fission Yeast." *Eukaryotic Cell* 4(11):1785–93.
- Egel, R. and Michiko Egel-Mitani. 1974. "Premeiotic DNA Synthesis in Fission Yeast." *Experimental Cell Research* 88(1):127–34.
- Esteban, Verónica, Miguel Blanco, Nathalie Cueille, Viesturs Simanis, Sergio Moreno, and Avelino Bueno. 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." *Journal of Cell Science* 117(12):2461–68.
- Esteban, Verónica, María Sacristán, Sonia Andrés, and Avelino Bueno. 2008. "The Flp1/Clp1 Phosphatase Cooperates with HECT-Type Pub1/2 Protein-Ubiquitin Ligases in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Cell Cycle* 7(9):1269–76.
- Featherstone, Carol and Paul Russell. 1991. "Fission Yeast P107wee1 Mitotic Inhibitor Is a Tyrosine/Serine Kinase." *Nature* 349(6312):808–11.
- Feierbach, B. and F. Chang. 2001. "Roles of the Fission Yeast Formin For3p in Cell Polarity, Actin Cable Formation and Symmetric Cell Division." *Current Biology : CB* 11(21):1656–65.
- Forsburg, Susan L. and Paul Nurse. 1991. "Identification of a G1-Type Cyclin Puc1 + in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Nature* 351(6323):245–48.

BIBLIOGRAFIA

- Franco, Alejandro, Teresa Soto, Rebeca Martín-García, Marisa Madrid, Beatriz Vázquez-Marín, Jero Vicente-Soler, Pedro M. Coll, Mariano Gacto, Pilar Pérez, and José Cansado. 2017. "Distinct Functional Relevance of Dynamic GTPase Cysteine Methylation in Fission Yeast." *Scientific Reports* 7(1).
- Furge, Kyle A., Kelvin Wong, John Armstrong, Mohan Balasubramanian, and Charles F. Albright. 1998. "Byr4 and Cdc16 Form a Two-Component GTPase-Activating Protein for the SPG1 GTPase That Controls Septation in Fission Yeast." *Current Biology* 8(17):947–54.
- G. Dunphy, William. 1994. "The Decision to Enter Mitosis." *Trends in Cell Biology* 4(6):202–7.
- Gaits, Frédérique and Paul Russell. 1999. "Active Nucleocytoplasmic Shuttling Required for Function and Regulation of Stress-Activated Kinase Spc1/Styl in Fission Yeast" edited by P. Silver. *Molecular Biology of the Cell* 10(5):1395–1407.
- García-Blanco, Natalia and Sergio Moreno. 2019. "Down-Regulation of Cdk1 Activity in G1 Coordinates the G1/S Gene Expression Programme with Genome Replication." *Current Genetics* 65(3):685–90.
- Gaspa, Laura, Alberto González-Medina, Elena Hidalgo, and José Ayté. 2016. "A Functional Genome-Wide Genetic Screening Identifies New Pathways Controlling the G1/S Transcriptional Wave." *Cell Cycle* 15(5):720–29.
- Ge, Wanzhong and Mohan K. Balasubramanian. 2008. "Pxl1p, a Paxillin-Related Protein, Stabilizes the Actomyosin Ring during Cytokinesis in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 19(4):1680–92.
- George, Vinoj T., Gavin Brooks, and Timothy C. Humphrey. 2007. "Regulation of Cell Cycle and Stress Responses to Hydrostatic Pressure in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 18(10):4168–79.

- Gilbreth, Mary, Peirong Yang, Dan Wang, Jeff Frost, Anthony Polverino, Melanie H. Cobb, and Stevan Marcus. 1996. "The Highly Conserved Skb1 Gene Encodes a Protein That Interacts with Shkl, a Fission Yeast Ste20/PAK Homolog." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(24):13802–7.
- Gómez-Hierro, Alba, Eva Lambea, David Giménez-Zaragoza, Sandra López-Avilés, Tula Yance-Chávez, Marta Montserrat, M. Jesús Pujol, Oriol Bachs, and Rosa Aligue. 2015. "Ssp1 CaMKK: A Sensor of Actin Polarization That Controls Mitotic Commitment through Srk1 in Schizosaccharomyces Pombe." *PLoS ONE* 10(11).
- González-Rubio, Gema, Teresa Fernández-Acero, Humberto Martín, and María Molina. 2019. "Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases (MKPs) in Fungal Signaling: Conservation, Function, and Regulation." *International Journal of Molecular Sciences* 20(7).
- Gopalbhai, Kailesh, Gregor Jansen, Geneviève Beauregard, Malcolm Whiteway, France Dumas, Cunle Wu, and Sylvain Meloche. 2003. "Negative Regulation of MAPKK by Phosphorylation of a Conserved Serine Residue Equivalent to Ser212 of MEK1." *Journal of Biological Chemistry* 278(10):8118–25.
- Gould, Kathleen L. and Paul Nurse. 1989. "Tyrosine Phosphorylation of the Fission Yeast Cdc2+ Protein Kinase Regulates Entry into Mitosis." *Nature* 342(6245):39–45.
- Gu, Ying and Snezhana Oliferenko. 2015. "Comparative Biology of Cell Division in the Fission Yeast Clade." *Current Opinion in Microbiology* 28:18–25.
- Gupta, Sneha, Meera Govindaraghavan, and Dannel McCollum. 2014. "Cross Talk between NDR Kinase Pathways Coordinates Cytokinesis with Cell

BIBLIOGRAFIA

- Separation in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Eukaryotic Cell* 13(8):1104–12.
- Gupta, Sneha and Dannel McCollum. 2011. "Crosstalk between NDR Kinase Pathways Coordinates Cell Cycle Dependent Actin Rearrangements." *Cell Division* 6:19.
- Hachet, Olivier and Viesturs Simanis. 2008. "Mid1p/Anillin and the Septation Initiation Network Orchestrate Contractile Ring Assembly for Cytokinesis." *Genes and Development* 22(22):3205–16.
- Hai, Tsonwin and Matthew G. Hartman. 2001. "The Molecular Biology and Nomenclature of the Activating Transcription Factor/CAMP Responsive Element Binding Family of Transcription Factors: Activating Transcription Factor Proteins and Homeostasis." *Gene* 273(1):1–11.
- Hanyu, Yuichiro, Kumiko K. Imai, Yosuke Kawasaki, Takahiro Nakamura, Yukinobu Nakaseko, Koji Nagao, Aya Kokubu, Masahiro Ebe, Asuka Fujisawa, Takeshi Hayashi, Chikashi Obuse, and Mitsuhiro Yanagida. 2009. "Schizosaccharomyces Pombe Cell Division Cycle under Limited Glucose Requires Ssp1 Kinase, the Putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-Related Phosphatase Inhibitor." *Genes to Cells* 14(5):539–54.
- Harlen, Kevin M. and L. Stirling Churchman. 2017. "The Code and beyond: Transcription Regulation by the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(4):263–73.
- Hayward, G. S. and M. G. Smith. 1972. "The Chromosome of Bacteriophage T5. I. Analysis of the Single-Stranded DNA Fragments by Agarose Gel Electrophoresis." *Journal of Molecular Biology* 63(3).
- Hendler, Adi, Edgar M. Medina, Anastasiya Kishkevich, Mehtap Abu-Qarn, Steffi Klier, Nicolas E. Buchler, Robertus A. M. de Bruin, and Amir Aharoni. 2017.

- “Gene Duplication and Co-Evolution of G1/S Transcription Factor Specificity in Fungi Are Essential for Optimizing Cell Fitness.” *PLoS Genetics* 13(5).
- Ho, Yi Hsuan and Audrey P. Gasch. 2015. “Exploiting the Yeast Stress-Activated Signaling Network to Inform on Stress Biology and Disease Signaling.” *Current Genetics* 61(4):503–11.
- Huang, Yinyi, Ting Gang Chew, Wanzhong Ge, and Mohan K. Balasubramanian. 2007. “Polarity Determinants Tea1p, Tea4p, and Pom1p Inhibit Division-Septum Assembly at Cell Ends in Fission Yeast.” *Developmental Cell* 12(6):987–96.
- Huang, Yinyi, Hongyan Yan, and Mohan K. Balasubramanian. 2008. “Assembly of Normal Actomyosin Rings in the Absence of Mid1p and Cortical Nodes in Fission Yeast.” *Journal of Cell Biology* 183(6):979–88.
- Humbel, Bruno M., Mami Konomi, Tomoko Takagi, Naomi Kamasawa, Sanae A. Ishijima, and Masako Osumi. 2001. “In Situ Localization of β -Glucans in the Cell Wall of *Schizosaccharomyces Pombe*.” *Yeast* 18(5):433–44.
- Kamasaki, Tomoko, Masako Osumi, and Issei Mabuchi. 2007. “Three-Dimensional Arrangement of F-Actin in the Contractile Ring of Fission Yeast.” *Journal of Cell Biology* 178(5):765–71.
- Kanoh, Junko and Paul Russell. 1998. “The Protein Kinase Cdr2, Related to Nim1/Cdr1 Mitotic Inducer, Regulates the Onset of Mitosis in Fission Yeast.” *Molecular Biology of the Cell* 9(12):3321–34.
- Kanoh, Junko, Yoshinori Watanabe, Miho Ohsugi, Yuichi Iino, and Masayuki Yamamoto. 1996. “*Schizosaccharomyces Pombe* Gad7+ Encodes a Phosphoprotein with a BZIP Domain, Which Is Required for Proper G1

BIBLIOGRAFIA

Arrest and Gene Expression under Nitrogen Starvation." *Genes to Cells* 1(4):391–408.

Karagiannis, Jim and Mohan K. Balasubramanian. 2007. "A Cyclin-Dependent Kinase That Promotes Cytokinesis through Modulating Phosphorylation of the Carboxy Terminal Domain of the RNA Pol II Rpb1p Sub-Unit." *PLoS ONE* 2(5).

Karagiannis, Jim, Andrea Bimbó, Srividya Rajagopalan, Jianhua Liu, and Mohan K. Balasubramanian. 2005. "The Nuclear Kinase Lsk1p Positively Regulates the Septation Initiation Network and Promotes the Successful Completion of Cytokinesis in Response to Perturbation of the Actomyosin Ring in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular Biology of the Cell* 16(1):358–71.

Kjaerulff, S., I. Lautrup-Larsen, S. Truelsen, M. Pedersen, and O. Nielsen. 2005. "Constitutive Activation of the Fission Yeast Pheromone-Responsive Pathway Induces Ectopic Meiosis and Reveals Ste11 as a Mitogen-Activated Protein Kinase Target." *Molecular and Cellular Biology* 25(5):2045–59.

Kon, Ning, Stephanie C. Schroeder, Michelle D. Krawchuk, and Wayne P. Wahls. 1998. "Regulation of the Mts1-Mts2-Dependent Ade6-M26 Meiotic Recombination Hot Spot and Developmental Decisions by the Spc1 Mitogen-Activated Protein Kinase of Fission Yeast ." *Molecular and Cellular Biology* 18(12):7575–83.

Kovar, David R., Jeffrey R. Kuhn, Andrea L. Tichy, and Thomas D. Pollard. 2003. "The Fission Yeast Cytokinesis Formin Cdc12p Is a Barbed End Actin Filament Capping Protein Gated by Profilin." *Journal of Cell Biology* 161(5):875–87.

Kovelman, R. and P. Russell. 1996. "Stockpiling of Cdc25 during a DNA

- Replication Checkpoint Arrest in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular and Cellular Biology* 16(1):86–93.
- Krapp, Andrea and Viesturs Simanis. 2008. "An Overview of the Fission Yeast Septation Initiation Network (SIN)." Pp. 411–15 in *Biochemical Society Transactions*. Vol. 36.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259):680–85.
- Lawrence, Clare L., Nic Jones, and Caroline R. M. Wilkinson. 2009. "Stress-Induced Phosphorylation of *S. Pombe* Atf1 Abrogates Its Interaction with F Box Protein Fbh1." *Current Biology* 19(22):1907–11.
- Lawrence, Clare L., Hiromi Maekawa, Jessica L. Worthington, Wolfgang Reiter, Caroline R. M. Wilkinson, and Nic Jones. 2007. "Regulation of *Schizosaccharomyces Pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-Mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1." *Journal of Biological Chemistry* 282(8):5160–70.
- Lee, Margaret S., Tamar Enochs, and Helen Piwnicka-Worms. 1994. "H E JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Mikl" Encodes a Tyrosine Kinase That Phosphorylates ~34'~" on Tyrosine 15*." Vol. 269.
- Lim, Hong Hwa and Uttam Surana. 2003. "Tome-1, Wee1, and the Onset of Mitosis: Coupled Destruction for Timely Entry." *Molecular Cell* 11(4):845–46.
- Liu, Jianhua, Xie Tang, Hongyan Wang, Snezhana Oliferenko, and Mohan K. Balasubramanian. 2002. "The Localization of the Integral Membrane Protein Cps1p to the Cell Division Site Is Dependent on the Actomyosin Ring and the Septation-Inducing Network in *Schizosaccharomyces*

BIBLIOGRAFIA

- Pombe." *Molecular Biology of the Cell* 13(3):989–1000.
- Liu, Jianhua, Hongyan Wang, Dannel McCollum, and Mohan K. Balasubramanian. 1999. "Drc1p/Cps1p, a 1,3- β -Glucan Synthase Subunit, Is Essential for Division Septum Assembly in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Genetics* 153(3):1193–1203.
- López-Avilés, Sandra, Maribel Grande, Marta González, Ase Lill Helgesen, Vicenç Alemany, Maribel Sanchez-Piris, Oriol Bachs, Jonathan B. A. Millar, and Rosa Aligue. 2005. "Inactivation of the Cdc25 Phosphatase by the Stress-Activated Srk1 Kinase in Fission Yeast." *Molecular Cell* 17(1):49–59.
- López-Avilés, Sandra, Eva Lambea, Alberto Moldón, Maribel Grande, Alba Fajardo, Miguel A. Rodríguez-Gabriel, Elena Hidalgo, and Rosa Aligue. 2008. "Activation of Srk1 by the Mitogen-Activated Protein Kinase Sty1/Spc1 Precedes Its Dissociation from the Kinase and Signals Its Degradation." *Molecular Biology of the Cell* 19(4):1670–79.
- Lord, Matthew and Thomas D. Pollard. 2004. "UCS Protein Rng3p Activates Actin Filament Gliding by Fission Yeast Myosin-II." *Journal of Cell Biology* 167(2):315–25.
- Lundgren, Karen, Nancy Walworth, Robert Booher, Marlene Dembski, Marc Kirschner, and David Beach. 1991. "Mik1 and Wee1 Cooperate in the Inhibitory Tyrosine Phosphorylation of Cdc2." *Cell* 64(6):1111–22.
- Maclver, Fiona H., Kayoko Tanaka, Alasdair M. Robertson, and Iain M. Hagan. 2003. "Physical and Functional Interactions between Polo Kinase and the Spindle Pole Component Cut12 Regulate Mitotic Commitment in *S. Pombe*." *Genes and Development* 17(12):1507–23.
- Madrid, Marisa, Andrés Núñez, Teresa Soto, Jero Vicente-Soler, Mariano Gacto, and José Cansado. 2007. "Stress-Activated Protein Kinase-Mediated down-

- Regulation of the Cell Integrity Pathway Mitogen-Activated Protein Kinase Pmk1p by Protein Phosphatases." *Molecular Biology of the Cell* 18(11):4405–19.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." *Science* 298(5600):1912–34.
- Martin-Castellanos, C., K. Labib, and S. Moreno. 1996. "B-Type Cyclins Regulate G1 Progression in Fission Yeast in Opposition to the P25rum1 Cdk Inhibitor." *The EMBO Journal* 15(4):839–49.
- Martín-Castellanos, Cristina, Miguel A. Blanco, José M. De Prada, and Sergio Moreno. 2000. "The Puc1 Cyclin Regulates the G1 Phase of the Fission Yeast Cell Cycle in Response to Cell Size." *Molecular Biology of the Cell* 11(2):543–54.
- Martín-Cuadrado, Ana Belén, Encarnación Dueñas, Matthias Sipiczki, Carlos R. Vázquez de Aldana, and Francisco del Rey. 2003. "The Endo- β -1,3-Glucanase Eng1p Is Required for Dissolution of the Primary Septum during Cell Separation in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Journal of Cell Science* 116(9):1689–98.
- Martín-Cuadrado, Ana Belén, Jennifer L. Morrell, Mami Konomi, Hanbing An, Claudia Petit, Masako Osumi, Mohan Balasubramanian, Kathleen L. Gould, Francisco Del Rey, and Carlos R. Vázquez De Aldana. 2005. "Role of Septins and the Exocyst Complex in the Function of Hydrolytic Enzymes Responsible for Fission Yeast Cell Separation." *Molecular Biology of the Cell* 16(10):4867–81.
- Martin, Sophie G. and Martine Berthelot-Grosjean. 2009. "Polar Gradients of the DYRK-Family Kinase Pom1 Couple Cell Length with the Cell Cycle."

BIBLIOGRAFIA

Nature 459(7248):852–56.

- Matsuoka, Kentaro, Nobutaka Kiyokawa, Tomoko Taguchi, Jun Matsui, Toyo Suzuki, Kenichi Mimori, Hideki Nakajima, Hisami Takenouchi, Tang Weiran, Yohko U. Katagiri, and Junichiro Fujimoto. 2002. "Rum1, an Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase in Fission Yeast, Is Negatively Regulated by Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Phosphorylation at Ser and Thr Residues." *European Journal of Biochemistry* 269(14):3511–21.
- May, Karen M., Nicola Reynolds, C. Fiona Cullen, Mitsuhiro Yanagida, and Hiroyuki Ohkura. 2002. "Polo Boxes and Cut23 (Apc8) Mediate an Interaction between Polo Kinase and the Anaphase-Promoting Complex for Fission Yeast Mitosis." *Journal of Cell Biology* 156(1):23–28.
- McGowan, C. H. and P. Russell. 1993. "Human Wee1 Kinase Inhibits Cell Division by Phosphorylating P34cdc2 Exclusively on Tyr15." *The EMBO Journal* 12(1):75–85.
- Millar, J. B., C. H. McGowan, G. Lenaers, R. Jones, and P. Russell. 1991. "P80cdc25 Mitotic Inducer Is the Tyrosine Phosphatase That Activates P34cdc2 Kinase in Fission Yeast." *The EMBO Journal* 10(13):4301–9.
- Millar, Jonathan B. A., Vicky Buck, and Marc G. Wilkinson. 1995. "Pyp1 and Pyp2 PTPases Dephosphorylate an Osmosensing MAP Kinase Controlling Cell Size at Division in Fission Yeast." *Genes and Development* 9(17):2117–30.
- Mishra, Mithilesh, Yinyi Huang, Pragya Srivastava, Ramanujam Srinivasan, Mayalagu Sevugan, Roie Shlomovitz, Nir Gov, Madan Rao, and Mohan Balasubramanian. 2012. "Cylindrical Cellular Geometry Ensures Fidelity of Division Site Placement in Fission Yeast." *Journal of Cell Science* 125:3850–57.
- Mishra, Mithilesh and Snezhana Oliferenko. 2008. "Cytokinesis: Catch and

- Drag." *Current Biology* 18(6).
- Mitchison, J. M. 1957. "The Growth of Single Cells. I. Schizosaccharomyces Pombe." *Experimental Cell Research* 13(2):244–62.
- Mitchison, J. M. and J. Creanor. 1971. "Further Measurements of DNA Synthesis and Enzyme Potential during Cell Cycle of Fission Yeast Schizosaccharomyces Pombe." *Experimental Cell Research* 69(1):244–47.
- Mitchison, J. M. and P. Nurse. 1985. *GROWTH IN CELL LENGTH IN THE FISSION YEAST SCHIZOSACCHAROMYCES POM BE*. Vol. 75.
- Mondesert, O., C. H. McGowan, and P. Russell. 1996. "Cig2, a B-Type Cyclin, Promotes the Onset of S in Schizosaccharomyces Pombe." *Molecular and Cellular Biology* 16(4):1527–33.
- Moris, Naomi, Jaya Shrivastava, Linda Jeffery, Juan Juan Li, Jacqueline Hayles, and Paul Nurse. 2016. "A Genome–Wide Screen to Identify Genes Controlling the Rate of Entry into Mitosis in Fission Yeast." *Cell Cycle* 15(22):3121–30.
- Moseley, James B., Adeline Mayeux, Anne Paoletti, and Paul Nurse. 2009. "A Spatial Gradient Coordinates Cell Size and Mitotic Entry in Fission Yeast." *Nature* 459(7248):857–60.
- Moseley, James B. and Paul Nurse. 2009. "Cdk1 and Cell Morphology: Connections and Directions." *Current Opinion in Cell Biology* 21(1):82–88.
- Motegi, Fumio, Mithilesh Mishra, Mohan K. Balasubramanian, and Issei Mabuchi. 2004. "Myosin-II Reorganization during Mitosis Is Controlled Temporally by Its Dephosphorylation Spatially by Mid1 in Fission Yeast." *Journal of Cell Biology* 165(5):685–95.
- Motegi, Fumio, Kentaro Nakano, and Issei Mabuchi. 2000. "Molecular

BIBLIOGRAFIA

- Mechanism of Myosin-II Assembly at the Division Site in Schizosaccharomyces Pombe." *Journal of Cell Science* 113(10):1813–25.
- Muñoz, Javier, Juan Carlos G. Cortés, Matthias Sipiczki, Mariona Ramos, José Angel Clemente-Ramos, M. Belén Moreno, Ivone M. Martins, Pilar Pérez, and Juan Carlos Ribas. 2013. "Extracellular Cell Wall $\beta(1,3)$ Glucan Is Required to Couple Septation to Actomyosin Ring Contraction." *Journal of Cell Biology* 203(2):265–82.
- Murray, Andrew W. and Marc W. Kirschner. 1989. "Dominoes and Clocks: The Union of Two Views of the Cell Cycle." *Science* 246(4930):614–21.
- Mutavchiev, Delyan R., Marcin Leda, and Kenneth E. Sawin. 2016. "Remodeling of the Fission Yeast Cdc42 Cell-Polarity Module via the Sty1 P38 Stress-Activated Protein Kinase Pathway." *Current Biology* 26(21):2921–28.
- Naqvi, Naweed I., Karen Eng, Kathleen L. Gould, and Mohan K. Balasubramanian. 1999. "Evidence for F-Actin-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Assembly and Stability of the Medial Actomyosin Ring in Fission Yeast." *EMBO Journal* 18(4):854–62.
- Nefsky, B. and D. Beach. 1996. "Pub1 Acts as an E6-AP-like Protein Ubiquitin Ligase in the Degradation of Cdc25." *The EMBO Journal* 15(6):1301–12.
- Neiman, Aaron M., Brian J. Stevenson, Hao Peng Xu, George F. Sprague, Ira Herskowitz, Michael Wigler, and Stevan Marcus. 1993. "Functional Homology of Protein Kinases Required for Sexual Differentiation in Schizosaccharomyces Pombe and Saccharomyces Cerevisiae Suggests a Conserved Signal Transduction Module in Eukaryotic Organisms." *Molecular Biology of the Cell* 4(1):107–20.
- Nguyen, Aaron Ngocky, Aminah D. Ikner, Mitsue Shiozaki, Sasha M. Warren, and Kazuhiro Shiozaki. 2002. "Cytoplasmic Localization of Wis1 MAPKK by

- Nuclear Export Signal Is Important for Nuclear Targeting of Spc1/Sty1 MAPK in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 13(8):2651–63.
- Nguyen, Aaron Ngocky and Kazuhiro Shiozaki. 1999. "Heat Shock-Induced Activation of Stress MAP Kinase Is Regulated by Threonine- and Tyrosine-Specific Phosphatases." *Genes and Development* 13(13):1653–63.
- Nigg, Erich A. 1995. "Cyclin-Dependent Protein Kinases: Key Regulators of the Eukaryotic Cell Cycle." *BioEssays* 17(6):471–80.
- Norbury, Chris and Paul Nurse. 1992. "Animal Cell Cycles and Their Control." *Annual Review of Biochemistry* 61(1):441–68.
- Nurse, P. and P. Thuriaux. 1977. "Controls over the Timing of DNA Replication during the Cell Cycle of Fission Yeast." *Experimental Cell Research* 107(2):365–75.
- Nurse, P. and P. Thuriaux. 1980. "Regulatory Genes Controlling Mitosis in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Genetics* 96(3):627–37.
- Nurse, P., P. Thuriaux, and K. Nasmyth. 1976. "Genetic Control of the Cell Division Cycle in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular & General Genetics : MGG* 146(2):167–78.
- Nurse, Paul. 1975. "Genetic Control of Cell Size at Cell Division in Yeast." *Nature* 256(5518):547–51.
- Nurse, Paul. 1990. "Universal Control Mechanism Regulating Onset of M-Phase." *Nature* 344(6266):503–8.
- Nurse, Paul and Yvonne Bissett. 1981. "Gene Required in G1 for Commitment to Cell Cycle and in G2 for Control of Mitosis in Fission Yeast." *Nature* 292(5823):558–60.

BIBLIOGRAFIA

- O'Connell, Matthew J., Jeanette M. Raleigh, Heather M. Verkade, and Paul Nurse. 1997. "Chk1 Is a Wee1 Kinase in the G₂ DNA Damage Checkpoint Inhibiting Cdc2 by Y15 Phosphorylation." *EMBO Journal* 16(3):545–54.
- Ohkura, Hiroyuki, Iain M. Hagan, and David M. Glover. 1995. "The Conserved Schizosaccharomyces Pombe Kinase Plo1, Required to Form a Bipolar Spindle, the Actin Ring, and Septum, Can Drive Septum Formation in G₁ and G₂ Cells." *Genes and Development* 9(9):1059–73.
- Ohmae, Shogo, Sayaka Takemoto-Kimura, Michiko Okamura, Aki Adachi-Morishima, Mio Nonaka, Toshimitsu Fuse, Satoshi Kida, Masahiro Tanji, Tomoyuki Furuyashiki, Yoshiki Arakawa, Shuh Narumiya, Hiroyuki Okuno, and Haruhiko Bito. 2006. "Molecular Identification and Characterization of a Family of Kinases with Homology to Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases I/IV." *Journal of Biological Chemistry* 281(29):20427–39.
- Ohmiya, Ryusuke, Chinatsu Kato, Hisami Yamada, Hirofumi Aiba, and Takeshi Mizuno. 1999. *A Fission Yeast Gene (Prr1+) That Encodes a Response Regulator Implicated in Oxidative Stress Response*. Vol. 125.
- Olson, Bradley J. S. C. 2016. "Assays for Determination of Protein Concentration." *Current Protocols in Pharmacology* 73(1).
- Opalko, Hannah E. and James B. Moseley. 2017. "Dynamic Regulation of Cdr1 Kinase Localization and Phosphorylation during Osmotic Stress." *Journal of Biological Chemistry* 292(45):18457–68.
- Opalko, Hannah E., Isha Nasa, Arminja N. Kettenbach, and James B. Moseley. 2019. "A Mechanism for How Cdr1/Nim1 Kinase Promotes Mitotic Entry by Inhibiting Wee1" edited by D. J. Lew. *Molecular Biology of the Cell* 30(25):3015–23.
- Ottillie, S., J. Chernoff, G. Hannig, C. S. Hoffman, and R. L. Erikson. 1992. "The

- Fission Yeast Genes Pyp1+ and Pyp2+ Encode Protein Tyrosine Phosphatases That Negatively Regulate Mitosis." *Molecular and Cellular Biology* 12(12):5571–80.
- Padte, Neal N., Sophie G. Martin, Martin Howard, and Fred Chang. 2006. "The Cell-End Factor Pom1p Inhibits Mid1p in Specification of the Cell Division Plane in Fission Yeast." *Current Biology* 16(24):2480–87.
- Paoletti, A. and F. Chang. 2000. "Analysis of Mid1p, a Protein Required for Placement of the Cell Division Site, Reveals a Link between the Nucleus and the Cell Surface in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 11(8):2757–73.
- Parker, Laura L. and Helen Piwnica-Worms. 1992. "Inactivation of the P34cdc2-Cyclin B Complex by the Human WEE1 Tyrosine Kinase." *Science* 257(5078):1955–57.
- Parker, Laura L., Sarah A. Walter, Paul G. Young, and Helen Piwnica-Worms. 1993. "Phosphorylation and Inactivation of the Mitotic Inhibitor Weel by the Nim1/Cdr1 Kinase." *Nature* 363(6431):736–38.
- Paul, Aditya and Thomas Pollard. 2008. "The Role of the FH1 Domain and Profilin in Formin-Mediated Actin-Filament Elongation and Nucleation." *Current Biology* 18(1):9–19.
- Pelham, Robert J. and Fred Chang. 2002. "Actin Dynamics in the Contractile Ring during Cytokinesis in Fission Yeast." *Nature* 419(6902):82–86.
- Peng, Cheng Yuan, Paul R. Graves, Richard S. Thoma, Zhiqi Wu, Andrey S. Shaw, and Helen Piwnica-Worms. 1997. "Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25c on Serine-216." *Science* 277(5331):1501–5.

BIBLIOGRAFIA

- Perez, Pilar and Jose Cansado. 2011. "Cell Integrity Signaling and Response to Stress in Fission Yeast." *Current Protein & Peptide Science* 11(8):680–92.
- Pérez, Pilar, Juan C. G. Cortés, Rebeca Martín-García, and Juan C. Ribas. 2016. "Overview of Fission Yeast Septation." *Cellular Microbiology* 18(9):1201–7.
- Peterlin, B. Matija and David H. Price. 2006. "Controlling the Elongation Phase of Transcription with P-TEFb." *Molecular Cell* 23(3):297–305.
- Petersen, Janni and Iain M. Hagan. 2005. "Polo Kinase Links the Stress Pathway to Cell Cycle Control and Tip Growth in Fission Yeast." *Nature* 435(7041):507–12.
- Petersen, Janni and Paul Nurse. 2007. "TOR Signalling Regulates Mitotic Commitment through the Stress MAP Kinase Pathway and the Polo and Cdc2 Kinases." *Nature Cell Biology* 9(11):1263–72.
- Pollard, Thomas D. and Jian Qiu Wu. 2010. "Understanding Cytokinesis: Lessons from Fission Yeast." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(2):149–55.
- Pu, Kai Ming, Matthew Akamatsu, and Thomas D. Pollard. 2015. "The Septation Initiation Network Controls the Assembly of Nodes Containing Cdr2p for Cytokinesis in Fission Yeast." *Journal of Cell Science* 128(3):441–46.
- Puig, Oscar, Friederike Caspary, Guillaume Rigaut, Berthold Rutz, Emmanuelle Bouveret, Elisabeth Bragado-Nilsson, Matthias Wilm, and Bertrand Séraphin. 2001. "The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification." *Methods* 24(3):218–29.
- Quinn, Janet, Victoria J. Findlay, Keren Dawson, Jonathan B. A. Millar, Nic Jones, Brian A. Morgan, and W. Mark Toone. 2002. "Distinct Regulatory Proteins Control the Graded Transcriptional Response to Increasing H₂O₂ Levels in Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular Biology of the Cell*

13(3):805–16.

Rasmussen, Colin D. 2000. "Cloning of a Calmodulin Kinase I Homologue from *Schizosaccharomyces Pombe*." *Journal of Biological Chemistry* 275(1):685–90.

Ray, Samriddha, Kazunori Kume, Sneha Gupta, Wanzhong Ge, Mohan Balasubramanian, Dai Hirata, and Dannel McCollum. 2010. "The Mitosis-to-Interphase Transition Is Coordinated by Cross Talk between the SIN and MOR Pathways in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Journal of Cell Biology* 190(5):793–805.

Reiter, Wolfgang, Stephen Watt, Keren Dawson, Clare L. Lawrence, Jürg Bähler, Nic Jones, and Caroline R. M. Wilkinson. 2008. "Fission Yeast MAP Kinase Sty1 Is Recruited to Stress-Induced Genes." *Journal of Biological Chemistry* 283(15):9945–56.

Reynolds, Nicola and Hiroyuki Ohkura. 2003. "Polo Boxes Form a Single Functional Domain That Mediates Interactions with Multiple Proteins in Fission Yeast Polo Kinase." *Journal of Cell Science* 116(7):1377–87.

Roberts-Galbraith, Rachel H., Jun Song Chen, Jianqiu Wang, and Kathleen L. Gould. 2009. "The SH3 Domains of Two PCH Family Members Cooperate in Assembly of the *Schizosaccharomyces Pombe* Contractile Ring." *Journal of Cell Biology* 184(1):113–27.

Roberts-Galbraith, Rachel H. and Kathleen L. Gould. 2008. "Stepping into the Ring: The SIN Takes on Contractile Ring Assembly." *Genes and Development* 22(22):3082–88.

Rodríguez-Gabriel, Miguel A., Gavin Burns, W. Hayes McDonald, Victoria Martín, John R. Yates, Jürg Bähler, and Paul Russell. 2003. "RNA-Binding Protein

BIBLIOGRAFIA

Csx1 Mediates Global Control of Gene Expression in Response to Oxidative Stress." *EMBO Journal* 22(23):6256–66.

Rodríguez-Gabriel, Miguel A. and Paul Russell. 2005. "Distinct Signaling Pathways Respond to Arsenite and Reactive Oxygen Species in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Eukaryotic Cell* 4(8):1396–1402.

Rupeš, Ivan, Zhengping Jia, and Paul G. Young. 1999. "Ssp1 Promotes Actin Depolymerization and Is Involved in Stress Response and New End Take-off Control in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 10(5):1495–1510.

Russell, Paul and Paul Nurse. 1986. "Cdc25+ Functions as an Inducer in the Mitotic Control of Fission Yeast." *Cell* 45(1):145–53.

Russell, Paul and Paul Nurse. 1987. "Negative Regulation of Mitosis by Wee1+, a Gene Encoding a Protein Kinase Homolog." *Cell* 49(4):559–67.

Sabatinos, Sarah A. and Susan L. Forsburg. 2015. "Measuring DNA Content by Flow Cytometry in Fission Yeast." *Methods in Molecular Biology* 1300:79–97.

Saberianfar, Reza, Stephen Cunningham-Dunlop, and Jim Karagiannis. 2011. "Global Gene Expression Analysis of Fission Yeast Mutants Impaired in Ser-2 Phosphorylation of the RNA Pol II Carboxy Terminal Domain" edited by M. Polymenis. *PLoS ONE* 6(9):e24694.

Samejima, Itaru, Shaun Mackie, and Peter A. Fantes. 1997. "Multiple Modes of Activation of the Stress-Responsive MAP Kinase Pathway in Fission Yeast." *EMBO Journal* 16(20):6162–70.

Samejima, Itaru, Shaun Mackie, Emma Warbrick, Ronit Weisman, and Peter A. Fantes. 1998. "The Fission Yeast Mitotic Regulator Win1+ Encodes an MAP Kinase Kinase Kinase That Phosphorylates and Activates Wis1 MAP Kinase

- Kinase in Response to High Osmolarity." *Molecular Biology of the Cell* 9(8):2325–35.
- Sanchez-Marinas, Marta, David Gimenez-Zaragoza, Edgar Martin-Ramos, Julia Llanes, José Cansado, Maria Jesús Pujol, Oriol Bachs, and Rosa Aligue. 2018. "Cmk2 Kinase Is Essential for Survival in Arsenite by Modulating Translation Together with RACK1 Orthologue Cpc2 in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Free Radical Biology and Medicine* 129:116–26.
- Sánchez-Mir, Laura, Clàudia Salat-Canela, Esther Paulo, Mercè Carmona, José Ayté, Baldo Oliva, and Elena Hidalgo. 2018. "Phospho-Mimicking Atf1 Mutants Bypass the Transcription Activating Function of the MAP Kinase Sty1 of Fission Yeast." *Current Genetics* 64(1):97–102.
- Sánchez-Piris, Maribel, Francesc Posas, Vicenc Alemany, Ingeborg Winge, Elena Hidalgo, Oriol Bachs, and Rosa Aligue. 2002. "The Serine/Threonine Kinase Cmk2 Is Required for Oxidative Stress Response in Fission Yeast." *Journal of Biological Chemistry* 277(20):17722–27.
- Satoh, Ryosuke, Takahiro Morita, Hirofumi Takada, Ayako Kita, Shunji Ishiwata, Akira Doi, Kanako Hagihara, Atsushi Taga, Yasuhiro Matsumura, Hideki Tohda, and Reiko Sugiura. 2009. "Role of the RNA-Binding Protein Nrd1 and Pmk1 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Regulation of Myosin mRNA Stability in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 20(9):2473–85.
- Selhuber-Unkel, Christine, Pernille Yde, Kirstine Berg-Sørensen, and Lene B. Oddershede. 2009. "Variety in Intracellular Diffusion during the Cell Cycle." *Physical Biology* 6(2).
- Shannon, Katie B. 2012. "IQGAP Family Members in Yeast, *Dictyostelium*, and

BIBLIOGRAFIA

Mammalian Cells." *International Journal of Cell Biology*.

Shieh, Jia Ching, Marc G. Wilkinson, Vicky Buck, Brian A. Morgan, Kozo Makino, and Jonathan B. A. Millar. 1997. "The Mcs4 Response Regulator Coordinately Controls the Stress-Activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP Kinase Pathway and Fission Yeast Cell Cycle." *Genes and Development* 11(8):1008–22.

Shiozaki, K., H. Akhavan-Niaki, C. H. McGowan, and P. Russell. 1994. "Protein Phosphatase 2C, Encoded by Ptc1+, Is Important in the Heat Shock Response of *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular and Cellular Biology* 14(6):3742–51.

Shiozaki, K. and P. Russell. 1995. "Counteractive Roles of Protein Phosphatase 2C (PP2C) and a MAP Kinase Kinase Homolog in the Osmoregulation of Fission Yeast." *The EMBO Journal* 14(3):492–502.

Shiozaki, Kazuhiro and Paul Russell. 1996. "Conjugation, Meiosis, and the Osmotic Stress Response Are Regulated by Spc1 Kinase through Atf1 Transcription Factor in Fission Yeast." *Genes and Development* 10(18):2276–88.

Shiozaki, Kazuhiro, Mitsue Shiozaki, and Paul Russell. 1997. "Mcs4 Mitotic Catastrophe Suppressor Regulates the Fission Yeast Cell Cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 Kinase Cascade." *Molecular Biology of the Cell* 8(3):409–19.

Simanis, Viesturs. 2015. "Pombe's Thirteen - Control of Fission Yeast Cell Division by the Septation Initiation Network." *Journal of Cell Science* 128(8):1465–74.

Spiczki, Matthias. 2000. "Where Does Fission Yeast Sit on the Tree of Life?" *Genome Biology* 1(2).

- Skau, Colleen T., Erin M. Neidt, and David R. Kovar. 2009. "Role of Tropomyosin in Formin-Mediated Contractile Ring Assembly in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 20(8):2160–73.
- Smith, Deborah A., W. Mark Toone, Dongrong Chen, Jürg Bähler, Nic Jones, Brian A. Morgan, and Janet Quinn. 2002. "The *Srk1* Protein Kinase Is a Target for the *Sty1* Stress-Activated MAPK in Fission Yeast." *Journal of Biological Chemistry* 277(36):33411–21.
- Sohrmann, Marc, Christian Fankhauser, Claudia Brodbeck, and Viesturs Simanis. 1996. "The *Dmf1/Mid1* Gene Is Essential for Correct Positioning of the Division Septum in Fission Yeast." *Genes and Development* 10(21):2707–19.
- Sohrmann, Marc, Susanne Schmidt, Iain Hagan, and Viesturs Simanis. 1998. "Asymmetric Segregation on Spindle Poles of the Schizosaccharomyces *Pombe* Septum-Inducing Protein Kinase *Cdc7p*." *Genes and Development* 12(1):84–94.
- Son, Yong, Yong-Kwan Cheong, Nam-Ho Kim, Hun-Taeg Chung, Dae Gill Kang, and Hyun-Ock Pae. 2011. "Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?" *Journal of Signal Transduction* 2011.
- Soto, Teresa, Francisco F. Beltrán, Vanessa Paredes, Marisa Madrid, Jonathan B. A. Millar, Jero Vicente-Soler, José Cansado, and Mariano Gacto. 2002. "Cold Induces Stress-Activated Protein Kinase-Mediated Response in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *European Journal of Biochemistry* 269(20):5056–65.
- Soto, Teresa, Andrés Núñez, Marisa Madrid, Jero Vicente, Mariano Gacto, and Jose Cansado. 2007. "Transduction of Centrifugation-Induced Gravity

BIBLIOGRAFIA

- Forces through Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Microbiology* 153(5):1519–29.
- Sparks, Cynthia A., Mary Morphew, and Dannel McCollum. 1999. "Sid2p, a Spindle Pole Body Kinase That Regulates the Onset of Cytokinesis." *Journal of Cell Biology* 146(4):777–90.
- De St. Groth, S. Fazekas, R. G. Webster, and A. Datyner. 1963. "Two New Staining Procedures for Quantitative Estimation of Proteins on Electrophoretic Strips." *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 71(C):377–91.
- Sugiura, Reiko, Ayako Kita, Yasuhito Shimizu, Hisato Shuntoh, Susie O. Slo, and Takayoshi Kuno. 2003. "Feedback Regulation of MAPK Signalling by an RNA-Binding Protein." *Nature* 424(6951):961–65.
- Sugiura, Reiko, Takashi Toda, Susheela Dhut, Hisato Shuntoh, and Takayoshi Kuno. 1999. "The MAPK Kinase Pek1 Acts as a Phosphorylation-Dependent Molecular Switch." *Nature* 399(6735):479–83.
- Sugiura, Reiko, Takashi Toda, Hisato Shuntoh, Mitsuhiro Yanagida, and Takayoshi Kuno. 1998. "Pmp1+, a Suppressor of Calcineurin Deficiency, Encodes a Novel MAP Kinase Phosphatase in Fission Yeast." *EMBO Journal* 17(1):140–48.
- Sukegawa, Yuko, Akira Yamashita, and Masayuki Yamamoto. 2011. "The Fission Yeast Stress-Responsive MAPK Pathway Promotes Meiosis via the Phosphorylation of Pol II CTD in Response to Environmental and Feedback Cues" edited by M. Lichten. *PLoS Genetics* 7(12):e1002387.
- Sveiczzer, Ákos and Anna Horváth. 2017. "How Do Fission Yeast Cells Grow and Connect Growth to the Mitotic Cycle?" *Current Genetics* 63(2):165–73.
- Swaffer, Matthew P., Andrew W. Jones, Helen R. Flynn, Ambrosius P. Snijders, and Paul Nurse. 2016. "CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the

- Cell Cycle." *Cell* 167(7):1750-1761.e16.
- Takada, Hirofumi, Aiko Nishida, Mitsuhiro Domae, Ayako Kita, Yuki Yamano, Atsushi Uchida, Shunji Ishiwata, Yue Fang, Xin Zhou, Takashi Masuko, Mitsuhiro Kinoshita, Kazuaki Kakehi, and Reiko Sugiura. 2010. "The Cell Surface Protein Gene *Ecm33+* Is a Target of the Two Transcription Factors *Atf1* and *Mbx1* and Negatively Regulates *Pmk1* MAPK Cell Integrity Signaling in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 21(4):674–85.
- Takada, Hirofumi, Masayuki Nishimura, Yuta Asayama, Yoshiaki Mannse, Shunji Ishiwata, Ayako Kita, Akira Doi, Aiko Nishida, Naoyuki Kai, Sayako Moriuchi, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama, Takayoshi Kuno, and Reiko Sugiura. 2007. "Atf1 Is a Target of the Mitogen-Activated Protein Kinase *Pmk1* and Regulates Cell Integrity in Fission Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 18(12):4794–4802.
- Takaine, Masak, Osamu Numata, and Kentaro Nakano. 2009. "Fission Yeast IQGAP Arranges Actin Filaments into the Cytokinetic Contractile Ring." *EMBO Journal* 28(20):3117–31.
- Takeda, T., T. Toda, K. Kominami, A. Kohnosu, M. Yanagida, and N. Jones. 1995. "Schizosaccharomyces Pombe *Atf1+* Encodes a Transcription Factor Required for Sexual Development and Entry into Stationary Phase." *The EMBO Journal* 14(24):6193–6208.
- Tanaka, Kayoko, Janni Petersen, Fiona MacIver, Daniel P. Mulvihill, David M. Glover, and Iain M. Hagan. 2001. "The Role of *Plo1* Kinase in Mitotic Commitment and Septation in Schizosaccharomyces Pombe." *EMBO Journal* 20(6):1259–70.
- Tasto, Joseph J., Jennifer L. Morrell, and Kathleen L. Gould. 2003. "An Anillin Homologue, *Mid2p*, Acts during Fission Yeast Cytokinesis to Organize the

BIBLIOGRAFIA

Septin Ring and Promote Cell Separation." *Journal of Cell Biology* 160(7):1093–1103.

Thuriaux, Pierre, Paul Nurse, and Bruce Carter. 1978. "Mutants Altered in the Control Co-Ordinating Cell Division with Cell Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *MGG Molecular & General Genetics* 161(2):215–20.

Toda, T., S. Dhut, G. Superti-Furga, Y. Gotoh, E. Nishida, R. Sugiura, and T. Kuno. 1996. "The Fission Yeast Pmk1+ Gene Encodes a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog Which Regulates Cell Integrity and Functions Coordinately with the Protein Kinase C Pathway." *Molecular and Cellular Biology* 16(12):6752–64.

Toda, T., M. Shimanuki, and M. Yanagida. 1991. "Fission Yeast Genes That Confer Resistance to Staurosporine Encode an AP-1-like Transcription Factor and a Protein Kinase Related to the Mammalian ERK1/MAP2 and Budding Yeast FUS3 and KSS1 Kinases." *Genes and Development* 5(1):60–73.

Toone, W. Mark, Shusuke Kuge, Michael Samuels, Brian A. Morgan, Takashi Toda, and Nic Jones. 1998. "Regulation of the Fission Yeast Transcription Factor Pap1 by Oxidative Stress: Requirement for the Nuclear Export Factor Crm1 (Exportin) and the Stress-Activated MAP Kinase Sty1/Spc1." *Genes and Development* 12(10):1453–63.

Trautmann, Susanne and Dannel McCollum. 2005. "Distinct Nuclear and Cytoplasmic Functions of the *S. Pombe* Cdc14-like Phosphatase Clp1p/Flp1p and a Role for Nuclear Shuttling in Its Regulation." *Current Biology* 15(15):1384–89.

Trautmann, Susanne, Srividya Rajagopalan, and Dannel McCollum. 2004. "The S.

- Pombe Cdc14-like Phosphatase Clp1p Regulates Chromosome Biorientation and Interacts with Aurora Kinase." *Developmental Cell* 7(5):755–62.
- Trautmann, Susanne, Benjamin A. Wolfe, Paul Jorgensen, Mike Tyers, Kathleen L. Gould, and Dannel McCollum. 2001. "Fission Yeast Clp1p Phosphatase Regulates G2/M Transition and Coordination of Cytokinesis with Cell Cycle Progression." *Current Biology* 11(12):931–40.
- Vanoosthuyse, Vincent and Kevin G. Hardwick. 2005. "Bub1 and the Multilayered Inhibition of Cdc20-APC/C in Mitosis." *Trends in Cell Biology* 15(5):231–33.
- Vavylonis, Dimitrios, Jian Qiu Wu, Steven Hao, Ben O'Shaughnessy, and Thomas D. Pollard. 2008. "Assembly Mechanism of the Contractile Ring for Cytokinesis by Fission Yeast." *Science* 319(5859):97–100.
- Viana, Raul A., Mario Pinar, Teresa Soto, Pedro M. Coll, Jose Cansado, and Pilar Pérez. 2013. "Negative Functional Interaction between Cell Integrity MAPK Pathway and Rho1 GTPase in Fission Yeast." *Genetics* 195(2):421–32.
- Viladevall, Laia, Courtney V. St. Amour, Adam Rosebrock, Susanne Schneider, Chao Zhang, Jasmina J. Allen, Kevan M. Shokat, Beate Schwer, Janet K. Leatherwood, and Robert P. Fisher. 2009. "TFIIH and P-TEFb Coordinate Transcription with Capping Enzyme Recruitment at Specific Genes in Fission Yeast." *Molecular Cell* 33(6):738–51.
- Wachtler, Volker, Yinyi Huang, Jim Karagiannis, and Mohan K. Balasubramanian. 2006. "Cell Cycle-Dependent Roles for the FCH-Domain Protein Cdc15p in Formation of the Actomyosin Ring in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Molecular Biology of the Cell* 17(7):3254–66.

BIBLIOGRAFIA

- Wang, L. -y., K. Shimada, M. Morishita, and K. Shiozaki. 2005. "Response of Fission Yeast to Toxic Cations Involves Cooperative Action of the Stress-Activated Protein Kinase Spc1/Sty1 and the Hal4 Protein Kinase." *Molecular and Cellular Biology* 25(10):3945–55.
- Warbrick, E. and P. A. Fantes. 1991. "The Wis1 Protein Kinase Is a Dosage-Dependent Regulator of Mitosis in *Schizosaccharomyces Pombe*." *The EMBO Journal* 10(13):4291–99.
- Watanabe, Y. and M. Yamamoto. 1996. "Schizosaccharomyces Pombe Pcr1+ Encodes a CREB/ATF Protein Involved in Regulation of Gene Expression for Sexual Development." *Molecular and Cellular Biology* 16(2):704–11.
- Wilhelm, Brian T., Samuel Marguerat, Stephen Watt, Falk Schubert, Valerie Wood, Ian Goodhead, Christopher J. Penkett, Jane Rogers, and Jürg Bähler. 2008. "Dynamic Repertoire of a Eukaryotic Transcriptome Surveyed at Single-Nucleotide Resolution." *Nature* 453(7199):1239–43.
- WILKINSON, MARC G. and JONATHAN B. A. MILLAR. 2000. "Control of the Eukaryotic Cell Cycle by MAP Kinase Signaling Pathways." *The FASEB Journal* 14(14):2147–57.
- Wilkinson, Marc G., Michael Samuels, Tadayuki Takeda, W. Mark Toone, Jia Ching Shieh, Takashi Toda, Jonathan B. A. Millar, and Nie Jones. 1996. "The Atf1 Transcription Factor Is a Target for the Sty1 Stress-Activated MAP Kinase Pathway in Fission Yeast." *Genes and Development* 10(18):2289–2301.
- Wissinger, W. L. and R. J. Wang. 1983. "Cell Cycle Mutants." *International Review of Cytology. Supplement* 15:91–113.
- Wolfe, Benjamin A. and Kathleen L. Gould. 2004. "Fission Yeast Clp1p Phosphatase Affects G2/M Transition and Mitotic Exit through Cdc25p

- Inactivation." *EMBO Journal* 23(4):919–29.
- Wolfe, Benjamin A. and Kathleen L. Gould. 2005. "Split Decisions: Coordinating Cytokinesis in Yeast." *Trends in Cell Biology* 15(1):10–18.
- Wolfe, Benjamin A., W. Hayes McDonald, John R. R. Yates, and Kathleen L. Gould. 2006. "Phospho-Regulation of the Cdc14/Clp1 Phosphatase Delays Late Mitotic Events in *S. Pombe*." *Developmental Cell* 11(3):423–30.
- Wu, Jian Qiu, Jeffrey R. Kuhn, David R. Kovar, and Thomas D. Pollard. 2003. "Spatial and Temporal Pathway for Assembly and Constriction of the Contractile Ring in Fission Yeast Cytokinesis." *Developmental Cell* 5(5):723–34.
- Wu, Jian Qiu and Thomas D. Pollard. 2005. "Cell Biology: Counting Cytokinesis Proteins Globally and Locally in Fission Yeast." *Science* 310(5746):310–14.
- Wu, Jian Qiu, Vladimir Sirotkin, David R. Kovar, Matthew Lord, Christopher C. Beltzner, Jeffrey R. Kuhn, and Thomas D. Pollard. 2006. "Assembly of the Cytokinetic Contractile Ring from a Broad Band of Nodes in Fission Yeast." *Journal of Cell Biology* 174(3):391–402.
- Wu, Lin and Paul Russell. 1993. "Nim1 Kinase Promotes Mitosis by Inactivating Wee1 Tyrosine Kinase." *Nature* 363(6431):738–41.
- Yamashita, Akira, Takeshi Sakuno, Yoshinori Watanabe, and Masayuki Yamamoto. 2017. "Analysis of *Schizosaccharomyces Pombe* Meiosis." *Cold Spring Harbor Protocols* 2017(9):681–89.
- Yanagida, Mitsuhiro, Nobuyasu Ikai, Mizuki Shimanuki, and Kenichi Sajiki. 2011. "Nutrient Limitations Alter Cell Division Control and Chromosome Segregation through Growth-Related Kinases and Phosphatases." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*

BIBLIOGRAFIA

366(1584):3508–20.

Yonetani, Ann, Raymond J. Lustig, James B. Moseley, Tetsuya Takeda, Bruce L. Goode, and Fred Chang. 2008. “Regulation and Targeting of the Fission Yeast Formin Cdc12p in Cytokinesis.” *Molecular Biology of the Cell* 19(5):2208–19.

Zhang, Dan, Aleksandar Vjestica, and Snezhana Oliferenko. 2010. “The Cortical ER Network Limits the Permissive Zone for Actomyosin Ring Assembly.” *Current Biology* 20(11):1029–34.

Zhou, Xin, Yan Ma, Reiko Sugiura, Daiki Kobayashi, Masahiro Suzuki, Lu Deng, and Takayoshi Kuno. 2010. “MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK)-Dependent and -Independent Activation of Sty1 Stress MAPK in Fission Yeast * □ S.”

Zuin, Alice, Mercè Carmona, Isabel Morales-Ivorra, Natalia Gabrielli, Ana P. Vivancos, José Ayté, and Elena Hidalgo. 2010. “Lifespan Extension by Calorie Restriction Relies on the Sty1 MAP Kinase Stress Pathway.” *EMBO Journal* 29(5):981–91.