

## La ruta de señalización de MAPK Pmk1p y el mantenimiento de la integridad celular del *Schizosaccharomyces Pombe*

## The signaling pathway of MAPK Pmk1p and the maintenance of cellular integrity of the *Schizosaccharomyces Pombe*

### Autores:

Sandra Margarita Cruz Quintana<sup>1</sup>

Pedro Díaz Sjostrom<sup>1</sup>

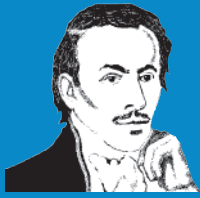
<sup>1</sup>Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca, Cevallos, Ecuador.

**Autor de correspondencia:** Sandra Margarita Cruz Quintana, teléfono: 0997061390, dirección postal: Río Upano y Panamericana Norte, Riobamba, email: sm.cruz@uta.edu.ec

### RESUMEN

En *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito tres cascadas de MAPKs: la de respuesta feromonas, con Spk1p como MAP kinasa; la de respuesta a estrés en la que Sty1p/Spc1p es la MAPK y la de mantenimiento de la integridad celular liderada por Pmk1p/Spm1p. La eliminación de cualquiera de las kinasas de la ruta de integridad provoca alteraciones morfológicas y células multitebadas en condiciones de estrés. Todos estos defectos sugieren una función en homeostasis iónica y en la biosíntesis de la pared celular por lo que nos proponemos estudiar el papel de la ruta de señalización de MAPK Pmk1p en el mantenimiento de la integridad celular en *S.pombe*. En este trabajo el organismo mayoritariamente utilizado ha sido la levadura de fisión *S. pombe* y para realizar los trabajos de clonación molecular se utilizaron también diferentes estirpes de *Escherichia coli*. Se emplearon diversas técnicas de clonación molecular, métodos genéticos, Western Blot y determinación de la actividad de Pmk1p bajo condiciones de estrés. Las conclusiones más importantes fueron: que los “sensores” “Mtl2p y Wsc1p” señalizan hacia Rho1p, pero no son componentes “auténticos” de la cascada, y sus mutantes no presentan el fenotipo VIC (viable en presencia de inmunosupresor y de iones cloruro), característico de los mutantes en los componentes de la cascada. Mtl2p y Wsc1p no desempeñan un papel importante en la señalización en respuesta a estrés osmótico y daño en la pared celular a través de la ruta de integridad celular de Pmk1p.

**Palabras clave:** schizosaccharomyces, pared celular, biomarcadores.



## ABSTRACT

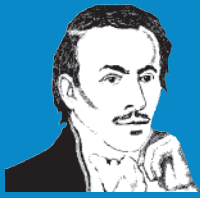
Three cascades of MAPKs have been described about the *Schizosaccharomyces pombe* such as: the pheromone response with Spk1p as MAP kinase, the stress response in which Sty1p/Spc1p is MAPK, and the maintenance of cell integrity led by Pmk1p/Spm1p. The elimination of any of the kinases of the integrity path causes morphological alterations and multibicated cells under stress conditions; suggesting a role in ionic homeostasis and cell wall biosynthesis. So, it was proposed to study the role of the MAPK Pmk1p signaling pathway in the maintenance of cell integrity in *S.pombe*. The organism mainly used was the fission yeast *S. pombe* and different molecular strains of *Escherichia coli* were used to carry out the molecular cloning work. Different techniques of molecular cloning, genetic methods, Western Blot and determination of the activity of Pmk1p under stress conditions were used. The most important conclusions were that the "sensors" "Mtl2p and Wsc1p" signal towards Rho1p but they are not "authentic" components of the cascade, and their mutants do not present the Vic phenotype (viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion), characteristic of the mutants in the components of the cascade. Mtl2p and Wsc1p do not play an important role in signaling in response to osmotic stress and cell wall damage through the cellular integrity pathway of Pmk1p.

**Keywords:** schizosaccharomyces, cell wall, biomarkers.

## INTRODUCCIÓN

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) fue descrita por primera vez en 1883 por P. Lindner. El nombre genérico hace referencia a su semejanza con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), mientras que el epíteto específico designaba el nombre local de la cerveza elaborada con esta levadura. En los últimos 25 años, ese microorganismo se ha convertido en un organismo atractivo para el estudio de multitud de procesos biológicos sobre todo los que conciernen a la maquinaria de crecimiento y división celular.<sup>(1,2)</sup> El mismo resulta fácil de manipular en el laboratorio, no es patógeno, presenta ciclos de vida y sexual de corta duración, además de ser susceptible de análisis genético clásico y molecular debido a la secuenciación de su genoma.<sup>(3)</sup>

*S. pombe* pertenece a los ascomicetos al igual que *S. cerevisiae*; sin embargo, los estudios de comparación de las secuencias de proteínas ortólogas de diversos grupos de hongos sugieren que el primero divergió de la línea troncal de los ascomicetos hace 1.144 millones de años.<sup>(4,5)</sup> Esa característica evolutiva se refleja en los ciclos de vida y la regulación del ciclo celular en ambos microorganismos.



*S. pombe* resulta ideal para la realización de estudios de morfogénesis y polaridad, ya que su forma, tamaño y su ciclo de división celular son extremadamente reproducibles en el laboratorio, además se pueden obtener mutantes con morfologías aberrantes sin pérdida de la viabilidad.<sup>(6)</sup>

Alrededor del *S. pombe* se describen tres cascadas de MAPKs hasta el momento: 1) de respuesta feromonas, con Spk1p como MAP kinasa;<sup>(7)</sup> 2) de respuesta a estrés en la que Sty1p/Spc1p es la MAPK<sup>(8)</sup> y 3) de mantenimiento de la integridad celular liderada por Pmk1p/Spm1p (MAPK).

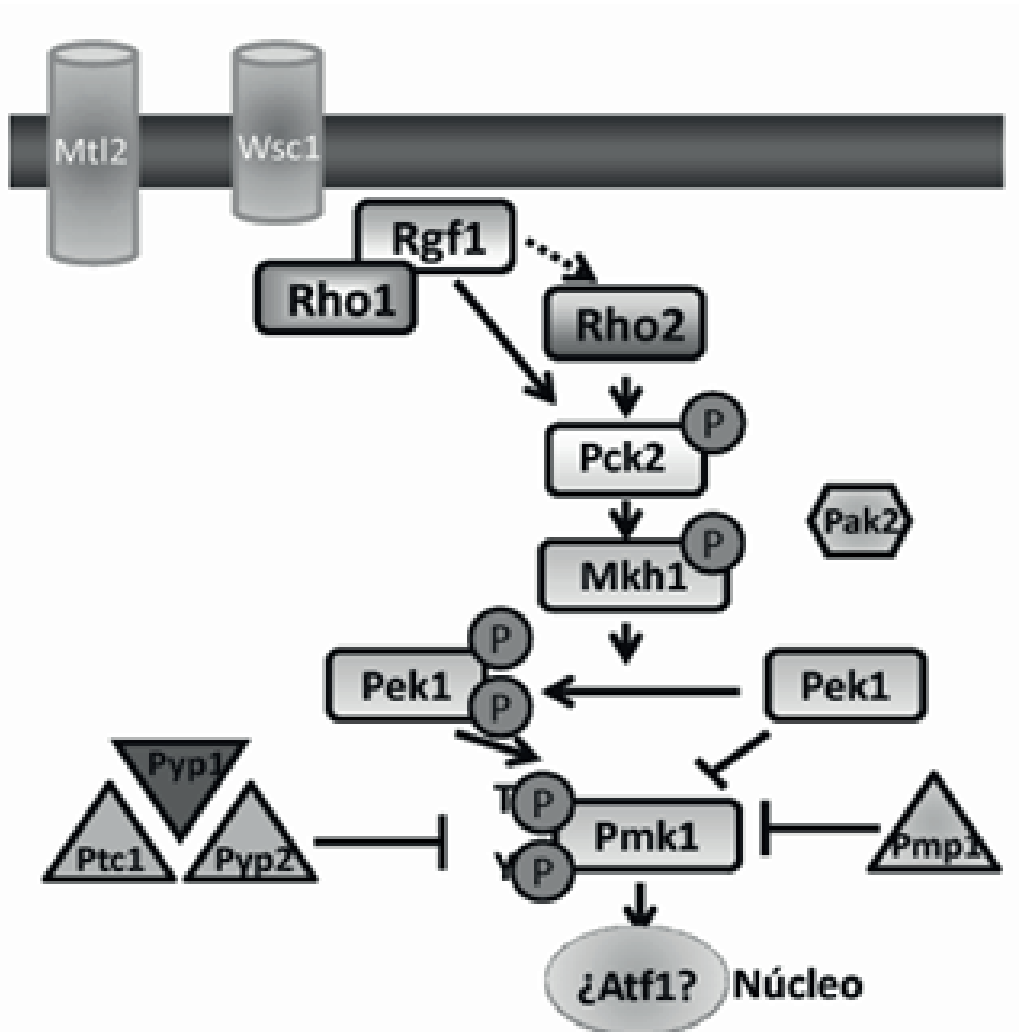
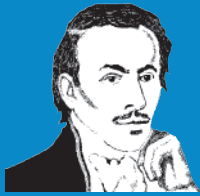
En relación con *S. cerevisiae*, la ruta de señalización más importante que controla el ensamblaje de la pared es la ruta PKC.<sup>(9,10)</sup> Esta lleva un módulo “sensor” o “módulo de detección” que activa a Rho1p y que a su vez activa a Pkc1p y el módulo de MAP kinasas. La detección es llevada a cabo por proteínas de la familia Wsc (Wsc1p, Wsc2p y Wsc3p) y el par Mid2-Mtl1p y cada grupo parece responder a distintos estímulos. Por ejemplo, Wsc1p es importante para sobrevivir al estrés térmico y un mutante *wsc1Δ* presenta un defecto en la activación por “heat-shock” de Mpk1p (la MAP Kinasa de la ruta).<sup>(11,12)</sup>

La ruta de integridad o ruta PKC en *S. cerevisiae* regula la biosíntesis de la pared celular durante los periodos de crecimiento polarizado como la gemación, la formación de la proyección sexual y la conjugación, además de ser necesaria para responder al estrés. Las señales se inician en la membrana plasmática a través de los “sensores” de superficie (Wsc1p, Mid2p...etc) que junto a los GEFs estimulan el intercambio de nucleótido de Rho1p y lo activan. Rho1p activa a sus efectores que incluyen a Pkc1p y la cascada de MAP kinasas, la  $\beta$ -GS, las forminas y alguno de los componentes del exocisto.

También existe la llamada “ruta de integridad” en *S. pombe*, la que está integrada por un módulo de tres MAP Kinasas liderado por Pmk1p que es la MAP kinasa. Sin embargo, apenas se conoce su participación en la biosíntesis de la pared celular o en otros procesos; así como, los “sensores” que transmiten la señal de daños en la pared u otros tipos de estrés al módulo de MAP kinasas. Entre los reguladores positivos de la cascada está Rgf1p (GEF de Rho1p), la GTPasa Rho2p y Pck2p el homólogo de Pkc1p en *S. cerevisiae*.

La cascada de señalización de mantenimiento de la integridad celular en *S. pombe* está constituida por tres kinasas Mkh1p, Pek1p/Shk1p y Pmk1p/Spm1p (Figura 1).<sup>(13-18)</sup> (Figura 1).

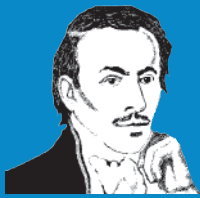
**Figura 1. Ruta de integridad en *Schyzosaccharomyces pombe***



Cuando en la célula se producen daños en la pared a otros tipos de estrés como estrés osmótico, etc), una señal es probablemente transmitida a un sensor de superficie que activa a Rgf1p/Rho1p, a Rho2p y/o a otra molécula todavía no identificada. Esta señal activa a Pck2p, que a su vez activa a Mkh1p y con ello al módulo de MAPK Mkh1p-Pek1p-Pmk1p. Se desconoce la activación transcripcional que desencadena en el núcleo la fosforilación de Pmk1p. Las fosfatasas Pmp1p, Pyp1p, Pyp2p y Ptc1p son necesarias para inactivar a Pmk1p, una vez transmitida la señal.

La eliminación de cualquiera de estas kinasas provoca alteraciones morfológicas y células multitebadas en condiciones de estrés (37°C, 1M KCl), hipersensibilidad a  $\beta$ -glucanasa y a Caspofungina y defectos en fusión vacuolar.<sup>(19,20,15)</sup> Todos esos defectos sugieren una función en homeostasis iónica y en la biosíntesis de la pared celular, aunque también podría participar en otros procesos todavía no determinados de manera clara.

Mkh1 (Mek Kinase Homolog 1) es la MAPKKK que en su estado activo fosforila a Pek1p.<sup>(15)</sup>



Pek1p (pombe mEK1), también denominada Skh1p, es la MAPKK y se comporta como un interruptor molecular actuando como un potente regulador negativo de Pmk1p cuando está desfosforilada, de tal manera que la ruta carece de actividad basal, y como activador de Pmk1p, cuando Pmk1p está fosforilada.<sup>(16)</sup> Este mecanismo contribuye a que en *S. pombe* exista una respuesta de todo nada en esta vía de MAPKs, diferenciándose de lo que ocurre en *S. cerevisiae* donde la ruta está siempre activa.<sup>(21)</sup>

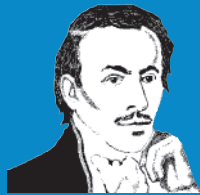
Pmk1p (*S. pombe* MAP Kinase 1), también denominada Spm1p, es la MAPK de la ruta de integridad. Pmk1p es fosforilada por Pek1p en los residuos Thr186 y Tyr188<sup>(13,16)</sup> y desfosforilada e inactivada por la fosfatasa Pmp1p (*S. pombe* MAP kinase phosphatase 1).<sup>(22)</sup> Sin embargo, aún no se sabe cómo se transmite la señal desde Pmk1p hacia un “desconocido factor de transcripción”. Las tres kinasas se localizan en la zona del septo. Mkh1p y Pek1p se localizan en el citoplasma y solo Pmk1p se localiza a la vez en el citoplasma y en el núcleo, pero su localización no cambia en condiciones de estrés.<sup>(23)</sup>

Se ha descrito que el factor de transcripción Atf1p es fosforilado por Pmk1p en condiciones de daño en la pared.<sup>(24)</sup> Estos autores proponen que las rutas de respuesta a estrés y la de integridad celular convergen en el factor de transcripción Atf1p, para activar la expresión de determinados genes que reparen los daños producidos en la pared celular. Sin embargo, no se conocen genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular cuya expresión dependa de Atf1p.<sup>(25)</sup>

Pmk1p se induce por múltiples condiciones de estrés: estrés hiper o hipo-osmótico, ausencia de glucosa, daño en la pared celular, alta temperatura y estrés oxidativo.<sup>(23)</sup> En todos los casos, la activación de Pmk1p depende completamente de Mkh1p y de Pek1p, sin embargo, no todos los tipos de estrés activan a la cascada a través de Rho2p y de Pck2p. Un ejemplo es la activación de la ruta por estrés oxidativo que es totalmente independiente de Rho2p y de Pck2p.<sup>(26)</sup> La mayoría de los activadores de la cascada se han aislado porque las cepas mutantes de los componentes de esta ruta son capaces de antagonizar los efectos de la eliminación de la calcineurina en la homeostasis iónica. La eliminación de la subunidad catalítica de la calcineurina, Ppb1p o la inhibición de su actividad mediante inmunosupresores (como FK506), produce hipersensibilidad a Cl<sup>-</sup>, mientras que la inactivación simultánea de alguno de los miembros de esta ruta de MAPK suprime este fenotipo.

Basándose en esta interacción se ha descrito el fenotipo vic (Viable in the presence of Immunosuppressant and Chlorine ion), y se ha visto que todos los mutantes nulos de los componentes de la cascada de integridad presentan este fenotipo, es decir son viables en presencia del inmunosupresor FK506 y altas concentraciones de MgCl<sub>2</sub>.<sup>(16,22)</sup>

Para buscar nuevos componentes de la ruta se realizó un “screening” de mutantes de fenotipo vic. Primero se identificó una cepa mutada en el gen *cpp1+* que codifica la subunidad de la farnesil-transferasa encargada de catalizar la prenilación de las GTPasas Rho2p y Rβ3p y esto condujo a la identificación de Rho2p como un nuevo miembro de la ruta de MAPK, ya



que los mutantes *rho2Δ* también presentan el fenotipo vic.<sup>(14)</sup> La sobreexpresión de *rho2+* deja de ser letal cuando se elimina Mkh1p, Pek1p o Pmk1p de la célula, y lo mismo ocurre al sobreexpresar *pck2+*, lo cual sitúa a Rho2p y a Pck2p por encima del módulo de MAPK de la ruta de integridad celular. Además, la sobreexpresión de *rho2+* o *pck2+* incrementa en gran medida los niveles de fosforilación de Pmk1p.<sup>(14)</sup>

También se ha descrito a Rgf1p como uno de los reguladores de la cascada. Los mutantes *rgf1Δ* muestran el fenotipo vic y son incapaces de crecer a altas concentraciones de KCl, ambos fenotipos característicos de los mutantes de la cascada. Rgf1p es necesario para la fosforilación de la MAPK Pmk1p en respuesta a estrés osmótico y a estrés producido por daños en la pared y actúa por encima de Rho2p y de Pck2p.<sup>(20)</sup>

El trabajo que se presenta se realizó con el propósito de caracterizar nuevos reguladores que actúen por encima de la ruta Rho1p/Pck1p/Pck2p y el mantenimiento de la integridad celular en *Schizosaccharomyces pombe* en relación con la ruta de señalización de MAPK Pmk1p.

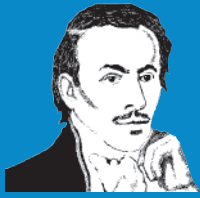
## MATERIAL Y MÉTODOS

En el proceso investigativo que se presenta, el organismo mayoritariamente utilizado fue la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*; aunque, también se emplearon diferentes estirpes de *Escherichia coli* para los trabajos de clonación molecular. Se usaron diversas técnicas de clonación molecular, métodos genéticos, técnicas de microscopía, Western Blot y determinación de la actividad de Pmk1p bajo condiciones de estrés y análisis informático de las secuencias de ADN y proteínas.

### Ensayo de determinación de la actividad de pmk1p bajo condiciones de estrés

A una temperatura de 28°C, se incubaron las células en medio rico YES o medio mínimo suplementado con los correspondientes aminoácidos, así como en ausencia o presencia de tiamina. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 0.5 comenzó el tratamiento de estrés con NaCl 0.5M durante 30', KCl 0.6M durante 15', Caspofungina 1μg/ml durante 1 hora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6mM durante 15' y Cafeína 15mM durante 2 horas, respectivamente. También se determinó la actividad de Pmk1p a las 22 horas de sobreexpresión de los genes *mtl2+* y *wsc1+* en la cepa silvestre.

Primeramente, en todos los casos se recogieron las células mediante filtración de 30 ml de cultivo, para luego extraer las células de los filtros en tubos de microcentrífuga fríos, a los que previamente se le ha añadido 1ml de PBS 1X frío. Los precipitados resultantes se congelaron en hielo seco, para después descongelar todas las muestras obtenidas y resuspenderlas en 200μl de buffer de lisis de Pmk1 (50mM TrisHCl pH=8, 150mM NaCl, 10% Glicerol, NP-40 0.1%) con inhibidores de proteasas (2μ/ml aprotinina, 2μ/ml leupeptina y 1mM PMSF) incorporados. Las células se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, Sigma) en una Fast-Prep FP120 (Bio 101



Savant) durante dos pulsos de 16 segundos a una potencia de 6,0. Se comprobó la rotura celular por observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 13.000rpm durante 10'. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas.

La concentración de proteína de los extractos obtenidos se cuantificó por el método colorimétrico descrito. Pmk1-HA6H se purificó utilizando 60µl de bolas de Níquel Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (Qiagen) al 50% junto con 800µg de cada extracto celular obtenido e incubando las distintas muestras durante dos horas en agitación a 4°C.

Posteriormente, Pmk1p unida a las bolas de níquel se sedimentó por centrifugación y se lavó tres veces con 1ml de TrisHCL pH=8. Finalmente, esos complejos proteicos se resuspendieron en 15µl de tampón de carga 2X para proceder a la electroforesis en geles de 10% de poliacrilamida y posterior análisis por Western blot. El estado activo de Pmk1p se detectó utilizando anticuerpos policlonales anti-fosfo-p44/42 (Cell Signalling) a una dilución de 1:2500 y la cantidad total de Pmk1p purificada mediante anticuerpos monoclonales anti-HA, 12CA5 (Boehringer) a una dilución de 1:5000.

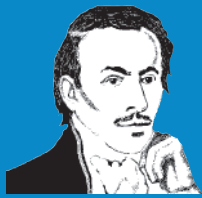
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los componentes conocidos de la cascada de integridad mostraron el fenotipo vic (viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion); por lo que resultan viables en presencia del inmunosupresor FK506 y altas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (16Sugiura et al., 1999; 22Sugiura et al., 1998). En *S. pombe* los mutantes de Calcineurina no crecen en presencia de MgCl<sub>2</sub>, mientras que una mutación adicional en los miembros de la ruta de MAPK suprime este fenotipo. En medio con FK506 + MgCl<sub>2</sub>, la inhibición de la Calcineurina es llevada a cabo por FK506 y en consecuencia la cepa silvestre no puede crecer en presencia de iones cloro, sin embargo, los mutantes que tienen delecionado alguno de los componentes de la ruta, complementan la hipersensibilidad a cloro y crecen en estas condiciones.

### Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* no presentan el fenotipo vic

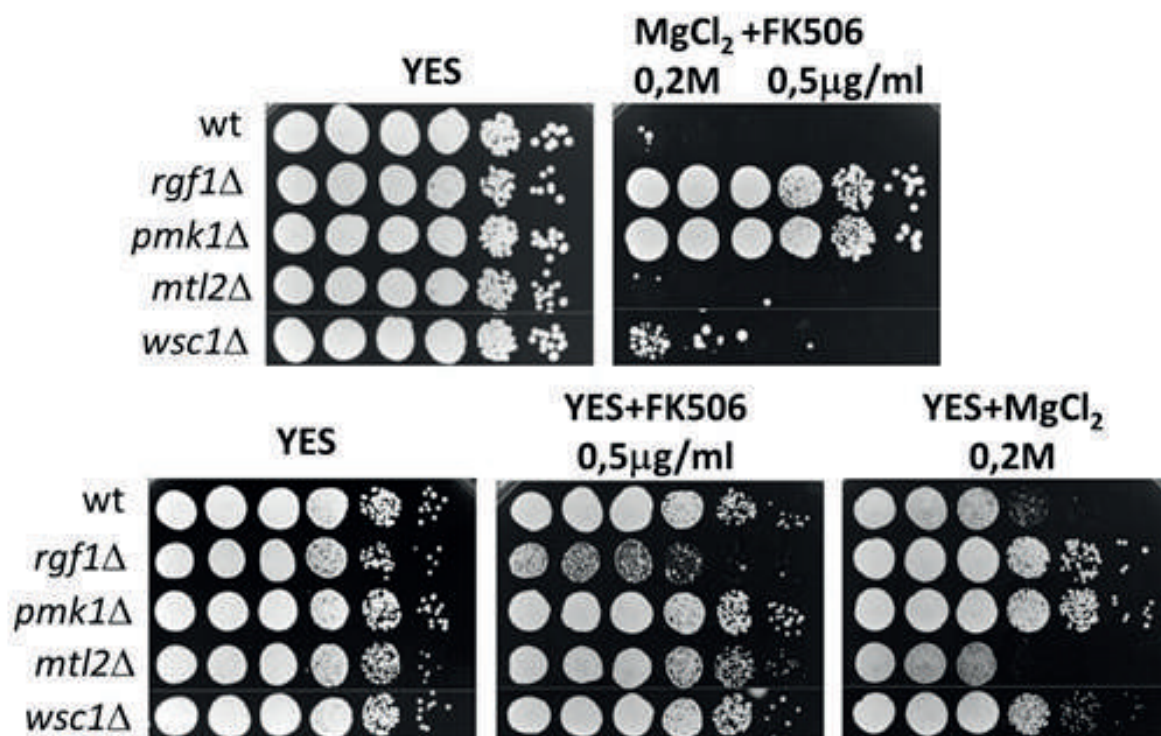
Los “sensos” “Mtl2p y Wsc1p” activan o señalizan hacia Rho1p. Los datos recolectados indicaron que Mtl2p Wsc1p no son componentes “auténticos” de la cascada, aunque tampoco se demostró claramente que Rho1p lo sea. Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* no presentan el fenotipo vic (viable en presencia de inmunosupresor y de iones cloruro), característico de los mutantes en los componentes de la cascada (Figura 2). Si Wsc1p o Mtl2p actuaran como reguladores de la ruta, la sobreexpresión de los componentes de la ruta como *pck2+* o *pmk1+* podría suprimir el fenotipo de sensibilidad a Caspofungina de estos mutantes.

Sin embargo, ni *pck2+* ni *pmk1+* suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a Caspofungina



del mutante *mtl2Δ* y no hemos realizado los experimentos para saber que ocurre con el mutante *wsc1Δ*. También hemos visto que los mutantes dobles entre uno de los “sensores” junto con mutaciones en alguno de los componentes de la ruta, crecen normalmente, lo que también podría significar que no colaboran en ninguna función esencial en relación con la integridad celular o que colaboran en la misma función no esencial.

**Figura 2. Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* no presentan el fenotipo vic**

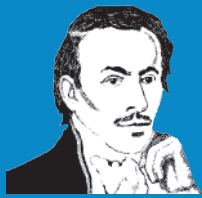


Células silvestres *rgf1Δ*, *pmk1Δ*, *mtl2Δ* y *wsc1Δ* fueron sembradas en placas de YES y de YES + FK506 (0,5 mg/ml) + MgCl<sub>2</sub> (0,2M) (paneles superiores). Se realizaron diluciones seriadas (con 8x10<sup>4</sup>, 4x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>3</sup>, 2x10<sup>2</sup> y 2x10<sup>1</sup> cels/ml) y se sembraron aproximadamente 3ml de cada una de estas diluciones. Las mismas cepas fueron sembradas en placas de YES + FK506 (0,5 mg/ml) y YES + MgCl<sub>2</sub> (0,2M) por separado (paneles inferiores). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 3 días.

### **Mtl2p y Wsc1p no son componentes “auténticos” de la cascada de integridad**

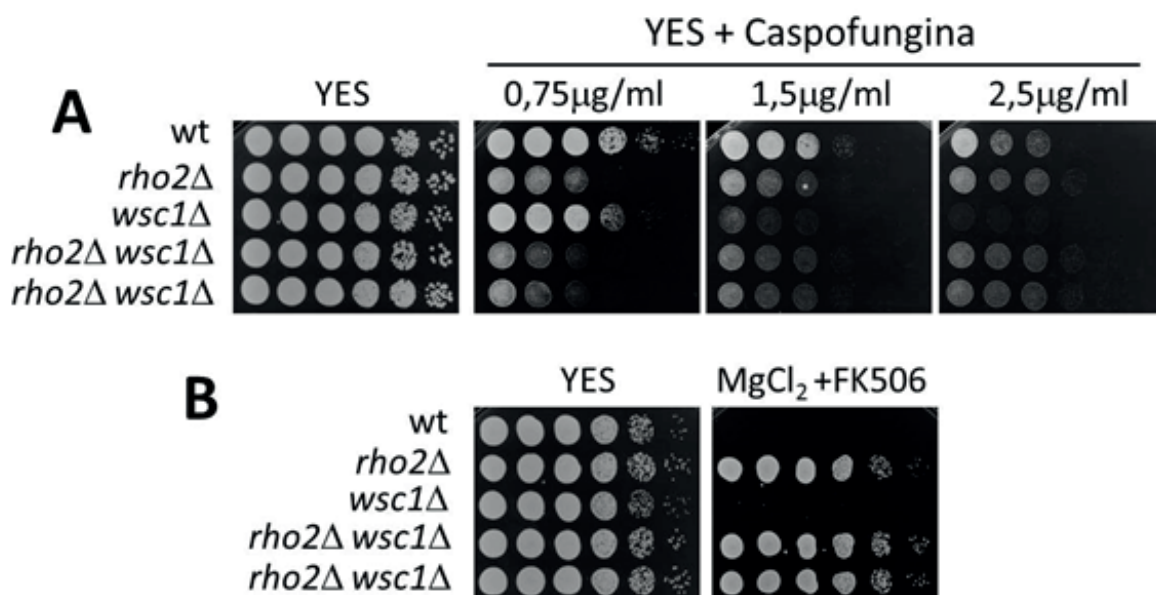
La cepa *wsc1Δ* no es sensible a 0,75 mg/ml de caspofungina, al contrario del mutante *rho2Δ*; sin embargo, al subir la concentración de caspofungina a 1,5 μg/ml (Figura 3), es cuando la cepa *wsc1Δ* es incluso más sensible a caspofungina que la delección de Rho2p, sugiriendo en principio que el mecanismo que provoca este defecto podría ser diferente en ambos casos. En cuanto a los mutantes dobles, son sensibles a las mismas concentraciones que el mutante simple *rho2Δ*, y además presentan el fenotipo vic como el mutante *rho2Δ*.





La relación entre Mtl2p y Rho2p es diferente, los mutantes individuales *rho2Δ* y *mtl2Δ* presentan distinto grado de sensibilidad a caspofungina, siendo más sensible la cepa *mtl2Δ* que la cepa *rho2Δ*. Las cepas *mtl2Δ rho2Δ* se comportan como la cepa *mtl2Δ* con respecto al crecimiento en placas de caspofungina y son más sensibles que la cepa *rho2Δ*. Estos datos y el hecho de que ambos mutantes no presenten el fenotipo vic, indicarían que ni Mtl2p ni Wsc1p son componentes “auténticos” de la cascada de integridad.

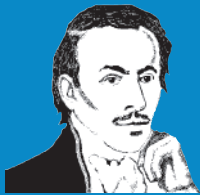
Figura 3. Relación entre Mtl2p y Wsc1p con Rho2p



Ensayo de sensibilidad a caspofungina de la cepa silvestre, los mutantes *rho2Δ*, *wsc1Δ* y los dobles mutantes *rho2Δwsc1Δ*. Se hicieron diluciones seriadas de cada cepa (8x10<sup>4</sup>, 4x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>3</sup>, 2x10<sup>2</sup> y 2x10<sup>1</sup> cels/ml) y se sembraron aproximadamente 3ml de cada dilución en placas de medio rico (YES) y YES suplementado con caspofungina (0,75mg/m, 1,5 mg/ml y 2,5mg/m). B- Las mismas cepas se sembraron en placas de YES y de YES + FK506 (0,5 mg/ml) + MgCl<sub>2</sub> (0,2M). Las placas se incubaron 3 días a 28oC.

### La activación de Pmk1p en respuesta a estrés osmótico o a estrés por daños en la pared, no depende de Mtl2p ni de Wsc1p

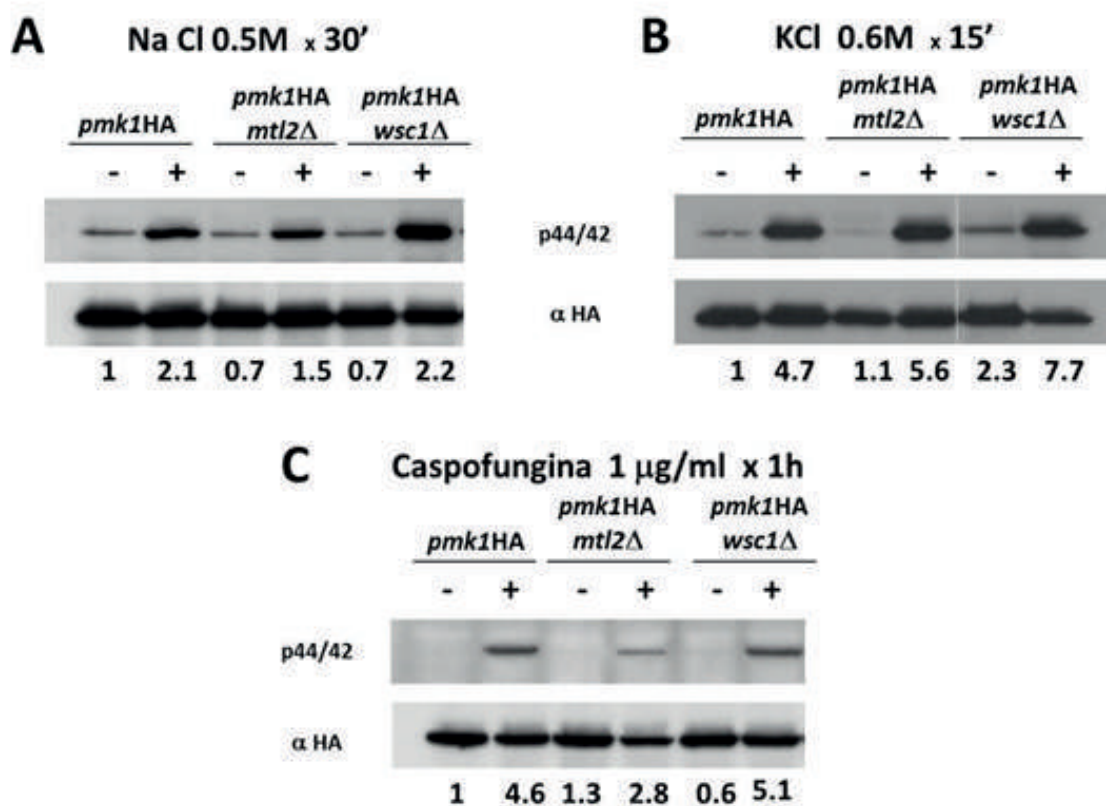
Analizamos el nivel de fosforilación de Pmk1p sometida a diferentes tipos de estrés en la cepa silvestre y en los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. Se ha descrito que la activación de Pmk1p es inducida por numerosos tipos de estrés, incluyendo condiciones híper e hipotónicas, presencia de compuestos que dañan la pared celular, calor, ausencia de glucosa y estrés oxidativo.<sup>(23)</sup> La actividad catalítica de la MAPK Pmk1p depende de la fosforilación de dos residuos, Thr-186 y Tyr-188, que puede ser detectada por “Western blot” utilizando un anticuerpo antifosfo-p42/44.<sup>(13,18)</sup>



La proteína Pmk1p se purificó mediante bolas de Ni<sup>2+</sup> que presentan afinidad por las 6His y posteriormente se analizó la fracción de Pmk1p fosforilada mediante SDS-PAGE y “Western blot”, utilizando anticuerpos policlonales antifosfo-p44/42 que detectan el estado activo de Pmk1p. Los niveles totales de Pmk1p se detectaron a partir de los extractos celulares, mediante SDS-PAGE y “Western blot” utilizando anticuerpos anti-HA (12CA5).

No se observó diferencias significativas en la fosforilación de Pmk1p entre las células silvestres y los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ* (Figura 4). No se apreciaron cambios ni en la actividad basal, ni cuando las células se sometieron a estrés osmótico con KCl o NaCl. Pero quizás el dato más concluyente de los mencionados hasta ahora es que la activación de Pmk1p que se produce en respuesta a estrés osmótico o a estrés producido por daños en la pared, no depende de Mtl2p ni de Wsc1p. No observamos diferencias significativas en la fosforilación de Pmk1p entre las células silvestres y los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*, ni cuando las células se someten a estrés osmótico (con KCl o NaCl), ni en presencia de Caspofungina. Tampoco observamos diferencias entre los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* la cepa silvestre, analizado otros tipos de estrés, como estrés oxidativo, heat-shock o ayuno de glucosa.

Figura 4. Activación de la cascada de integridad por estrés con NaCl, KCl y Caspofungina



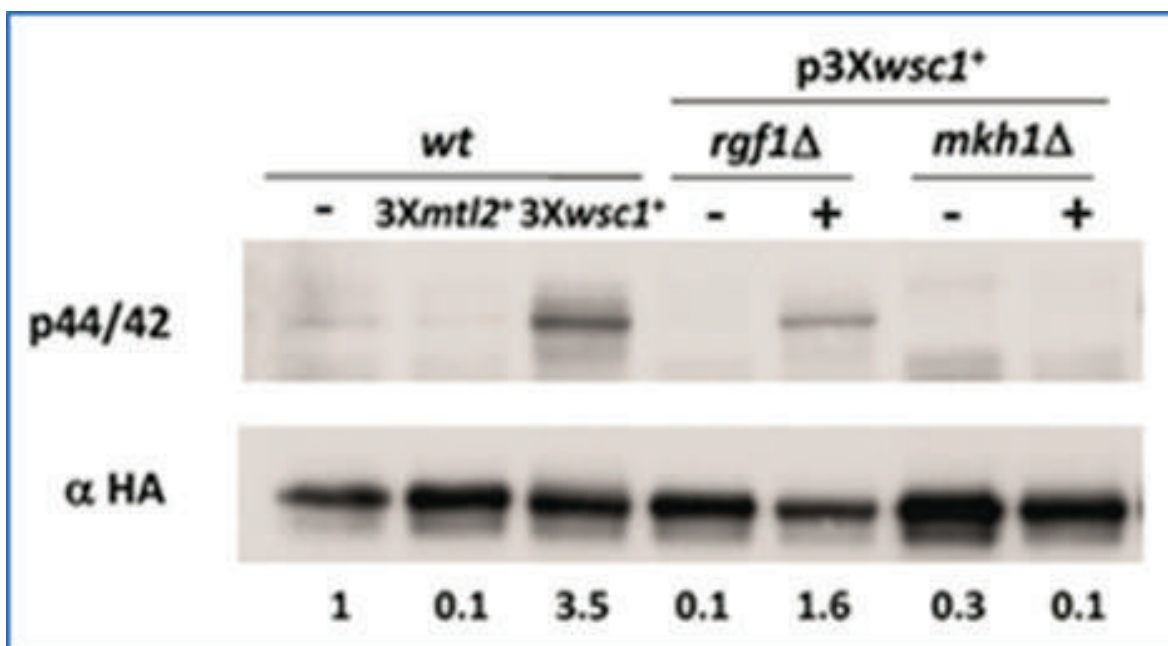


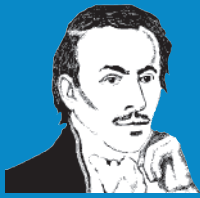
Activación de Pmk1p inducida por estrés osmótico y daño en la pared celular en los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. Células de las cepas *pmk1+HA6His* (MI200), *mtl2Δ pmk1+HA6His* y *wsc1Δ pmk1+HA6His* creciendo en fase exponencial en medio rico se trataron con NaCl 0,5M durante 30 minutos (A), KCl 0,6M 15 minutos (B) y caspofungina (1mg/ml) durante 60 minutos (C). Pmk1-HA6His se purificó por cromatografía de afinidad. La fracción de Pmk1p activada y la total se determinaron por SDS-PAGE y “Western blot”, revelando con anticuerpos antifosfo-p42/44 (panel superior) o anti-HA (panel inferior).

### La sobreexpresión de *wsc1+* aumenta los niveles de fosforilación de Pmk1p a través del módulo de MAP Kinasas

Sin embargo, se observó que la sobreexpresión de *wsc1+* aumenta claramente los niveles de fosforilación de Pmk1p (Figura 5), comparado con la cepa que sobreexpresa *mtl2+* o con la cepa que lleva el plásmido vacío. Este aumento depende del módulo de MAP kinasas ya que no se produce en el mutante *mhk1Δ* y depende solo parcialmente de Rgf1p. La sobreexpresión de Wsc1p aumenta los niveles de Rho1p y también aumenta la cantidad de pared celular, lo que es un estrés para la célula y podría actuar activando la cascada indirectamente. Aun así y puesto que los “sensores” comparten una función esencial en lo que respecta a la integridad celular, podríamos pensar que solo la ausencia de los dos a la vez debería tener un efecto en la transmisión de la señal.

Figura 5. La sobreexpresión de *wsc1+* aumenta claramente los niveles de fosforilación de Pmk1p a través del módulo de MAPKinasas





La sobreexpresión de Wsc1p activa a Pmk1p y esta activación se produce a través de *mkh1+*. En la parte izquierda se muestra Pmk1p obtenida a partir de células de la cepa silvestre *pmk1+-HA6His* transformada con los plásmidos pREP41X (vacío) y pREP3X-*wsc1+* y pREP3X-*mtl2+*, desreprimidas en MM sin tiamina durante 22 horas. En la parte derecha, las células de la cepa *mkh1Δ pmk1+-HA6His* y *rgf1Δ pmk1+-HA6His* fueron transformadas con los plásmidos pREP41X vacío y pREP3X-*wsc1+*. La cantidad de Pmk1p fue analizada por el procedimiento descrito anteriormente, revelando con anticuerpos anti-fosfo-p42/44 (arriba) o anti-HA (abajo).

En resumen, aunque en *S. cerevisiae* la cascada lleva el módulo de “sensores” o módulo de detección que activa a Rho1p y este a su vez activa a PKC1 y el módulo de MAP kinasas, en *S. pombe* el comportamiento no resulta similar.

## CONCLUSIONES

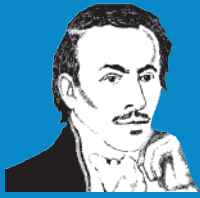
Los “sensores” “Mtl2p y Wsc1p” activan o señalizan hacia Rho1p. Los datos indican que Mtl2p y Wsc1p no resultan componentes “auténticos” de la cascada, sin que se demuestre claramente que Rho1p lo sea.

Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* no presentan el fenotipo vic (viable en presencia de inmunosupresor y de iones cloruro), característico de los mutantes en los componentes de la cascada.

Mtl2p y Wsc1p no desempeñan un papel importante en la señalización en respuesta a estrés osmótico y daño en la pared celular a través de la ruta de integridad celular de Pmk1p.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armstrong J, Bone J, Dodgson N, Beck T. The role and aims of the FYSSION project. Briefings in Functional Genomics [Internet]. 2007 Mar [citado 2016 Ene 21]; 6(1): 3-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/bfgp/elm004>.
2. Nurse P. Fission yeast morphogenesis--posing the problems. Molecular Biology of the Cell. 1994; 5(6): 613-616.
3. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, et al. The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe. Nature. 2002; 415(6874): 871-80.
4. Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. Science [Internet]. 2001 [citado 2016 Ene 17]; 293(5532): 1129-33. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/293/5532/1129/tab-pdf>.
5. Sipiczki M. Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. Antonie Van Leeuwenhoek. 1995 Aug; 68(2): 119-49.
6. Hayles JA, Nurse P. A journey into space. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001 (2): 647-656.



7. Sabila M, Kundu N, Smalls D, Ullah H. Tyrosine Phosphorylation Based Homo-dimerization of Arabidopsis RACK1A Proteins Regulates Oxidative Stress Signaling Pathways in Yeast. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2016 [citado 2016 Sep 8]; 7: 176. <https://doi.org/doi:10.3389/fpls.2016.00176>.
8. Katarzyna M, Kowalczyk, Hartmuth S, Perera D, Stansfield P, Petersen J. Control of Sty1 MAPK activity through stabilisation of the Pyp2 MAPK phosphatase. *J Cell Sci* [Internet]. 2013 [citado 2016 Ago 13]; 126: 3324-3332. Disponible en: <https://doi.org/10.1242/jcs.122531>.
9. Banavar SP, Gomez C, Trogon M, Petzold LR, Yi T-M, Campàs O. Mechanical feedback coordinates cell wall expansion and assembly in yeast mating morphogenesis. *PLoS Computational Biology* [Internet]. 2018 [citado 2018 Feb 27]; 14(1): e1005940. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005940>.
10. Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Van Zeebroeck G, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Reviews* [Internet]. 2014 [citado 2016 Mar 17]; 38(2): 254-299. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>.
11. Honigberg SM. Similar environments but diverse fates: Responses of budding yeast to nutrient deprivation. *Microbial Cell* [Internet]. 2016 [citado 2016 Sep 19]; 3(8): 302-328. Disponible en: <https://doi.org/10.15698/mic2016.08.516>.
12. Brennan TCR, Krömer JO, Nielsen LK. Physiological and Transcriptional Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to d-Limonene Show Changes to the Cell Wall but Not to the Plasma Membrane. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 2013 [citado 2016 Abr 2]; 79(12): 3590-3600. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AEM.00463-13>.
13. Sánchez-Mir L, Soto T, Franco A, Madrid M, Viana RA, Vicente J, et al. Rho1 GTPase and PKC Ortholog Pck1 Are Upstream Activators of the Cell Integrity MAPK Pathway in Fission Yeast. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [citado 2016 Jun 12]; 9(1): e88020. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088020>.
14. Sánchez-Mir L, Franco A, Martín-García R, Madrid M, Vicente-Soler J, Soto T, et al. Rho2 Palmitoylation Is Required for Plasma Membrane Localization and Proper Signaling to the Fission Yeast Cell Integrity Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Molecular and Cellular Biology* [Internet]. 2014 [citado 2016 Jul 30]; 34(14): 2745-2759. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/MCB.01515-13>.
15. Kabeche R, Madrid M, Cansado J, Moseley JB. Eisosomes Regulate Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P2) Cortical Clusters and Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Signaling upon Osmotic Stress. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2015 [citado 2016 Feb 23]; 290(43): 25960-25973. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.674192>.
16. Viana RA, Pinar M, Soto T, Coll PM, Cansado J, Pérez P. Negative Functional Interaction Between Cell Integrity MAPK Pathway and Rho1 GTPase in Fission Yeast. *Genetics* [Internet]. 2013 [citado 2016 May 5]; 195(2): 421-432. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.154807>.



17. Ianiri G, Boyce KJ, Idnurm A. Isolation of conditional mutations in genes essential for viability of *Cryptococcus neoformans*. *Current genetics* [Internet]. 2017 [citado 2017 Abr 11]; 63(3): 519-530. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0659-2>.
18. Zaitsevskaya-Carter T, Cooper JA. Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *The EMBO Journal* [Internet]. 1997 [citado 2016 Ago 19]; 16(6): 1318-1331. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.6.1318>.
19. Morigasaki S, Ikner A, Tatebe H, Shiozaki K. Response regulator-mediated MAPKKK heteromer promotes stress signaling to the Spc1 MAPK in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. 2013 [citado 2016 Feb 21]; 24(7): 1083-1092. Disponible en: <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0727>.
20. García P, Tajadura V, Sánchez Y. The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*. 2009; 20: 721-731.
21. Guo L, Ganguly A, Sun L, Suo F, Du L-L, Russell P. Global Fitness Profiling Identifies Arsenic and Cadmium Tolerance Mechanisms in Fission Yeast. *G3: Genes|Genomes|Genetics* [Internet]. 2016 [citado 2016 Jun 16]; 6(10): 3317-3333. Disponible en: <https://doi.org/10.1534/g3.116.033829>.
22. Higa M, Kita A, Hagihara K, Kitai Y, Doi A, Nagasoko R, Satoh R, Sugiura R. Spatial control of calcineurin in response to heat shock in fission yeast. *Genes Cells* [Internet]. 2015 Feb [citado 2016 Nov 13]; 20(2): 95-107. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/gtc.12203>.
23. Papadakis MA, Workman CT. Oxidative stress response pathways: Fission yeast as archetype. *Critical Reviews in Microbiology* [Internet]. 2015 [citado 2016 Dic 2]; 41(4): 520-535, Disponible en: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.870968>
24. Kato H, Kira S, Kawamukai M. The Transcription Factors Atf1 and Pcr1 Are Essential for Transcriptional Induction of the Extracellular Maltase Agl1 in Fission Yeast. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [citado 2016 Jul 7]; 8(11): e80572. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080572>.
25. Schutt KL, Moseley JB. Transient activation of fission yeast AMPK is required for cell proliferation during osmotic stress. *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. 2017 [citado 2017 Abr 24]; 28(13): 1804-1814. Disponible en: <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-04-0235>.
26. Cruz S, Muñoz S, Manjón E, García P, Sanchez Y. The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *MicrobiologyOpen* [Internet]. 2013 [citado 2016 Ene 18]; 2(5): 778-794. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mbo3.113>.

Recibido: 11 de mayo de 2017

Aprobado: 18 de diciembre de 2018