



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Estudio y caracterización de la nueva quinasa dependiente de calmodulina: CKK2

Tula del Carmen Yance Chávez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

Barcelona, Setiembre 2015

Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias
Programa de Doctorado en Biomedicina
Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.



ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA NUEVA QUINASA DEPENDIENTE DE CALMODULINA: CKK2.

Memoria presentada por

Tula del Carmen Yance Chávez

para optar al grado de Doctor en Biomedicina
por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Rosa Aligué Alemany
en el Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias
de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Agradecimientos

"No hay deber más necesario que el de dar las gracias"

Cicerón

Las palabras no son mi mejor virtud, por ello aprovecho estas líneas para presentar mis agradecimientos a todas aquellas personas que han permitido que llegue este día, así como a los que me han acompañado en este camino. En primer lugar quiero agradecer a la jefa, Rosa, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en tu grupo, por haberme brindando la confianza de estar en tu grupo. También por permitirme participar en los pombe *meetings* han sido una gran experiencia, tanto a nivel científico como personal. Gracias por acompañarme durante este trabajo y siendo positiva; aún estos últimos días has estado brindándome todo tu apoyo; gracias por ayudarme a entender las cosas de pombe, y por la paciencia. Gracias por todo! A Ramón por permitirme continuar este trabajo y también por la paciencia, y el buen ánimo que te caracteriza.

Al grupo Pombe, David bueno agradecerte por soportar mi caos en el trabajo, sé que te ha costado pero lo digo: Muchísimas gracias..Gracias por enseñarme los primeros días en el laboratorio, aunque no lo parezca o parece que no lo ponga en práctica aprendí mucho!! *Euge* creo que hacen falta palabras para agradecerte todo lo que me enseñaste; compartir contigo y aprender de tí ha sido estupendo! El laboratorio no ha sido lo mismo sin tí! Muchas gracias por tus palabras y consejos. Marta! Que hubiera sido de mí sin tí! has sido un gran apoyo para mí, me siento tan contenta de haber compartido contigo tu trabajo de máster, Gracias a Rosa por eso! Gracias Marta por ayudarme siempre, gracias por escuchar mis largos casi monólogos! Simplemente gracias por todo Marta! Alba y Marta S aunque tuve la oportunidad de compartir pocos momentos con ustedes quiero decirles gracias por esos momentos porque fue muy grato compartir con ustedes! Gracias grupo Pombe! A *Ignasi* gracias por la paciencia, sobre todo por la paciencia que a veces hacía falta repetirme varias veces las cosas, por tu ayuda y siempre echarme una mano, Gracias!

A los compañeros del laboratorio! Los Oriol's (sonaba tan raro al principio!) Primero agradecerte *Oriol* por el saludo de cada mañana por el buen ánimo que siempre le pones a todo, las bromas matutinas hacen que cada día uno pueda mirar con mejores ojos los resultados! A *Judit* gracias por que este último tiempo has sido un gran apoyo, gracias por compartir el verano conmigo, aquí en el lab muertas de calor (sin aire acondicionado! Jajajajaja) Gracias por todo, por tu disposición a ayudarme y sobre todo animarme a hacer las cosas GRACIAS porque aprendo cada día de tí! *Edu*!!!!!! al pensar en ti se me coloca una sonrisa en el rostro será por los buenos momentos que siempre compartimos! Agradecer las conversaciones, que vienen tan bien para despejar la mente! *Anna P.* gracias por las caminatas a casa, largas charlas incluidas, gracias por tus consejos sobre el proceso de escribir la tesis: lo has hecho tan simple que creo que sin ese empujón me hubiera costado más, miles de gracias! *Sere* que decir gracias también por las palabras porque siempre le pones una gota de alegría y humor a las cosas, con el móvil que nunca deja de sonar, por compartir recetas de dulces, que afición más buena! Porque siempre tu poyata será más caótica que la mía! Gracias! *Martina* muchas gracias por todo porque mientras estuviste en el laboratorio siempre tuviste la buena disposición para hacer las cosas, porque lo que haces: lo haces bien! Gracias! *Neus S.* me has hecho tanta falta! Las últimas horas en el laboratorio sin tí no eran lo mismo! gracias por siempre escucharme, darme un consejo ayudarme y siempre siempre estar dispuesta a ofrecer tu ayuda! Muchas gracias! *Atila*, gracias! Por ser el "único" chico del grupo y siempre estar presente, Gracias! Sara esta última etapa ha sido estupenda! Cada día siempre teniéndolo todo a punto, Gracias a Eulalia también por eso! cada vez que tenía algo que decir Sara siempre tenía una respuesta!! Gracias por el orden en el laboratorio, por tu ayuda por tu buen ánimo con todo Muchísimas gracias! A *Laura* porque siempre tienes buen ánimo para todo es imposible hablar contigo y no estar contento Gracias! A *Carla* y *Jonathan* gracias chicos por esa inyección de ánimo y de ganas de empezar algo nuevo!

A todas y cada una de las personas que pasaron por el laboratorio muchas gracias, porque aunque fuese poco o mucho el tiempo que compartimos que sepan que me dejaron algo. Alba L, Carles B, Miriam, y Noe, Amaia, Edu, Sonia que aunque ya no compartimos el mismo espacio

gracias por los momentos alegres dentro del laboratorio especialmente Edu no es lo mismo sin tus canciones matutinas! Gracias chicos!

Gracias a todos y cada uno de ustedes por compartir este día a día del trabajo que a veces, solo a veces, es menos gratificante pero con cada uno de ustedes lo ha sido enormemente! Gracias por la hora del café (que no es una hora, hay que recalcar!) han sido momentos para conversar, para reír, para crear nuevas anécdotas, pero sobre todo para encontrar amigos y saber que puedo contar con ustedes, muchas gracias por todo; porque han hecho de estos años, años grandiosos y porque han contribuido a que me sienta como en casa! Miles de gracias!

A *Jonathan*, las palabras faltan para decirte Gracias! Gracias Amor! Gracias por acompañarme todos estos días, por ser la otra mitad, porque cada día me animas y motivas a seguir adelante, porque siempre miras la vida con optimismo y eso me encanta! Porque fue un día que decidimos tomar este rumbo y aquí estamos ya acabando esta etapa de la tesis, porque creo que la has vivido conmigo, especialmente cuando tocaba venir de noche o algún fin de semana, eras tú quien estaba a mi lado!, porque siempre has estado dispuesto a escucharme, a pesar que poco entendías has hecho el esfuerzo y eso es lo que cuenta! Gracias por todo amor!

A ti madre gracias porque sin tu ejemplo nada de esto sería posible, reiterarte cada día que estoy inmensamente agradecida por lo que me has dado cada día de mi vida, gracias por todo eres la mejor! A mi *Santiago* gracias porque tu sonrisa siempre alimenta, porque haces que la vida tenga otro color, porque me demuestras que ante la adversidad no hay nada mejor que poner una hermosa sonrisa a la vida! Gracias mi pequeñín por existir! Gracias a ti *Yudit* porque Santiago no heredó esa sonrisa sino de ti! Gracias porque ambos son mi ejemplo de temple y fortaleza, siempre han sido y serán el empuje que necesito para saber que siempre hay algo que hacer y que siempre hay algo que mejorar. A ti hermano por tus palabras en el momento preciso por ser ejemplo de la palabra trabajador, gracias Iván. Gracias familia!

A los amigos, que han pasado a ser parte de mi familia, *Indry* que has estado estos últimos tiempos compartiendo esta etapa y también de mi vida personal; Gracias por eso! aunque no estés presente el día de la tesis sé que me acompañaras y estarás conmigo: Gracias!! A *Vanesa, Ronald, Alexandra,*

Roni, Claudia, Alan y Aina gracias por acompañarme desde el primer momento, por la ayuda, y darme ánimo con una buena gota humor; la actitud es lo que cuenta en esta vida y eso tienen de sobra los quiero familia! Faltan las palabras y líneas para agradecerles todo lo que han hecho por mí, Gracias por todo!!!

Faltan paginas para poder a todas y cada una de a aquellas personas que han formado alguna etapa de mi vida y que aun la siguen formando, amigos y familia, quiero decirles muchas gracias por lo que me han dejado, he aprendido y recibido mucho de cada uno de ustedes!!!!

Gracias a todos!

Contenido

Agradecimientos3

INTRODUCCIÓN	1
1. Calcio y Calmodulina	3
2. Familia de las Quinasas dependientes de Calcio y Calmodulina	7
2.1. CaM Quinasas Multifuncionales.....	8
2.2. Importancia de la Familia de las CaM quinasas.....	13
3. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como modelo celular	15
4. CaM quinasas en <i>Schizosaccharomyces Pombe</i>	16
4.1 Ssp1.....	16
4.2 Cmk1	16
4.3 Cmk2	17
4.4 Srk1	18
5. CaM quinasas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
6. Deprivación de nutrientes: Nitrógeno y Glucosa	20
6.1 Deprivación de Nitrógeno.....	20
6.2 Deprivación de Glucosa	24
7. Modificaciones pos-traduccionales: sumoilación	27
ANTECEDENTES.....	29
1. Estudio y Caracterización de la quinasa Cmk1 en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	31
OBJETIVOS.....	35
OBJETIVOS:	37
MATERIALES Y METODOS.....	39
1. Técnicas de manipulación de ADN.....	41
1.1 PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>).....	41
1.2 Clonaje.....	42
1.3 Aislamiento de DNA plasmídico	42
1.4 Purificación de fragmentos de DNA	42

1.5	Electroforesis de ADN.....	43
1.6	Plásmidos utilizados	43
1.7	Oligonucleótidos utilizados.....	43
2.	Cepas	44
2.1	Integración de modificaciones a un gen mediante productos de PCR	46
2.2	Cruce de cepas.....	47
3.	Medios y Condiciones de cultivo	48
3.1	Medio y Condiciones de Cultivo de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	48
3.2	Medio y Condiciones de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	49
4.	Transformación de cepas	49
4.1	Transformación de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	50
4.2	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	51
5.	Ensayos de sensibilidad y tratamiento a estrés	51
6.	Determinación de número de células.....	51
7.	Técnicas de Manipulación de proteína	52
7.1	Extracción de proteínas	52
7.2	Cuantificación de proteínas.....	53
7.3	Electroforesis de Proteínas en condiciones desnaturalizantes .	54
7.4	Electrotransferencia e inmunodetección: <i>western blotting</i>	56
7.5	Ensayo de actividad quinasa <i>in vitro</i>	58
7.6	Tinción de proteínas con Azul de Coomassie.....	59
7.7	Expresión y purificación de proteínas	59
7.8	"Pull-down" de proteínas	60
8.	Técnicas de manipulación de RNA.....	61
8.1	Extracción de RNA.....	61
8.2	Análisis de la expresión génica por Real-Time PCR	61
9.	Microscopía.....	62

9.1	Microscopía de epifluorescencia.....	62
9.2	Análisis de imágenes	62
RESULTADOS.....		63
1.	Análisis de la secuencia y la actividad de Ckk2	65
1.1	Análisis de la secuencia	65
1.2	Análisis de la actividad de Ckk2 frente a Ca ²⁺ y CaM.....	66
2.	Respuesta del mutante $\Delta cck2$ frente a diferentes tipos de estrés y condiciones celulares	69
2.1	Respuesta del mutante $\Delta cck2$ frente a agentes y drogas que afectan las funciones celulares.....	69
2.2	Ckk2 y la respuesta a privación por nutrientes	70
2.3	Estudio de la modificación post-traducciona l de Ckk2 en condiciones de privación de nutrientes	77
2.4	Posibles Reguladores de Ckk2.....	79
2.5	Ckk2 y el inhibidor de Calcineurina FK506.....	83
3.	Identificación de Nuevos Sustratos de la quinasa Ckk2.....	85
3.1	Identificación de sustratos de la quinasa Ckk2 en respuesta a Ca ²⁺	85
3.2	Identificación de sustratos de la quinasa Ckk2 en privación de nitrógeno	89
4.	Análisis del dominio consenso de fosforilación de las CAMKK	93
4.1	Dominio consenso de fosforilación por CAMKKs a partir de los sustratos conocidos.....	93
4.2	Consenso de fosforilación por Ckk2 en los sustratos identificados.....	94
DISCUSIÓN.....		95
1.	Ckk2 una nueva quinasa dependiente de calcio y calmodulina	97
2.	Ckk2 y la viabilidad celular	98
3.	Ckk2 y el Índice de Septación	99
4.	Ckk2 y la privación de nutrientes	101

5. Identificación de nuevos sustratos de la quinasa Ckk2	105
CONCLUSIONES.....	113
BIBLIOGRAFÍA.....	117
ANEXO.....	137
ARTÍCULOS.....	149

INTRODUCCIÓN

1. Calcio y Calmodulina

El calcio es el quinto elemento más abundante en la corteza terrestre. Altas concentraciones intracelulares de este elemento son incompatibles con la vida debido a su capacidad citotóxica, pues, produce la precipitación de fosfatos, proteínas e incluso del ADN. Ante esta situación las células han desarrollado mecanismos homeostáticos para mantener las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares alrededor de 100 nM , que significa unas 10 000 - 20 000 veces menos que en el medio extracelular. Parte de estos mecanismos comprende la habilidad de bombear iones de Ca^{2+} al espacio extracelular, capacidad ampliamente extendida entre los diferentes tipos celulares (Case et al. 2007); además de mecanismos para almacenarlo, compartimentarlo o expulsarlo (Clapham 2007).

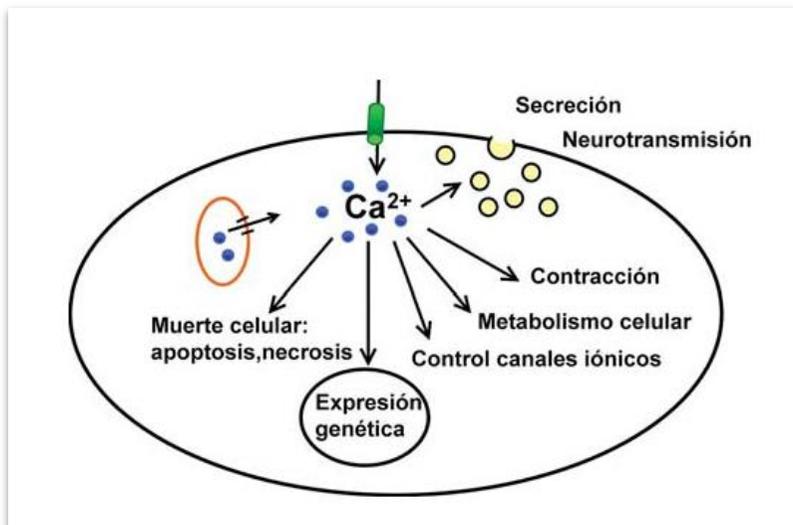


FIGURA 1. Principales funciones celulares dependientes del calcio. (Tomado de <http://www.ciencia.cl/CienciaALDia/volumen3/numero2/articulos/articulo1.html>)

El desarrollo de mecanismos homeostáticos para regular dichas concentraciones intracelulares de calcio ejercieron una presión positiva, permitiendo a los organismos evolucionar y aprovechar este elemento convirtiéndolo en un medio de señalización altamente complejo y dinámico en todos los seres vivos (Case et al. 2007). Es así que el Ca^{2+} actúa como

mediador intracelular cumpliendo una función de segundo mensajero en las células eucariotas, regulando procesos tan diversos como: el ciclo celular, el transporte, la motilidad, la expresión génica y el metabolismo (Figura 1).

¿Cómo un simple ion puede regular procesos tan variados? La diversidad de los procesos fisiológicos que regula el Ca^{2+} depende de las oscilaciones en las concentraciones intracelulares, así como la magnitud y los patrones de frecuencia espacio-temporal denominados “*calcium signature*” que definen la naturaleza y la magnitud de la respuesta a la información codificada por el ion (Martin R. McAinsh and Jon K. Pittman 2008).

Una modificación espacio-temporal en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , produce la movilización del ion uniéndose a un amplio rango de proteínas con diferente especificidad y afinidad. Las primeras proteínas denominadas tamponadoras, son las encargadas de iniciar la respuesta limitando la difusión del Ca^{2+} ; mientras el ion se une a otras proteínas con mayor afinidad. Éstas últimas son las responsables de los múltiples cambios bioquímicos y fisiológicos consecuentes a un incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . La interacción con estas proteínas denominadas proteínas sensoras de calcio es la que define al ion como segundo mensajero. Las proteínas sensoras de calcio pueden estar presentes en el citoplasma o núcleo, o pueden estar libres o unidas a la membrana. Las proteínas sensoras se dividen en proteínas sensoras transmisoras y proteínas sensoras de respuesta, dentro de éstas últimas tenemos a las quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs de su nombre en inglés *Calcium Dependent Protein Kinase*) que combinan una función sensora mediante la unión a Ca^{2+} y una actividad de respuesta mediante su actividad quinasa (Dodd et al. 2010).

Las proteínas sensoras de Ca^{2+} contienen dominios de unión al ion, que induce un cambio en su estructura proteica. Dentro de este grupo de proteínas, calmodulina ha sido ampliamente estudiada. Calmodulina (CaM) es una de las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución y es esencial para *Schizosaccharomyces pombe* (Takeda & Yamamoto 1987), aunque el número y organización de sus genes puede variar mucho entre especies; su estructura proteica, altamente conservada, debe ser esencial para la interacción con una amplia gama de proteínas. Es una proteína de 148 aminoácidos y pesa aproximadamente 16 KDa. Su estructura molecular consiste en dos dominios globulares en los extremos N- y C- terminal unidos

por una hélice alfa flexible; cada dominio globular contiene dos sitios de unión a calcio denominados “*helix-loop-helix* o *EF hand*”, teniendo en total 4 sitios de unión a Ca^{2+} , mostrando cada uno de ellos una afinidad diferente por el ion. La unión Ca^{2+} /Calmodulina es una unión reversible, e induce un cambio conformacional en CaM formando una estructura globular compacta doblando su alfa hélice central de modo que envuelve a su proteína diana; es así que el complejo es capaz de interactuar con una amplia gama de proteínas (Figura 2). La habilidad de calmodulina para unirse al calcio e interactuar con sus proteínas diana la convierte en un regulador importante en la transducción de señales de Ca^{2+} .

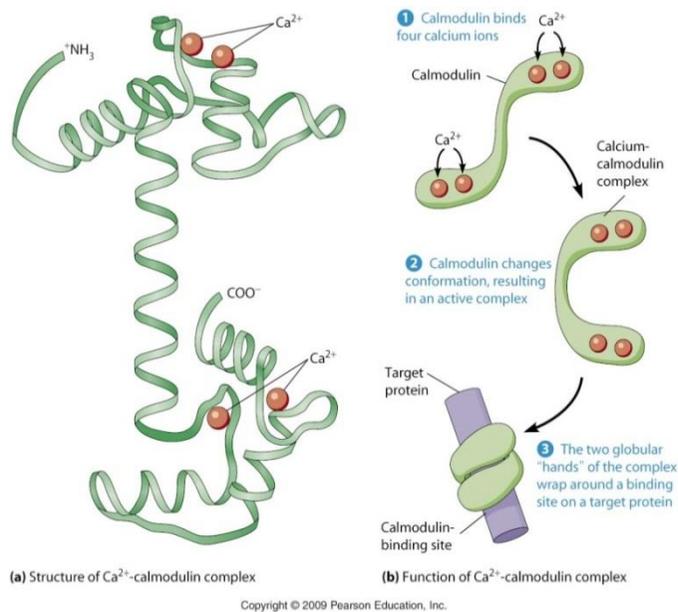


FIGURA 2. (a) Estructura del complejo Ca^{2+} -calmodulina, dos iones de calcio se unen a cada dominio globular unidos por un alfa hélice (en total 4 iones) cambiando la conformación de la proteína. (b) Función del complejo Ca^{2+} -calmodulina, la región alfa hélice del complejo cambia su conformación (complejo activo) y envuelve el dominio de unión a calmodulina en sus proteínas diana. Tomada de Becker's World of the Cell 8th Edition.

Las proteínas de unión a calcio y calmodulina (Ca^{2+} /CaM) pueden ser quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM, fosfatasas dependientes de Ca^{2+} /CaM y

proteínas que regulan elementos del citoesqueleto. En la actualidad se siguen realizando trabajos para encontrar nuevas dianas de calmodulina pues permitirán un mejor conocimiento de las vías de transducción de señales de Ca^{2+} (Shen et al. 2005).

Las proteínas de unión a calmodulina poseen una región de aproximadamente 20 aminoácidos denominada motivo de unión a calmodulina. Existen diferentes tipos de motivo de unión a calmodulina (Tabla1), dentro de los cuales destacamos: el motivo de unión IQ, un *consensus* para la unión a calmodulina independiente de Ca^{2+} descrito en tipos de miosina y canales de calcio, como los canales tipo L (Zuhlke et al., 1999). Los otros motivos son dependientes de Ca^{2+} y son denominados motivo 1-10, 1-14 y 1-16, basado en el número de aminoácidos que contienen, y se caracterizan por poseer residuos hidrofóbicos conservados en posiciones específicas (Mruk et al. 2014).

Motif	Sequence
Ca²⁺ dependent	
1-10	[FILVW]xxxxxxxx[FILVW]
1-5-10	[FILVW]xxx[FAILVW]xxx[FILVW]
Basic 1-5-10	[RK] [RK] [RK] [FAILVW]xxx[FILV] xxx[FILVW]
1-12	[FILVW]xxxxxxxxxxxx[FILVW]
1-14	[FILVW]xxxxxxxxxxxxxx[FILVW]
1-8-14	[FILVW]xxxxxx[FAILVW]xxxx[FILVW]
1-5-8-14	[FILVW]xxx[FAILVW] xx[FAILVW]xxxx[FILVW]
Basic 1-8-14	[RK] [RK] [RK] [FILVW]xxxxxx[FAILVW] xxx[FILVW]
1-16	[FILVW]xxxxxxxxxxxxxx[FILVW]
Ca²⁺ independent	
IQ	[FILV]Qxxx[RK]Gxxx[RK]xx[FILVWY]
IQ-like	[FILV]Qxxx[RK]xxxxxxxx
IQ 2A	[IVL]QxxxRxxx[VL][RK]xW
IQ 2B	[IL]QxxCxxxKxRxW
IQ unconventional	[IVL]QxxxRxxx[RK]xx[FILVWY]

TABLA 1. Motivos canónicos de unión a Calmodulina. (Mruk et al. 2014)

2. Familia de las Quinasas dependientes de Calcio y Calmodulina

Esta familia está compuesta por un grupo de serina/treonina quinasas (pueden fosforilar una serina o treonina en su sustrato) denominadas así porque su actividad quinasa es dependiente de Ca^{2+} y CaM (CaM quinasas o *CaMKs* por sus siglas en inglés). La familia de las CaM quinasas son muy importantes para el correcto funcionamiento celular ya que están implicadas en funciones tan diversas como transcripción de genes, supervivencia/muerte celular (apoptosis), reorganización del citoesqueleto, aprendizaje y memoria (Swulius & Waxham 2008). La unión del complejo Ca^{2+} /CaM se puede requerir en distintos niveles, si bien algunas proteínas requieren del complejo para su activación y posterior actividad; otras, después de ser activadas muestran actividad independiente del complejo; o incluso requieren una modificación posterior a la unión del complejo Ca^{2+} /CaM para ser completamente activas. Estas diferencias en la regulación permiten a un grupo relativamente reducido de proteínas manejar tal control sobre funciones tan distintas.

7

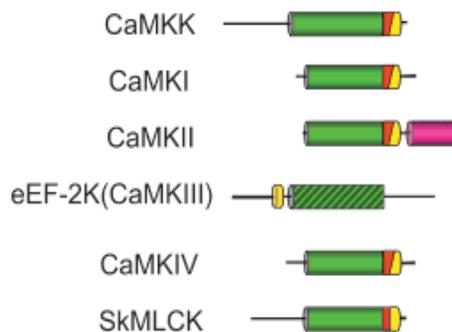


FIGURA 3. Dominios de la familia de las quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM. El dominio catalítico en verde, el dominio auto-inhibitorio en rojo, el dominio de unión a Ca^{2+} /CaM en amarillo. El dominio de asociación de CaM-KII en magenta. En rayas negras se encuentran las regiones no conservadas sin dominio estructural o funcional identificado. (Soderling & Stull 2001)

Las CaM quinasas poseen un dominio catalítico bi-lobular seguido por un dominio regulador, que consta de dos dominios solapantes entre sí:

un dominio auto-inhibitorio y un dominio de unión al complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Figura 3). En concentraciones basales de Ca^{2+} , las CaM quinastas se encuentran en estado inactivo a través de un mecanismo auto-inhibitorio, ya sea inhibiendo la unión a su sustrato u ocultando el dominio catalítico de la enzima, de modo que la enzima no sea funcional. La información actual sugiere que ambos mecanismos, individualmente o en combinación, son utilizados para inhibir la actividad de estas proteínas (Swulius & Waxham 2008). La unión del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ produce la disrupción del mecanismo auto-inhibitorio, liberando así el dominio catalítico de la enzima permitiendo la unión de ATP y sustrato simultáneamente para llevar a cabo la reacción catalítica.

La familia de las quinastas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se pueden dividir en dos categorías generales: las CaM quinastas restrictivas o de sustrato específico y las CaM quinastas multifuncionales. Las primeras, son quinastas que tienen un único sustrato conocido y tienden a realizar su función en una célula o tejido específico (CaMKIII, quinasa fosforilasa, y la quinasa de la cadena ligera de miosina). Las segundas son quinastas que poseen múltiples dianas y dirigen la señalización celular afectando a muchas otras vías, controlando así diversas funciones celulares (CAMKK, CAMKI, CAMKII y CAMKIV). Entre los sustratos de las CaM-quinastas existe una secuencia consenso RXXS/T; sin embargo, se han descrito sustratos que no contienen dicho consenso, y además existen cambios conformacionales que regulan el reconocimiento del sustrato. Algunas CaM quinastas son, a su vez, sustratos de otras quinastas, o de ellas mismas (debido a una auto-fosforilación).

2.1. CaM Quinastas Multifuncionales

2.1.1 CaM Quinasa Quinasa (CAMKK):

Esta proteína fue descrita independientemente por Lee & Edelman 1994, y Tokumitsu et al. 1995, en la búsqueda por encontrar el activador de la CaM quinasa I y la CaM quinasa IV, respectivamente; descubrieron la molécula activadora y que ésta molécula compartía las mismas características, definiéndose así la cascada de señalización de la familia de las CaM quinastas (Figura 4). ¿Por qué una cascada de señalización es activada por el mismo complejo ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) a diferentes niveles? La

respuesta no es del todo clara, es presumible pensar que sea un efecto cinético con un mecanismo de corrección; es decir, se asegura que las enzimas que se encuentren corriente abajo de la vía no estén completamente activas, a menos que la señal por Ca^{2+} persista y además sea suficiente para activar todos los componentes de la vía (Swulius & Waxham 2008)

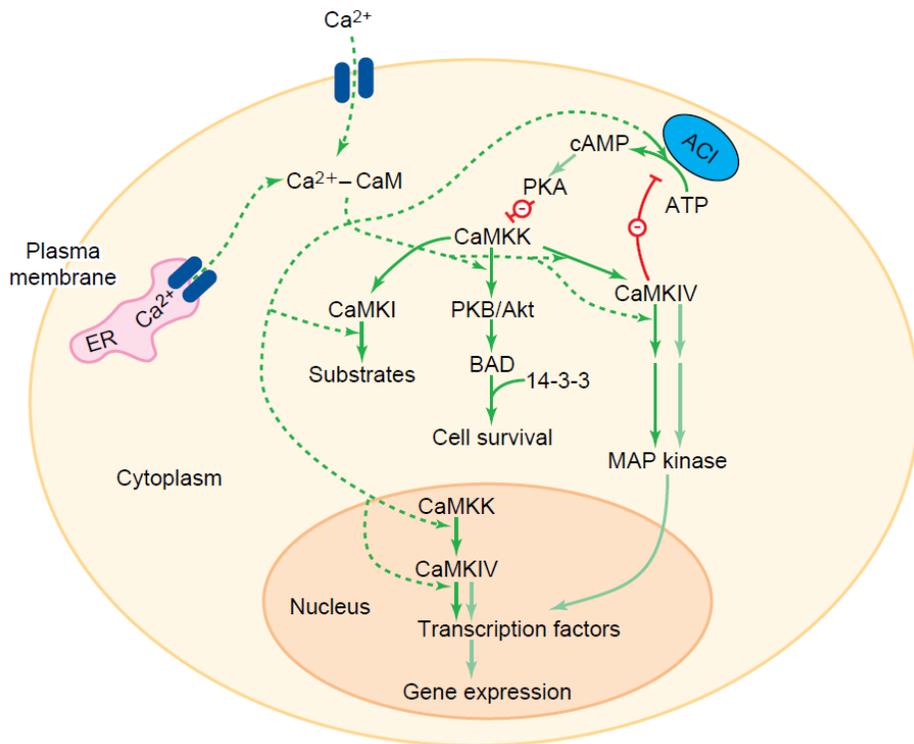


FIGURA 4. Cascada de las CaM quinasa. Los miembros de esta familia ubicados en el citosol regulan la supervivencia celular a través de la activación de la proteína quinasa B (PKB), y la transcripción de manera indirecta a través de la activación de las MAP quinasa. CaM quinasa IV (CAMKIV) puede fosforilar e inactivar la adenilato ciclasa tipo I (ACI), disminuyendo por tanto los niveles de AMPc. El incremento en los niveles de AMPc puede ejercer una regulación negativa de la vía puesto que activa PKA quien fosforila e inactiva la CaM quinasa quinasa (CAMKK). CAMKK y CAMKIV se encuentran también en el núcleo, donde pueden inducir la transcripción. Las flechas verdes indican las vías que son reguladas directamente por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, mientras que las flechas punteadas indican las vías independientes del complejo. Las flechas rojas indican los mecanismos inhibitorios (Soderling 1999).

Existen dos isoformas de CAMKK, la isoforma α contiene 505 aminoácidos y la isoforma β , que contiene 587 aminoácidos. Si bien cada isoforma está codificada por genes independientes, ambas proteínas conservan la organización en dominios al igual que las otras CaM quinasa. Poseen: un dominio auto-inhibitorio (AID: *auto inhibitori domain*) que actúa como pseudo- sustrato, es decir, se une al dominio catalítico y lo inactiva; un dominio de unión a calmodulina que se solapa parcialmente con el dominio AID, de modo que la unión a calcio y calmodulina rompe la asociación AID-dominio catalítico, permitiendo la actividad quinasa. El dominio catalítico de las CAMKKs tiene dos características muy particulares, la primera es la ausencia de residuos ácidos conservados, y la segunda es una región rica en arginina y prolina que permite la interacción con su sustrato. La quinasa fosforila la treonina del bucle de activación de CAMKI, CAMKIV, la proteína quinasa B/Akt (PKB), la AMPK y la quinasa SAD, teniendo como resultado la completa activación de su actividad quinasa.

La CAMKK se expresa mayoritariamente en el cerebro, y se ha observado que la isoforma α se expresa también en el timo e hígado, mientras que la isoforma β se expresa en muy bajos niveles en testículos, bazo y pulmón (Racioppi & Means 2012). A nivel celular, se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo, siendo capaz de responder a variaciones en la concentración de Ca^{2+} tanto citosólico como nuclear. A pesar de tener sustratos en común, las isoformas muestran actividades diferentes, por ejemplo la isoforma β tiene actividad independiente de Ca^{2+} /CaM después de su activación por dicho complejo (Tokumitsu et al. 2001), mientras que la actividad de la isoforma α es estrictamente dependiente del complejo. Esta diferencia en la regulación se explicaría que la CAMKK β pueda mantener la respuesta cuando la señal de Ca^{2+} haya finalizado.

- 2.1.1.1. **CAMKK β o CAMKK2** es una proteína de 66-68 KDa en mamíferos (Anderson et al. 1998) cuya secuencia de cDNA muestra un 90% de homología entre especies aunque la región no codificante en el extremo 3' muestra heterogeneidad significativa; la secuencias proteica presenta una homología de 30-40% con los miembros de la familia. La CAMKK β humana tiene secuencias consenso para muchos factores de transcripción que incluye a Ikaros, RUNX1 (Runt-related transcription factor1) y GATA1.

La actividad de la CAMKK β es diferente a la de otros miembros de la familia pues se auto-fosforila en la T482 ubicada en el dominio auto-inhibitorio manteniendo así una conformación parcialmente activa (en ausencia de su activador, el complejo Ca²⁺/CaM), generando una actividad independiente denominada *actividad autónoma*. La unión al complejo Ca²⁺/CaM incrementa su actividad, pero la actividad no es dependiente de dicha unión, por otra parte, la fosforilación en la T482 no es el único mecanismo de inducción de la actividad autónoma, pues al mutar el residuo se continúa observando este tipo de actividad (35% del total de actividad) (Tokumitsu et al. 2011). Se ha descrito que el extremo N-terminal de la proteína jugaría un rol importante en la generación de la actividad autónoma (Tokumitsu et al. 2001), pues es necesaria para la auto-fosforilación de la T482, así como para incrementar la actividad autónoma. Las proteínas GSK3 y CDK5 son las responsables de la fosforilación en la región N-terminal, específicamente en los residuos: S129, S133 y S137. También se han descrito otros sitios de fosforilación por PKA (Figura 5). Las proteínas diana de la CAMKK β son CAMKI, CAMK IV y AMPK, las cuales requieren la unión del complejo Ca²⁺/CaM a CAMKK para ser fosforilados.

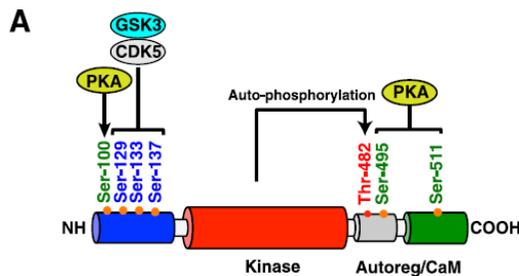


FIGURA 5. Estructura de CAMKK2 (CAMKK β). Los extremos N y C terminal de la proteína, en azul y verde, respectivamente. En rojo el dominio catalítico de la proteína, y en gris el dominio auto-inhibitorio que se solapa con el dominio de unión a Ca²⁺/CaM. Además se presentan los sitios de fosforilación actualmente descritos (Racioppi & Means 2012).

2.1.2 CAMKI

Es una proteína de la vía de las CaM quinasas que requiere para su activación tanto la fosforilación por la quinasa *upstream* de la vía (CAMKK)

como de la unión al complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Es una proteína ubicua, monomérica de aproximadamente 42 kDa y presenta cuatro isoformas: la isoforma α , $\beta 1$, $\beta 2$ y γ . Presenta la estructura característica de las CaM quinasa; en el extremo N-terminal se encuentra el dominio de unión a ATP y sustrato, y en el extremo C-terminal se encuentra el dominio regulatorio que incluye el dominio de unión a calmodulina. La unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ es necesaria para exponer la T177 permitiendo la fosforilación por la quinasa *upstream* (CAMKK), para ser completamente activa. La actividad de CAMKI es totalmente dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y al disminuir los niveles de Ca^{2+} disminuye también la actividad de CAMKI.

2.1.3 CAMKIV

Es otra quinasa de la vía y presenta dos isoformas (α y β) que están codificadas por un único gen. La isoforma α se encuentra en tejido neuronal, células T, y testículos; mientras que la isoforma β se expresa diferencialmente en el desarrollo de las células granulares del cerebro. CAMKIV se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde regula la transcripción dependiente de calcio de factores de transcripción, como por ejemplo CREB. Para su activación requiere primero la unión del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, que expone la T196 permitiendo su fosforilación por la CAMKK. A diferencia de CAMKI, una vez fosforilada se auto-fosforila en el extremo N-terminal, lo que le permite ser completamente activa e independientemente del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Soderling & Stull 2001). Una modificación adicional es la auto-fosforilación de la S332 del dominio de unión a calmodulina que previene la unión de otro complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Swulius & Waxham 2008).

2.1.4 CAMKII

No es un componente de la vía CAMKK – CAMKI/CAMKIV; sin embargo juega un papel muy importante en la transducción de señales debido a modificaciones en el calcio intracelular. La unión del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ rompe la unión del dominio auto-inhibitorio, permitiendo la fosforilación de la T286 (isoforma α), adquiriendo actividad independiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. La inactivación también depende de la fosforilación y se da en la T305 que interfiere en la afinidad por el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$; reduciendo la actividad quinasa.

Tabla 2. Características de las CAMKs multifuncionales (Swulius & Waxham 2008; Soderling & Stull 2001; Skelding et al. 2011; White et al. 1998)

	CAMKII	CAMKIV	CAMKI	CAMKK
Estructura	Oligomérica	Monomérica	Monomérica	Monomérica
Distribución	Ubicua	Cerebro, piel, timo, linfocitos T, médula, testículos y ovarios	Ubicua	Tejidos neuronales, timo, testículos y bazo.
Activación	Unión a Ca ²⁺ /CaM	Unión a Ca ²⁺ /CaM, fosforilación	Unión a Ca ²⁺ /CaM, fosforilación.	Unión a Ca ²⁺ /CaM, auto-fosforilación,
Regulación	Auto-fosforilación	Fosforilación por CAMKK.	Fosforilación por CAMKK	Fosforilación (inhibitoria)
Sustratos	Tirosina hidroxilasa, Glur1, MAP2	CBP, CREB, SRF, HDAC4, MEF2D.	Sinapsina, CFTR; CREB:	CAMKI, CAMKIV, PKB, AMPK.
Actividad autónoma	Sí	Sí	Nunca	Sí (isoforma β)
Secuencia consenso de reconocimiento en el sustrato	φ-X-R-NB-X-S/T	φ-X-R-X-X-X-S/T	φ-X-R-X-X-X-S/T-X-X-X-X-φ	Región rica en RP para el reconocimiento de sus sustratos
Mecanismo de inhibición	Defosforilación por PP1, PP2A, PP2C y CaMK fosftasa	Defosforilación por PP1, PP2A, PP2B, PP2C y CaMK fosftasa	Defosforilación por PP2A y CaMK fosftasa	Fosforilación por GSK3, CDK5 y PKA,

2.2. Importancia de la Familia de las CaM quinasas

Debido a su carácter multifuncional esta familia de quinasas se encuentra implicada en una gran diversidad de procesos de los cuales probablemente sólo se conocen unos cuantos. La cascada CAMKK/CAMKI, por ejemplo, está implicada en la remodelación del citoesqueleto asociado a la formación de la memoria (Racioppi & Means 2012). Por otra parte, la vía CAMKK2/CAMKIV/CREB es necesaria para la regulación del desarrollo del cerebelo (Ribar et al. 2000; Kokubo et al. 2009).

CAMKK2 y el complejo que forma con la AMPK-Ca²⁺/CaM dan lugar a una vía de señalización que media la homeostasis energética. Por otra parte, la cascada CAMKK2/CAMKI regula la fosforilación de HDAC5 y a su vez la de-represión de los genes cuyas proteínas son necesarias para la gluconeogénesis (Anderson et al. 2012). Además, la CAMKK2 cumple un rol en la adipogénesis y el metabolismo de la glucosa en el hígado; en estudios realizados, se ha encontrado que la diferenciación de los adipocitos se correlaciona negativamente con la expresión de CAMKK2 y AMPK (Lin et al. 2011). De igual manera que en los adipocitos, la expresión de CAMKK2 se correlaciona negativamente con la progresión de la diferenciación de los progenitores mieloides en granulocitos maduros.

CAMKK2/CAMKI también están implicadas en el control del remodelamiento del citoesqueleto y los cambios morfológicos inducidos por estímulos externos. Ambas forman un complejo con las proteínas GIT, una proteína activadora de GTPasa; PIX β, una Rho GTPasa, que recluta y activa a RAC1 y consecuentemente a PAK1, quien fosforila a sus múltiples dianas modulando el citoesqueleto; de hecho PAK1 fosforila a MLC, quien induce cambios en la polimerización de la actina (Ciani & Salinas 2008; Saneyoshi et al. 2008).

14

Los niveles de CAMKK2 están incrementados en células de cáncer de próstata y dicha expresión es dependiente de andrógeno. El receptor de andrógeno (AR) induce la expresión de CAMKK2 a través de un “*androgen responsive element*” en su promotor, y a su vez CAMKK2 regula positivamente la transcripción del RA estableciéndose una retroalimentación positiva entre ambas proteínas. De modo que el RA es capaz de regular el ciclo celular y crecimiento de las células cancerígenas de próstata (Karacosta et al. 2012).

Otro estudio sugiere que CAMKIV regula negativamente la degradación de mTOR mediada por ubiquitina; y además regula la expresión basal del complejo TORC1 aumentando la autofagia mediada por lipopolisacáridos y sepsis en macrófagos y células del riñón, pues activa mecanismos cito-protectores (Zhang et al. 2014).

3. *Schizosaccharomyces pombe* como modelo celular

Schizosaccharomyces pombe es una levadura de fisión ampliamente utilizada en el estudio de los mecanismos básicos conservados, a lo largo de la evolución. Este microorganismo fue aislado de una cerveza del este africano y fue desarrollado como modelo celular en los años 50 por dos investigadores de manera independiente. El fisiólogo Murdoch Mitchinson quien, interesado en estudiar el mecanismo por el cual la célula primero debe crecer para luego dividirse, empleó la levadura de fisión que debido a su forma cilíndrica facilitaba la metodología dado su crecimiento exclusivamente longitudinal. Por otra parte, Urs Leopold buscaba un organismo eucariótico “simple” en el que pudiera estudiar los mecanismos básicos de la genética. Para poder realizar sus estudios Urs edificó la infraestructura genética de este nuevo organismo modelo: caracterizando los diferentes tipos de apareamientos, estableciendo las condiciones para realizar cruces genéticos y aislando mutantes. En los años 70 Paul Nurse, usando las herramientas de Murdoch y Urs, convirtió la levadura de fisión en un modelo de referencia. Paul Nurse recibió el Premio Nobel en 2001 gracias a la caracterización de las quinasas dependientes de ciclina como actores clave en la regulación del ciclo celular. El año siguiente 2002, se concluyó la secuenciación del genoma de *S. pombe* siendo el sexto organismo cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado.

S. pombe es un buen modelo celular pues al ser unicelular, no representa la complejidad de otros modelos celulares, además puede ser manipulado genéticamente con facilidad y crece en condiciones de laboratorio. Muchos de los genes que se encuentran en la levadura de fisión se han encontrado incluso en el genoma humano, además la rapidez del ciclo celular lo convierte en una herramienta versátil. Las respuestas a estrés medioambiental, la regulación del ciclo celular fueron el inicio de *S. pombe* como modelo celular; pero después de la secuenciación del genoma se ha observado la gran riqueza de este organismo como modelo celular, pues posee regiones genómicas conservadas y características que comprenden: proteínas heterocromáticas, origen de replicación largos, largas secuencias centroméricas, mecanismos de control (*checkpoints*), funciones teloméricas, procesamiento del RNAm (*splicing*) y muchos otros procesos celulares.

4. CaM quinasas en *Schizosaccharomyces Pombe*

En *S. pombe* se han identificado 5 quinasas con homología de secuencia a las quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM: Cmk1, Cmk2, Srk1, Ssp1 y Ckk2. Se ha demostrado la funcionalidad de esta familia de quinasas en *S. pombe* al observar un arresto en el ciclo celular al sobre-exresar un mutante constitutivamente activo de CAMKII humana en la levadura, demostrando que ésta es capaz de reconocer sus sustratos en *S. pombe* (Rasmussen & Rasmussen 1994).

4.1 Ssp1

Es la primera CAMKK descrita en *S. pombe* (Hanyu et al. 2009), fue identificada por su rol en el ciclo celular y la respuesta a estrés a través del control de la disposición de los monómeros de actina (Matsusaka et al. 1995). Ssp1 es importante en la adaptación a estrés osmótico (Rupes et al. 1999) y además es necesaria para la viabilidad celular en condiciones de privación de glucosa. Posee un dominio de unión a calmodulina (putativo) y se une a las proteínas 14-3-3, tal como lo hacen las CAMKs de mamíferos (Hanyu et al. 2009; Saitoh et al. 2014; Freitag et al. 2014). También está implicada en la diferenciación sexual en *S. pombe* y es necesaria para la fosforilación de Ssp2, la AMPK en la levadura de fisión, tal y como lo hace su ortóloga la CAMKK (Valbuena & Moreno 2012). Recientemente se la ha descrito como un regulador de la coordinación del crecimiento y división celular a través de la fosforilación de Cdr2 (quinasa que fosforila e inhibe a Wee1)(Deng et al. 2014). En nuestro grupo acabamos de describir Ssp1 como sensora de la polarización de actina y la regulación de la mitosis a través de Srk1 (Gómez-Hierro et al. 2015).

4.2 Cmk1

Es homóloga a la CAMKI de mamíferos con un 40% de homología de secuencia, incluyendo la T192, que es un residuo conservado diana de fosforilación para la CAMKK. Además muestra actividad estrictamente dependiente Ca^{2+} /CaM, así como su homóloga en mamíferos CAMKI (Rasmussen 2000). Recientemente en nuestro laboratorio se ha descrito la vía de la CAMKK-CMKI presente en *S. pombe*, compuesta por Cmk1 y la nueva CAMKK hasta ahora denominada Ppk34 (Ckk2)(Cisneros-Barroso et al.

2014). La expresión de *Cmk1* es dependiente del factor de transcripción *Prz1*, que se activa para regular la señalización por Ca^{2+} (Hirayama et al. 2003). La activación de *Prz1* se lleva cabo por la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /CaM, *Ppb1* (calcineurina en mamíferos). Es así que cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan, *Ppb1* de-fosforila a *Prz1* y activa la transcripción de *Cmk1*, ésta es fosforilada por *Ckk2* para ser completamente activa; de modo que puede re-fosforilar a *Prz1*, constituyendo una retroalimentación negativa de la vía (Cisneros-Barroso et al. 2014) (Figura 6).

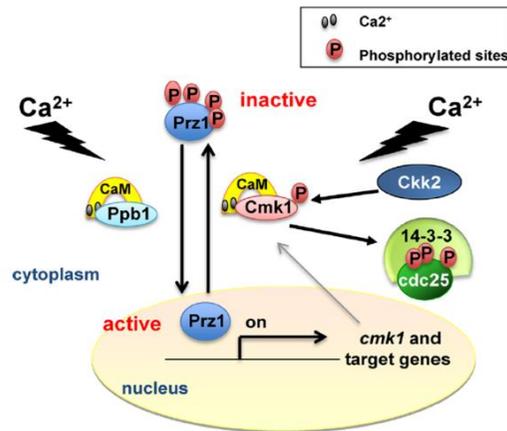


FIGURA 6. Modelo de la regulación del factor de transcripción *Prz1* por el eje *Ckk2-Cmk1* en *S. pombe* (Cisneros-Barroso et al. 2014)

4.3 *Cmk2*

La proteína *Cmk2* presenta homología con la familia de las CAMKs, sin embargo su estructura proteica está más relacionada con las CAMKs de *S. cerevisiae* *RCK1* y *RCK2*. *Cmk2* no es una proteína esencial (Alemany et al. 2002); además la sobre-expresión de *Cmk2* induce un bloqueo en la fase G2 del ciclo, dependiente de *Cdc2*. Se ha descrito que la ausencia de *cmk2* proporciona sensibilidad a estrés oxidativo, y que es específico de la quinasa. También se demostró que la quinasa se fosforila y activa a través de la MAPK *Sty* en respuesta a estrés oxidativo (Sánchez-Piris et al. 2002). Estudios recientes de nuestro grupo indican que *Cmk2* es esencial a estrés oxidativo por arsenito o cadmio.

4.4 Srk1

Fue descrita por primera vez en un cribado para identificar proteínas implicadas en la regulación por estrés, de la vía de Sty1 (*sty regulated kinase 1*). Está descrito que Sty1 la regula tanto transcripcional como post-traduccionalmente (Smith et al. 2002; López-Avilés et al. 2005). Srk1 regula la transición G2/M a través de la fosforilación e inhibición de la fosfatasa Cdc25 (López-Avilés et al. 2005). Srk1 es fosforilada y activada por la MAPK Sty; al igual que Cmk2 y, RCK1 y RCK2 quinasas ortólogas de *S. cerevisiae*, por lo que también se las denomina MAPKAPs quinasa (*mitogen activated protein kinase activated protein*).

5. CaM quinasas en *Saccharomyces cerevisiae*

En *Saccharomyces cerevisiae* están descritas dos quinasas pertenecientes a la familia de las CaM quinasas, denominadas Cmk1 y Cmk2, cuya actividad está regulada por calmodulina (Ohya et al. 1991; Pausch et al. 1991). Presentan un 90% de homología entre ellas. *CMK2* es el resultado de la duplicación del gen de *CMK1*. La quinasa Cmk1 presenta un 40% de homología con la CAMKII de rata en el dominio catalítico (Ohya et al. 1991). Se ha descrito una tercera quinasa perteneciente a esta familia denominada Cmk3. Cmk3, posee cierta homología de secuencia con las quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM, pero no se ha observado su unión a CaM y tampoco que su actividad esté regulada por Ca^{2+} (Melcher & Thorner 1996). Cmk1 y Cmk2 son homólogas a la CAMKII de mamíferos, y además presentan algunas características bioquímicas similares. Cmk2 es capaz de autofosforilarse y adquirir actividad independiente de Ca^{2+} /CaM tal como lo hace su homóloga la CAMKII. Cmk1 por el contrario, no posee actividad independiente de Ca^{2+} /CaM (Pausch et al. 1991). Estas proteínas están implicadas en la señalización de respuesta a determinados estreses, y no son vitales para el crecimiento; incluso el doble mutante *CMK1 CMK2* es viable; se entiende que existen otras proteínas encargadas de sustituir la función de estas quinasas *in vivo* (Ohya et al. 1991).

Existen otras dos quinasas, Rck1 y Rck2, en *S. cerevisiae* incluidas dentro de la familia de las CaM quinasas debido a la homología de secuencia, pero no presentan actividad dependiente de Ca^{2+} /CaM. Dado que el mutante $\Delta RCK1 \Delta RCK2 \Delta CMK1 \Delta CMK2$ es viable se concluyó que estas quinasas no constituyen una única familia de quinasas y que además no comparten funciones al menos durante el crecimiento vegetativo (Melcher & Thorner 1996). Por otra parte se encontró que las quinasas Rck1 y Rck2 poseen un dominio de unión a las MAPK, conformando por tanto la familia de las MAPKAP quinasas en *S. cerevisiae* (Bilsland et al. 2004). Rck1 y Rck2 son sustratos de la MAPK Hog1 y son necesarias para la viabilidad celular en respuesta al estrés oxidativo (Bilsland et al. 2004). Rck2 ha sido implicada en la modulación de la síntesis proteica mediante la fosforilación del factor Ef-2 (Teige et al. 2001).

Los apartados 6 y 7 no están relacionados con el tema de las CAM quininas pero hemos considerado incluirlos dada su relevancia en el desarrollo de esta tesis

6. Deprivación de nutrientes: Nitrógeno y Glucosa.

6.1 Deprivación de Nitrógeno

La deprivación de nitrógeno en *S. pombe* induce dos tipos de respuesta en la levadura, por una parte produce un arresto en la fase G_1 del ciclo celular, y por otra la entrada en meiosis; ésta última dependerá de si existe en el medio una célula del sexo opuesto. Las células pueden reiniciar el ciclo proliferativo después de 4 horas en deprivación por nitrógeno si la fuente de nitrógeno es reestablecida. Si la deprivación por nitrógeno se prolonga, las células entran en un estado de latencia denominado G_0 (Su et al. 1996) (Figura 7), cambiando totalmente sus características con respecto a aquellas en el estado G_1 . Las células en G_0 poseen características muy

20

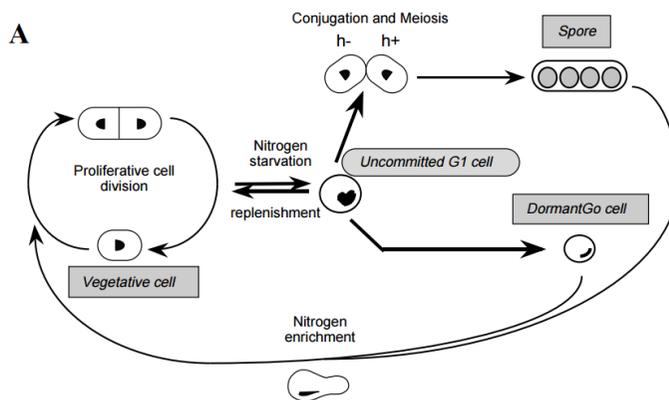


FIGURA 7. Tres diferentes estados en el ciclo de *Schizosaccharomyces pombe*. Las células heterotálicas deprivadas por nitrógeno entran en un estado G_1 no comprometido, a partir del cual pueden entrar en dos procesos diferentes, según las condiciones del medio, si existe una célula del sexo opuesto entrarán en meiosis y si no es el caso, entrarán en un estado de latencia denominado G_0 . Si se reestablece la fuente de nitrógeno las células volverán a entrar al ciclo vegetativo. (Su et al. 1996)

particulares como: pérdida de polaridad, reducción del tamaño celular, condensación de la cromatina, y formación de vacuolas y estructuras lipídicas en el citoplasma.

Inmediatamente después de ser transferidas al medio deficiente de nitrógeno, las células detienen su crecimiento y se produce un aumento en el índice de septación (indicando un retraso en la citocinesis); hasta alcanzar un 20%, pero en seguida se reestablece hasta alcanzar un 0% a las 24 horas aproximadamente; cuando se establece *el estado de latencia* G₀ (Sajiki et al. 2013). La parada de la división celular va acompañada de la reducción en el tamaño celular, el cual, es evidente a partir de las 6 horas; cuando alcanzan un tamaño de 6.4 μm (siendo la media de 10.5 μm en medio rico), mientras que a las 24 h de privación la longitud es de 5.8 μm (Su et al. 1996), permaneciendo el número de células constante. La acumulación de Rum1, la proteína inhibidora del complejo ciclina-CDK, está relacionada a un normal arresto en G₁ (Daga et al. 2003).

Recientes estudios demuestran que la vía de señalización de AMPc-Pka1 juega un rol importante en la activación de los genes inducidos en privación por nitrógeno; así como la represión de dichos genes en condiciones ricas en nitrógeno (Liu et al. 2015).

La respuesta a las condiciones de privación de nitrógeno está siendo ampliamente estudiada porque activa la respuesta de Tor. Tor es una quinasa que pertenece a la familia de las PIKK (PI3K-related) y forma parte de un complejo altamente conservado (Sabatini et al. 1994; Jacinto & Lorberg 2008); característica que ha permitido estudiar los mecanismos que regulan la actividad del complejo en modelos celulares más simples como *S. pombe* (Figura 8). mTOR (*mamalian target of rapamycin*) es un regulador clave del metabolismo y crecimiento celular integrando señales de disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Kim et al. 2002). En la célula mTOR se encuentra formando dos complejos diferentes denominados mTORC1 y mTORC2 (Hara et al. 2002; Pearce et al. 2007). mTORC1 es sensible a rapamicina y contiene además una subunidad reguladora denominada RAPTOR ("*regulatory-associated protein of mTOR*") que regula entre otros procesos, la síntesis de lípidos y proteínas, la progresión del ciclo celular el metabolismo y la autofagia (Kazyken et al. 2014; Bracho-Valdés et al. 2011).

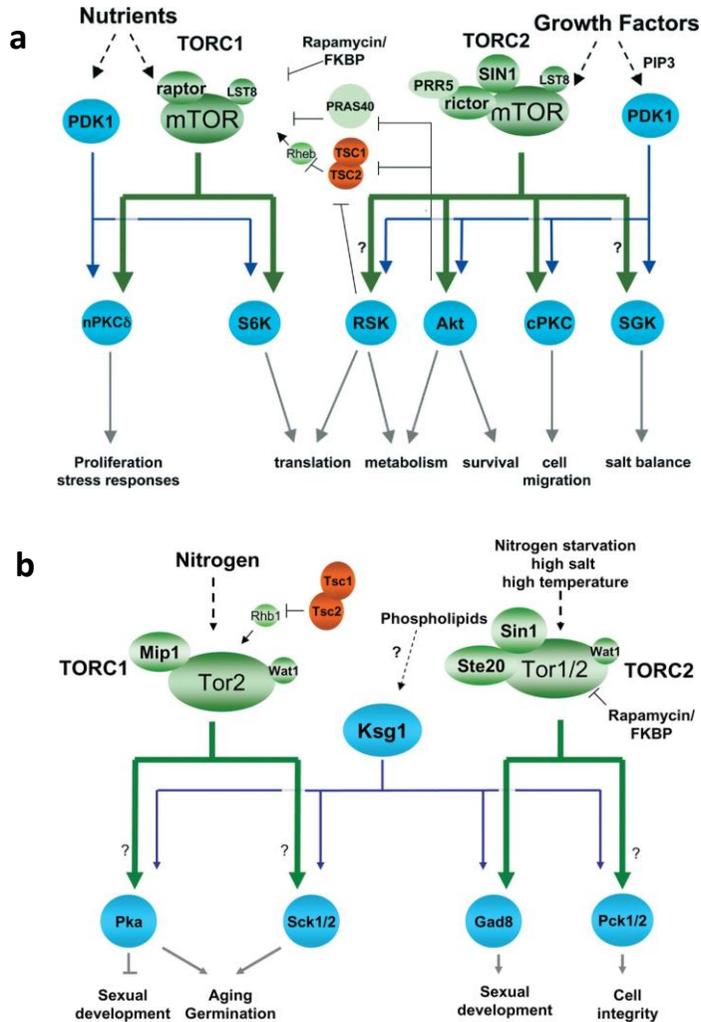


FIGURA 8. Señalización de los complejos de TOR. (a) En presencia de señales de crecimiento como nutrientes y factores de crecimiento mTOR activa sus proteínas diana (AGC quinasas). (b) Señalización de los complejos TORC1 y TORC2 en *Schizosaccharomyces pombe*. Los componentes del complejo mTOR conservados están en verde oscuro, mientras que las proteínas que interactúan con el complejo, no conservadas se encuentran en verde claro. (Jacinto & Lorberg 2008)

mTORC2, insensible a rapamicina y compuesto además por RICTOR, es un importante regulador del citoesqueleto de actina (Jacinto et al. 2004). mTORC1 es activada por la GTPasa Rheb; el heterodímero TSC1-TSC2 favorece la unión GDP-Rheb inhibiendo la GTPasa y por tanto inhibiendo la activación del complejo mTORC1. TSC1/TSC2 son diana de muchas vías de

señalización, incluso del mismo complejo mTORC1, y la vía de las MAPK. El 80% de los cánceres humanos muestra una señalización aberrante de mTOR (Menon & Manning 2008; Perl 2015), y además estos complejos están implicados en diversos procesos celulares (Perl 2015), de allí el gran interés por desvelar cuáles son los mecanismos por los cuales se regulan estos complejos.

La levadura de fisión *S. pombe* posee también dos complejos denominados TORC1 y TORC2, pero a diferencia de organismos superiores cada complejo posee dos subunidades catalíticas diferentes Tor2, forma parte del complejo TORC1, y Tor1 del complejo TORC2 (Weisman 2010).

Resulta interesante que una mutación en un componente del complejo TORC1, *tor2^{ts}* o la depleción del gen, simula la respuesta a privación por nitrógeno (Uritani et al. 2006; Weisman et al. 2007); esto indicaría que la actividad de Tor2 disminuye durante la respuesta a privación de nitrógeno, permitiendo el cese de la división celular y el consecuente arresto del ciclo celular en G₁, así como la división de la célula a un menor tamaño. En conclusión, Tor2 tiene una actividad dual como regulador positivo del crecimiento y regulador negativo de las respuestas a privación (Figura 9). Por otra parte, el componente Tor1 del complejo

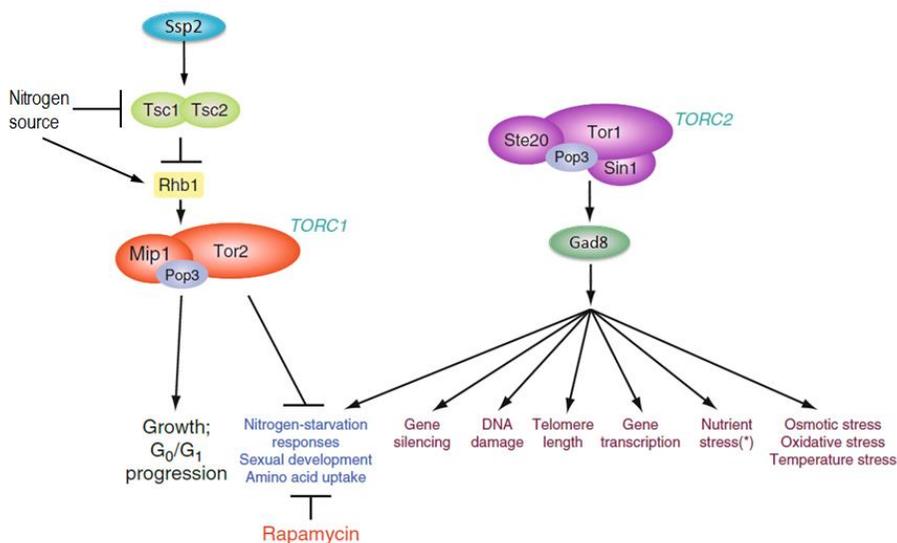


FIGURA 9. Modelo esquemático del modo de acción de TORC1, TORC2 y rapamicina en *Schizosaccharomyces pombe*. Modificado de (Weisman 2010)

TORC2 es necesario para la respuesta a privación por nutrientes, la supervivencia bajo condiciones de estrés, y además es parte de la respuesta por daño al ADN y el mantenimiento de la longitud de los telómeros. A pesar de ser un gen no esencial, resulta esencial en condiciones de estrés (Weisman 2010).

Cuando hay disponibilidad de nitrógeno en el medio, la proteína activadora de TORC1, Rhb1, activa el complejo y permite el crecimiento en condiciones ricas de nitrógeno. Por el contrario, cuando las condiciones del medio cambian y se produce un estrés por nitrógeno (deficiencia en el medio), se activa Ssp2, la AMPK de *S. pombe*; que fosforila al complejo Tsc1/Tsc2 activando su función inhibidora sobre Rhb1 y como consecuencia inhibiendo TORC1 (Davie et al. 2015).

6.2 Deprivación de Glucosa

La glucosa es la fuente de carbono preferida de la mayor parte de tipos celulares. El principal sensor de glucosa en el medio en *S. pombe* es la vía de AMPc/PKA (Figura 10). PKA es el complejo dependiente de AMPc conformado por la subunidad catalítica Pka1 y la subunidad reguladora Cgs1 en *S. pombe* (Gupta et al. 2011). Cuando hay disponibilidad de glucosa en el

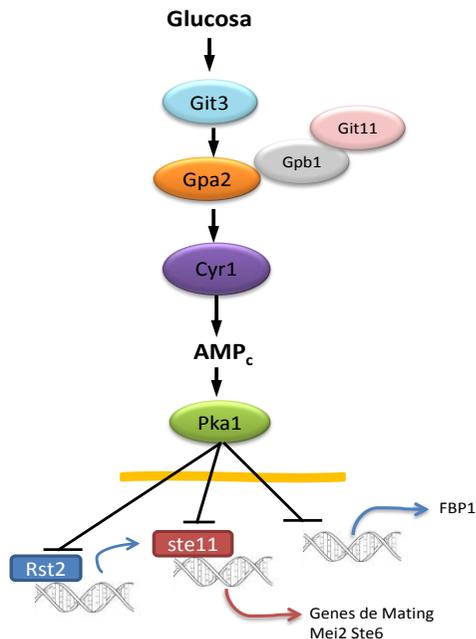


FIGURA 10. Activación de PKA, principal sensor de glucosa por la vía de AMPc.

medio, se activa Git3 una proteína G, que activa la proteína Gpa2 quien conforma un complejo heterotrimérico con las proteínas Git5 y Git11; permitiendo así la unión de GTP y, la interacción y activación de la adenilato ciclasa Cyr1. Cyr1 promueve un incremento transitorio de AMPc que tiene como consecuencia la activación de PKA. Pka1, se dirige al núcleo donde reprime la activación de genes implicados en la respuesta de privación por nutrientes y de diferenciación sexual (*ste11, rst2, fbp1*).

Cuando los niveles de glucosa en el medio disminuyen, hay una consecuente disminución en la actividad de PKA (Mudge et al. 2014). Pka1, que se encontraba en el núcleo, es exportada al citoplasma como consecuencia de la interacción con el regulador Cgs1 y su posterior fosforilación (Gupta et al. 2011).

La CAMKK Ssp1 y el inhibidor de fosfatasa Sds23 han sido descritos como esenciales para el crecimiento en bajos niveles de glucosa (Hanyu et al. 2009). Inmediatamente después del cambio a un medio bajo en glucosa, se observa una inhibición del ciclo celular durante las 2 primeras horas, después de las cuales se reactiva el ciclo celular (Saitoh & Yanagida 2014). Esto podría indicar que existe algún tipo de mecanismo o *checkpoint* responsable de dicho arresto, donde la CAMKK Ssp1 podría estar implicada ya sea como sensor o ejecutor, y también su efector Ssp2, puesto que Ssp2 se desplaza al núcleo ya sea durante privación por glucosa como por nitrógeno para inducir la acumulación del factor de transcripción Ste11 (Valbuena & Moreno 2012).

Otra proteína recientemente descrita, cuya delección es esencial en bajas concentraciones de glucosa, es el transportador de glucosa Ght5 (Saitoh et al. 2014; Saitoh & Yanagida 2014). La expresión de éste transportador es dependiente del represor transcripcional Scr1. En condiciones ricas de glucosa el represor se encuentra en el núcleo, y en condiciones bajas de glucosa este factor es exportado al citoplasma; este proceso estaría mediada por Ssp1 y el inhibidor Sds23, aunque el mecanismo no está del todo definido (Figura 11). Una vez la expresión del gen del transportador Ght5 es activa, el complejo TORC2, su efector Gad8 y la quinasa Ksg1 serían los responsables de su desplazamiento y acumulación en la membrana plasmática.

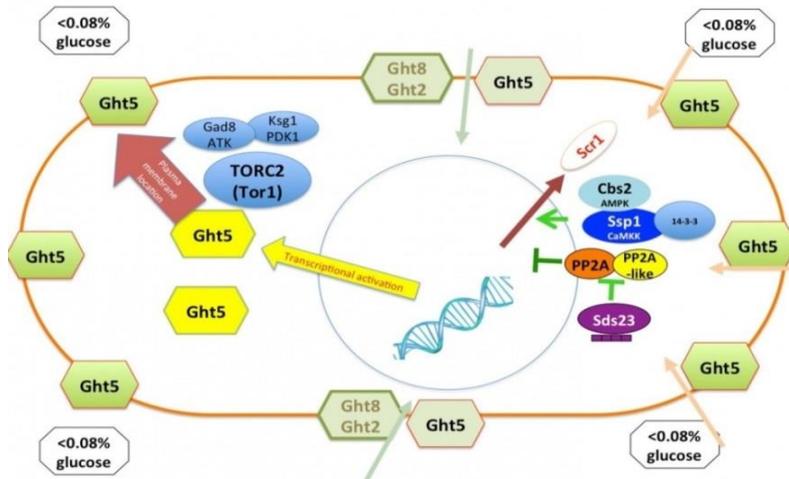


FIGURA 11. Respuesta de la privación por Glucosa y vías de señalización implicadas(Saitoh et al. 2014).

Otra vía implicada en la respuesta a glucosa es la vía de la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Pmk1, pues se activa por privación de glucosa. La GTPasa Rho2 activa a Pck2 quien a su vez activa a Pmk1. La vía de Pmk1 podría inhibir la activación del complejo TORC2 y su efector Gad8, pues se observa una reducción en sus niveles de fosforilación, como contraparte de la activación por PKA (Cohen et al. 2014) (Figura 12). La activación de TORC2 mediada por PKA, ha sido discutida (Hatano et al. 2015) pues Gad8 se observa activo/fosforilado en cualquiera de los mutantes de la vía de PKA y por tanto no sería activado a través de PKA.

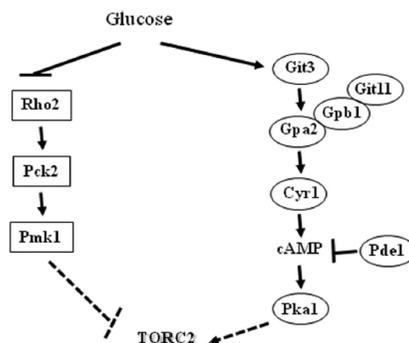


FIGURA 12. Regulación del complejo TORC2 por la vía de MAPK/Pmk1. (Cohen et al. 2014)

7. Modificaciones pos-traduccionales: sumoilación.

Las modificaciones pos- traduccionales son el mecanismo por el cual la célula regula el destino de una proteína, una misma modificación puede significar un destino diferente, las fosforilaciones son un ejemplo de ello. Una fosforilación puede activar la función de una proteína o por el contrario la puede inhibir. Las modificaciones pos-traduccionales ocurren mediante cambios químicos de los aminoácidos que constituyen una proteína y pueden ser de muchos tipos. Se pueden dividir en dos grupos, aquellas que agregan grupos funcionales, tales como: acetilación, fosforilación, hidroxilación, glicosilación, sulfonilación, prenilación, nitrosilación y nitración. Y modificaciones que enlazan proteínas como: la sumoilación y la ubiquitinación; por las cuales se enlaza sumo y ubiquitina a una proteína diana, respectivamente.

SUMO (por las siglas de su nombre en inglés *small ubiquitin-related modifier*) es una pequeña proteína semejante a ubiquitina que está implicada en muchos aspectos de la función celular, incluyendo mantenimiento de la estructura de la cromatina, reparación y recombinación del ADN, ciclo celular, transcripción, procesamiento del ARN, transporte núcleo/citoplasmático, y vías de señalización. A nivel molecular, SUMO cambia la superficie de la proteína diana, afectando la interacción con otras proteínas, su localización o actividad. En eucariotas superiores se han descrito 4 isoformas (SUMO-1, -2, -3 y -4); mientras que en eucariotas inferiores como *Drosophila* sólo existe una isoforma (Wang & Dasso 2009). Se ha descrito hasta el momento un ortólogo de SUMO en *S. pombe* Pmt3, que está implicado en procesos como segregación cromosómica y mantenimiento de la longitud de los telómeros; a diferencia de su ortólogo en *S. cerevisiae*, *pmt3*, no es esencial (Tanaka et al. 1999).

El proceso de sumoilación es semejante al de ubiquitinación (Figura 13). Sumo se produce como un precursor que es procesado por proteasas específicas (Ulp's) hasta alcanzar la forma madura. La forma madura es activada por enzimas activadoras de sumo (E1, Aos1/Uba2, Rad31/Fub2), seguidamente sumo es transferido a una enzima conjugadora de sumo (E2, Ubc9, Hus5). Desde aquí sumo puede ser conjugado a la proteína diana directamente o a través de unas proteínas denominadas sumo ligasas (SENPs, PIAS's, Pli19). La enzima conjugadora de sumo puede reconocer el

motivo Ψ -K-X-[D/E] (donde Ψ es un residuo alifático y X es cualquier residuo) y conjugar directamente el sumo. Por otra parte, algunas proteínas diana de sumo contienen el motivo de interacción con sumo (SIM) y promueven su propia conjugación (Wang & Dasso 2009). De acuerdo a la secuencia consenso del SIM se han redefinido hasta el momento tres tipos diferentes: SIMa, es el mejor caracterizado y consiste en cuatro residuos hidrofóbicos [I/V]X[I/V] [I/V] seguido por un grupo de residuos cargados negativamente. SIMr es muy parecido al anterior pero contiene un grupo de residuos ácidos que lo preceden. SIMb es el mejor conservado y la mayoría se adhieren a este tipo de secuencia VIDLT (Miteva et al. 2010).

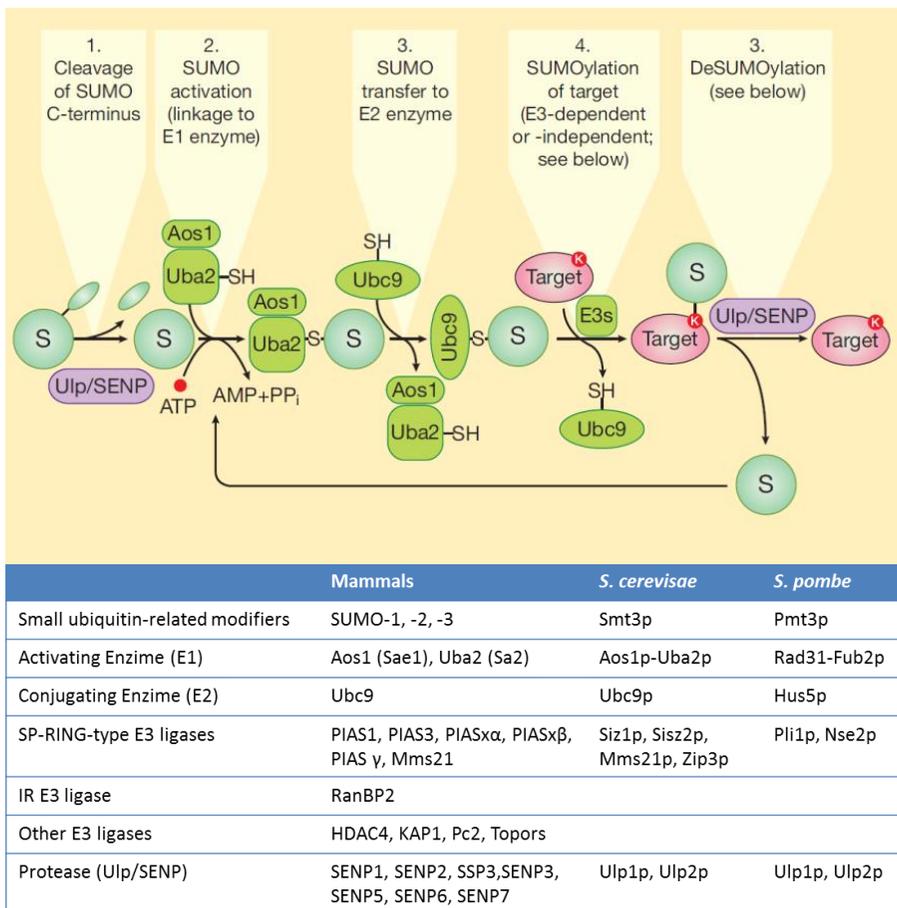


FIGURA 13. Pasos principales del proceso de sumoilación. Componentes de la vía de Sumo entre especies. (Wang & Dasso 2009)

ANTECEDENTES

1. Estudio y Caracterización de la quinasa Cmk1 en *Schizosaccharomyces pombe*

La investigación del grupo se ha centrado en los últimos años en estudiar la familia de las CaM quinases en *S. pombe*. El trabajo más reciente se enfocó en encontrar la quinasa que regulara y/o activara a la quinasa Cmk1, así como describir la vía de señalización en la que estuviera implicada. Como primer resultado se observó que el mutante delecionado para *cmk1* era viable a altas concentraciones de calcio (75 mM) (Figura 14).

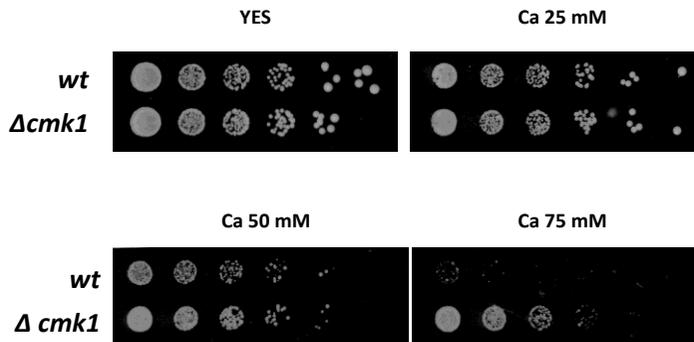


FIGURA 14. Viabilidad del mutante $\Delta cmk1$ a altas concentraciones de Ca^{2+} .

También se observó que la expresión de una forma fosforilada de Cmk1 aumentaba en respuesta a Ca^{2+} (Figura 15A). El aumento de expresión era a nivel transcripcional y este aumento se relacionó con el factor de transcripción Prz1. Los niveles de RNAm no aumentaban en el mutante con el gen *prz1* delecionado (Figura 15B y 15C). Por tanto Prz1 era el encargado de activar la transcripción de *cmk1* en respuesta a estrés por Ca^{2+} .

Prz1 es un factor de transcripción que en condiciones normales se encuentra fosforilado e inactivo en el citoplasma. En respuesta a un incremento de Ca^{2+} , se forma el complejo Ca^{2+}/CaM que activa a la fosfatasa calcineurina, la cual defosforila y activa al factor de transcripción Prz1. Prz1 una vez activo, se traslada al núcleo e inicia la transcripción de sus genes diana (Hirayama et al. 2003), entre ellos *cmk1* (Cisneros-Barroso et al. 2014).

En otros sistemas como en *Saccharomyces cerevisiae* o eucariotas superiores el factor de transcripción homólogo a Prz1 (CRZ1 y NFAT) es re-fosforilado por quinasas como caseína quinasa (CK1, Hhr25), PKA, la CDK Pho85, GSK3, la quinasa DYRK, la MAPK p38 y JNK. De modo que el factor de transcripción es rápidamente exportado al citoplasma y así la expresión dependiente de calcineurina cesa. En el grupo se encontró que Cmk1 es la responsable de re-fosforilar e inactivar Prz1 en respuesta a Ca^{2+} (Cisneros-Barroso et al. 2014).

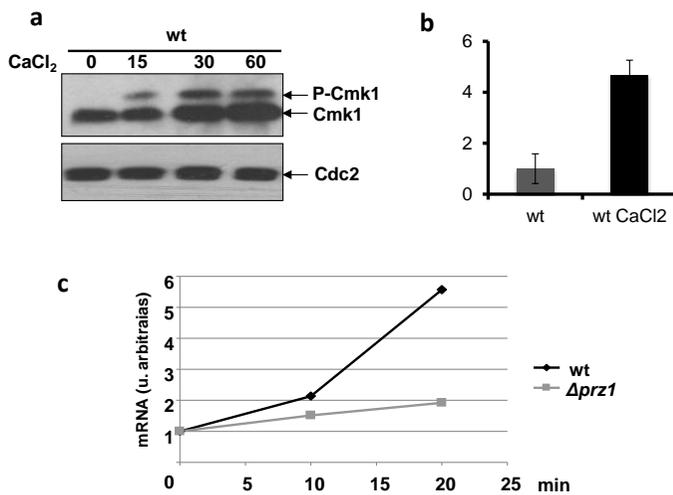


FIGURA 15. La transcripción de Cmk1 está regulada por el factor de transcripción Prz1 en respuesta a Ca^{2+} . (a) Expresión de Cmk1 en estrés por Ca^{2+} (100mM). (b) Incremento en los niveles de mRNA de Cmk1 en respuesta a Ca^{2+} . (c) Niveles de mRNA de Cmk1 en células wt y el mutante deleciónado para *prz1*.

Otro objetivo del proyecto era encontrar la quinasa responsable de fosforilar y activar a Cmk1. En mamíferos la CAMK1 es fosforilada por la CAMKK2 en la T177 para alcanzar su total activación. Por homología de secuencia se había identificado una treonina en la posición 192 de Cmk1 en *S. pombe*, la cual al mutarla a ácido aspártico (mimético de fosforilación) provocaba un aumento de la actividad unas 15 veces (Rasmussen 2000). Esto reforzaba la teoría de la existencia de una quinasa *upstream* de Cmk1, es decir una CaM quinasa quinasa. Hasta ese momento solo se había

descrito una quinasa en *S. pombe* ortóloga de la CaMKK, la quinasa Ssp1 (Hanyu et al. 2009). Por tanto era presumible pensar que Ssp1 fuese la responsable de fosforilar a Cmk1. Se realizaron ensayos de viabilidad a estrés por Ca^{2+} y se observó que el mutante delecionado para *ssp1* no compartía la alta viabilidad que presenta el mutante Δcmk1 (Figura 16B). Además al analizar los niveles de fosforilación de Cmk1 se vió que Cmk1 seguía fosforilándose en la cepa Δssp1 , indicando que Ssp1 no era la quinasa responsable de fosforilar a Cmk1 en respuesta a Ca^{2+} (Figura 16A).

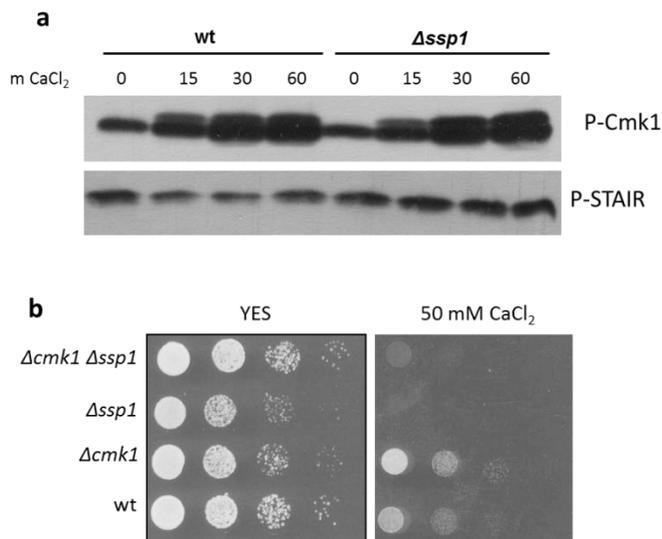


FIGURA 16. La Fosforilación de Cmk1 en respuesta a Ca^{2+} no es dependiente de la CAMKK Ssp1. (a) *western blot* de Cmk1 en respuesta a Ca^{2+} , las células *wt* y Δssp1 fueron tratadas con Ca^{2+} y se recogieron muestras a los tiempos indicados. (b) Ensayo de viabilidad de las cepas *wt*, Δcmk1 , Δssp1 y $\Delta\text{cmk1}\Delta\text{ssp1}$.

Analizando con detalle el genoma de *S. pombe* se encontró una secuencia SPC1919.01, que así como Ssp1 presentaba un alto grado de homología a la CaMKK de mamífero, específicamente a la isoforma 2. Esta secuencia correspondía a una quinasa no caracterizada denominada ppk34 (por sus siglas en inglés *putative protein kinase 34*). Esta quinasa había sido descrita previamente en cribados de largo alcance; en uno de ellos se determinó que podría estar implicada en procesos como biogénesis de la pared celular, regulación del ciclo celular, y establecimiento del crecimiento polarizado, debido a la sensibilidad del mutante a determinados estreses

(Bimbo et al. 2005). Otro estudio determinó que Ppk34 podría estar implicada en la regulación negativa de NETO (*New end take of*) debido al alto porcentaje de células bipolares (Koyano et al. 2010).

Se analizó el mutante $\Delta ppk34$ y se observó que era viable a altas concentraciones de Ca^{2+} , al igual que el mutante $\Delta cmk1$ (Figura 17a). Por otra parte la banda de migración electroforética retardada correspondiente a la fosforilación de Cmk1 en estrés por Ca^{2+} no se observa en la cepa $\Delta ppk34$, por tanto Ppk34 era la responsable de fosforilar a Cmk1 *in vivo*, (Figura 17b). Ppk34 fue denominada por nuestro grupo como Ckk2 (*CaM kinase kinase 2*) por su función y homología de secuencia a la CAMKK2. Estos resultados establecían una nueva vía de señalización de CaM quinasas en *S. pombe* donde Ckk2 es capaz de fosforilar y activar a Cmk1 en respuesta a Ca^{2+} .

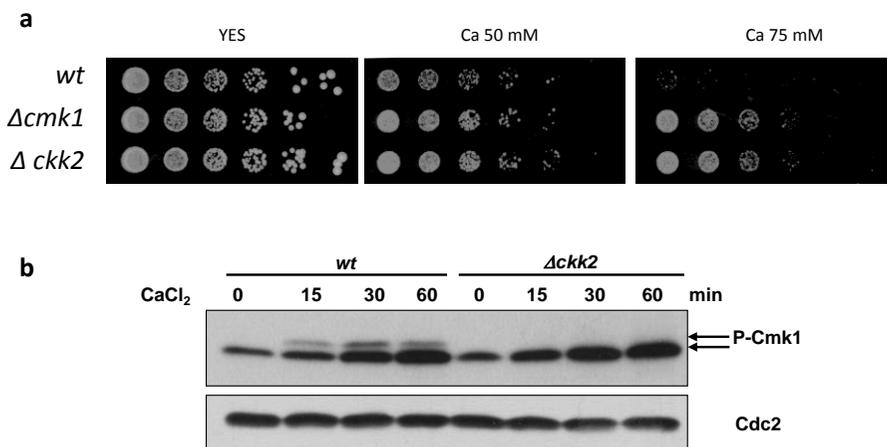


FIGURA 17. (a) Ensayo de viabilidad en Ca^{2+} . La delección de *ckk2* aumenta la tolerancia a estrés por Ca^{2+} así como lo hace el mutante de *cmk1*. (b) Ckk2 está implicada en la fosforilación de Cmk1 *in vivo*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Tal como se ha comentado en antecedentes, nuestro grupo identificó una nueva CAMKK funcional en *S. pombe*. El proyecto de esta tesis se centró en seguir la caracterización de esta nueva CAMKK, Ckk2. Por tanto el objetivo global de esta tesis doctoral es:

1. Caracterización funcional de la Quinasa Ckk2 en *Schizosaccharomyces pombe*.

Para alcanzar dicho objetivo se marcaron tres objetivos puntuales:

- A. Análisis de la secuencia y la actividad de la quinasa Ckk2.
- B. Respuesta del mutante $\Delta cck2$ frente a diferentes tipos de estrés y condiciones celulares, para identificar nuevas funciones de Ckk2.
- C. Identificación de nuevos sustratos de la quinasa Ckk2.

MATERIALES Y METODOS

1. Técnicas de manipulación de ADN

1.1 PCR (*Polymerase chain reaction*)

La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar un fragmento de ADN mediante el uso de oligonucleótidos o *primers* específicos de la región de interés. Esta reacción se lleva a cabo mediante ciclos consecutivos a diferentes temperaturas que permiten completar las 3 fases de la reacción: desnaturalización, hibridación y elongación.

Reactivos:

Tampón 10X (+MgCl ₂ 50 mM)	5 µl
Oligonucleótido 5' 10 µM	1 µl
Oligonucleótido 3' 10 µM	1 µl
dNTPs 25 µM	0.4 µl
DNA molde 0,1 µg/µl	1 µl
Polimerasa *	1 µl
Agua estéril	40.6 µl

41

* En el laboratorio usamos dos polimerasas diferentes, una denominada *Expand High Fidelity* (Roche: 3,5 U/µl) que se caracteriza por ser una polimerasa que amplifica y a la vez tiene actividad de corrección con alto rendimiento y fidelidad. La otra polimerasa es la *EcoTaq DNA Polymerase* (Ecogen: 5U/µl) que utilizamos para comprobación de cepas o clonajes donde no es necesario la actividad de corrección ni fidelidad de la amplificación.

Las condiciones de amplificación son las siguientes: Un primer paso de desnaturalización a 94°C de 3 minutos; luego un segundo paso de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un tercer paso de hibridación cuyas condiciones varían en cuanto a la temperatura entre 50 y 60 °C según los oligonucleótidos utilizados y de tiempo entre 30 y 60 segundos. Cuarto paso, la elongación se lleva a cabo a 72°C de 1 a 3 minutos dependiendo de la longitud del fragmento a amplificar. A partir del segundo paso hasta el cuarto se repiten 30 ciclos y finalmente se realiza un paso final de elongación a 72°C durante 10 minutos.

1.2 Clonaje

El clonaje es una técnica que nos permite insertar un fragmento de ADN en un vector y puede servir para diferentes propósitos. Para realizar el clonaje de un fragmento de ADN debemos primero aislar el fragmento que queremos insertar en el plásmido y/o vector de clonaje, para luego unirlos mediante un proceso denominado ligación.

- **Digestión con Enzimas de Restricción:** La digestión del DNA mediante enzimas de restricción permite obtener fragmentos que podrán ser posteriormente utilizados en reacciones de ligación para clonar un fragmento de ADN en un vector o comprobar construcciones, dado que en función de si un plásmido contiene un inserto o no el patrón de restricción que se obtendrá será diferente. La reacción de digestión se realiza con un máximo de 1 µg de ADN por 1U de enzima de restricción, y bajo las indicaciones de las casas comerciales (*Invitrogen* y *Takara*).
- **Ligación:** es la unión del fragmento con el vector, previamente digeridos con las mismas enzimas de restricción. La reacción se lleva a cabo con la T4 DNA ligasa de *invitrogen* toda la noche (O/N) a 16°C; para facilitar la unión de los fragmentos adecuadamente es recomendable que el número de moléculas de inserto sea de 3 a 6 veces mayor que el número de moléculas de plásmido, no superando la cantidad de 300 ng entre ambos. Los productos de la reacción se transforman en células de *Escherichia coli DH5α* competentes para su posterior comprobación ya sea por PCR o digestión enzimática.

1.3 Aislamiento de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (MiniPrep) se realiza utilizando el kit Nucleospin® Plasmid QuickPure de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucción del fabricante.

1.4 Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos provenientes, ya sea de una amplificación de PCR o de una digestión enzimática, se realiza con el kit *NucleoSpin Extract* de *Macherey-Nagel*.

1.5 Electroforesis de ADN

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico, en función de su peso molecular. Nos permite visualizar los productos de PCR, analizar patrones de restricción, entre otros. Los geles de agarosa se preparan en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) donde se disuelve la agarosa sólida. El porcentaje de agarosa utilizado depende del tamaño de los fragmentos que se quieren separar. Se utiliza bromuro de etidio (*Sigma E1510*) para visualizar el DNA al ser expuesto a luz UV.

1.6 Plásmidos utilizados

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Diana	Origen
pGEX- <i>cmk1</i>	XhoI/NotI	Stock del laboratorio
pGEX- <i>cmk1K60A</i>	XhoI/NotI	Stock del laboratorio
pGEX- <i>cmk1T192AK60A</i>	XhoI/NotI	Stock del laboratorio
pREP1- <i>ckk2</i>	PstI/NotI	Este trabajo
pGEX- <i>ckk2</i>	EcoRI/NotI	Este trabajo
pET20- <i>Cam</i>	XhoI/NotI	Stock del laboratorio

43

1.7 Oligonucleótidos utilizados

Tabla4. Oligonucleotidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia
Ckk2Fwd EcoRI	CGCGCGGAATTCATATGTCTCTTCTCTCCCTAGTTTTTAAGC AGTA
Ckk2 Rv NotI	CGCGCGGCGGCCGCTTATCTCCCATATGGAAGAGAATGCTGTTAC GATA
Ckk2 pFA6a del-fwr	GCTTTATATTTGAATATCCATTCCATCGCTGTGCGGTGAAGTCACT GCATTAACAAGAACCCCGGATCCCCGGGTTAATTAA
Ckk2 pFA6a rev (P4)	GCAAAAGGGTGACTTAAAATCCTCGACATTATCGTTGGTTCCGAA GCTCATAAAAGCATCATAG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Ckk2 P1 fw	CTATCAAAGAATTTAAAAAGACAAGTCTTAGGAGG

Ckk2(KA) P1fw	CTATCGCAGAATTTAAAAAGACAAGTCTTAGGAGG
Ckk2 rv P2	TTAATTAACCCGGGGATCCGTATCTCCCATATGGAAGAGAATGC
Ckk2 pFA6 tag fw3 (P3)	GCATTCTCTCCATATGGGAGATACGGATCCCCGGGTTAATTA
Ckk2 RT fw	TTAGGTTATGGTGCGTGCAG
Ckk2 RT rv	CATGAGCCGGAACCTCTCTC
Cdc2 RT fw	CCACTGGGGTTGATATTTGG
Cdc2 RT rv	CGTTTCCAACGAGGAAATGT

2. Cepas

Las cepas empleadas en esta tesis se recogen en la tabla 3, y se obtuvieron mediante diferentes técnicas.

Tabla 5. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen
<i>wt</i>	<i>h- leu1-32 ura4-D18</i>	Stock de laboratorio
Δ <i>ckk2</i>	<i>h- ckk2::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	Bimbo et al 2005
Δ <i>ckk2</i>	<i>h+ ckk2::kan ura4+ leu 1-32</i>	Este trabajo
<i>Ckk2(KA):HA</i>	<i>Ckk2(KA)-HA:kan leu1-32 ura 4D-18</i>	Este trabajo
<i>Ckk2:HA</i>	<i>Ckk2-HA:kan leu1-32 ura 4D-18</i>	Este trabajo
Δ <i>ssp1</i>	<i>h- ssp1::ura4+ ura4-d18</i>	Matusaka et al. 1995
<i>Wt</i>	<i>h+</i>	JA972
Δ <i>ckk2</i>	<i>h+ ckk2::kan</i>	Este trabajo
<i>Ckk2:HA</i>	<i>ckk2-HA:kan</i>	Este trabajo
<i>Ckk2(KA):HA</i>	<i>ckk2(KA)-HA:kan</i>	Este trabajo
<i>Ckk2:HA</i>	<i>ckk2-HA:hph</i>	Este trabajo
Δ <i>pmt3 Ckk2:HA</i>	<i>pmt3::kan Ckk2-HA:hph</i>	Este trabajo
Δ <i>pmt3</i>	<i>pmt3::kan</i>	Este trabajo
Δ <i>gsk3</i>	<i>gsk3::ura h-</i>	Este trabajo
Δ <i>gsk3\Delta</i> <i>ckk2</i>	<i>gsk3::ura ckk2::kan</i>	Este trabajo
Δ <i>hhp1</i>	<i>hhp1::ura h-</i>	Este trabajo
Δ <i>hhp1\Delta</i> <i>ckk2</i>	<i>hhp1:ura ckk2::kan</i>	Este trabajo
Δ <i>pka1</i>	<i>pka1::ura</i>	Este trabajo
Δ <i>pka1\Delta</i> <i>ckk2</i>	<i>pka1::ura ckk2::kan</i>	Este trabajo
<i>Cmk1:HA</i>	<i>h- cmk1-HA:kanMX6</i>	Este trabajo
Δ <i>prz1</i>	<i>h- prz1::kan</i>	Este trabajo
Δ <i>cmk1</i>	<i>h- cmk1::hph</i>	Este trabajo
Δ <i>ssp2</i>	<i>h- ssp2::kan</i>	Este trabajo
Δ <i>ppk9</i>	<i>h- ppk9::kan</i>	Este trabajo
Δ <i>spk1</i>	<i>h- spk1::kan</i>	Este trabajo
Δ <i>pmk1</i>	<i>h- pmk1::kan</i>	Este trabajo

<i>Δtea4</i>	<i>h+ tea4::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δcta3</i>	<i>h+ cta3::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δrga6</i>	<i>h+ rga6::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δgyp5</i>	<i>h+ gyp5::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δoca2</i>	<i>h+oca2::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δkin1</i>	<i>h+ kin1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δpzh1</i>	<i>h+ pzh1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δrgf2</i>	<i>h+ rgf2::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δpar1</i>	<i>h+ par1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δmyo2</i>	<i>h+ myo2::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δpli1</i>	<i>h+ pli1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δfab1</i>	<i>h+ fab1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δtip1</i>	<i>h+ tip1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δgef2</i>	<i>h+gef2::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δklp6</i>	<i>h+ klp6::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δrga2</i>	<i>h+ rga2::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δsck2</i>	<i>h+ sck2::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δasp1</i>	<i>h+asp1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δmod5</i>	<i>h+ mod5::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δmid2</i>	<i>h+ mid2::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δsec72</i>	<i>h+ sec72::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δcgs1</i>	<i>h+ cgs1::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer
<i>Δmok12</i>	<i>h+ mok12::kan ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	Colección Bioneer

2.1 Integración de modificaciones a un gen mediante productos de PCR

La integración de modificaciones en el genoma de pombe, tales como añadir un epítipo o deletar un gen, está basada en el método de Bahler (Bahler et al., 1998). Este método aprovecha la elevada tasa de recombinación de *S. pombe* a través de la transformación de un fragmento de PCR con secuencias homologas a la región de interés y que contenga un marcador de selección (gen *ura 4⁺*, gen de resistencia a antibióticos, etc.). Los oligonucleótidos que se utilizan deben tener un tamaño de aproximadamente 100 nucleótidos de tal manera que facilite la recombinación homóloga con la región de interés. La reacción de PCR se realiza usando como ADN molde los plásmidos de Bahler, según se quiera deletar un gen o añadir un epítipo. Para añadir el epítipo HA a la proteína Ckk2; así como para crear el mutante Ckk2(KA) utilizamos una modificación de la técnica de la PCR fusión (Szewczyk et al. 2007). En esta técnica se trabaja con dos fragmentos de PCR solapantes entre sí amplificados individualmente y luego a través de una *nested PCR* se unen estos fragmentos para formar un producto de PCR fusionado (Figura 18). Se realizan varias reacciones de PCR para conseguir la mayor cantidad de ADN (1-10 µg) y así aumentar la eficiencia de la transformación. La transformación de las células se realiza ya sea con el método de acetato de litio o por electroporación. Luego de la transformación las células se plaquean en medio rico y transcurridas 24 horas se procede a la selección en medio con resistencia; durante este tiempo algunas células habrán incorporado el fragmento y podrán crecer en estas condiciones. Después de 3-4 días aproximadamente crecen colonias que se aíslan en medio rico y luego de dos replicas en dicho medio se procede nuevamente a la selección para asegurarnos que el fragmento ha sido incorporado y es estable. Por último se procede a la comprobación de la cepa mediante PCR.

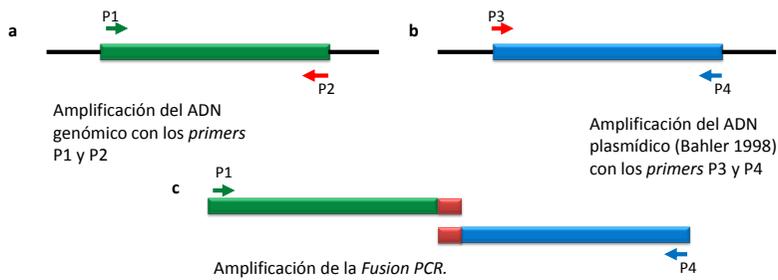


FIGURA 18. Esquema de la *Fusion PCR*. (a) Amplificación del fragmento de gen deseado con los oligonucleótidos P1 y P2. (b) Amplificación del epítipo y resistencia a antibiótico, usando los mismos oligonucleótidos y plásmidos del método de Bahler, que en este caso se denominan P3 y P4. (c) PCR fusión, ambos fragmentos se añaden en una reacción con los oligonucleótidos de los extremos (P1 y P4) (Szewczyk et al. 2007)

2.2 Cruce de cepas

Esta técnica permite aprovechar la capacidad de apareamiento de los dos sexos (h+ y h-) de *S. pombe* para crear dobles mutantes o modificar auxotrofías de la cepa original. Para realizar cruces en masa es necesario que las dos cepas tengan un tipo de apareamiento diferente (h+ o h-) y que cada una de las mutaciones lleve, preferiblemente, un marcador diferente (ura4⁺, resistencia a kanamicina, termo sensibilidad).

Cuando las células de *S. pombe* detectan un déficit nutricional en el medio comienzan un programa de diferenciación que culminará con la formación de las esporas. Este proceso permite que o bien por recombinación homóloga o por la orientación aleatoria de los cromosomas en la placa metafásica se obtenga el doble mutante deseado. El procedimiento que se utiliza es el siguiente: se mezcla una cantidad similar de los dos cultivos en una placa de SSA, se incuba a 25°C durante 2 días y se observa la presencia de ascas con cuatro ascosporas. Se digieren las ascas con la adición de 5 µl de glusulasa (NEE154001EA, Perkin Elmer) a 1 ml de agua estéril donde previamente se han resuspendido las células y se incuba un mínimo de 12 horas a 25°C. Se siembran las esporas en placas de medio rico YES para facilitar su crecimiento y posteriormente se hacen réplicas de

las colonias obtenidas en placas de medio selectivo para obtener los mutantes dobles.

3. Medios y Condiciones de cultivo

3.1 Medio y Condiciones de Cultivo de *Schizosaccharomyces pombe*

Los medios y condiciones de cultivo realizados en este trabajo son los previamente descrito por *Moreno et al., 1991*. Las células fueron cultivadas a 30°C en medio rico tanto en líquido como en sólido; los experimentos en este medio se realizaron en fase exponencial cuando los cultivos se encontraban a una densidad óptica de 0.5-0.8 (595 nm). Para realizar las condiciones de privación de nutrientes, las células fueron cultivadas en medio mínimo (EMM) a una temperatura de 25°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3. Las células fueron lavadas dos veces con el medio de privación y después se resuspenden en el medio de privación e incubada a 25°C. La composición de los medios de cultivo se detalla a continuación:

48

- **YES:** medio rico de crecimiento en condiciones óptimas suplementado con aminoácidos.
0,5 % extracto de levadura, 3 % glucosa, 225 mg/l aminoácidos (leucina, histidina, adenina, lisina y uracilo).

- **EMM-N:** medio mínimo que permite privar las células por deficiencia de nitrógeno.
3 g/l hidrógeno-ftalato de potasio, 2,2 g/l Na₂HPO₄, 2 % glucosa, 20 ml/l sales (solución madre: 52,5 g/l MgCl₂·6H₂O, 0,735 g/l CaCl₂·H₂O, 50 g/l KCl, 2 g/l Na₂SO₄) 1 ml/l vitaminas (solución madre: 1 g/l ácido pantoténico, 10 g/l ácido nicotínico, 10 g/l inositol, 10 mg/l biotina) 0,1 ml/l minerales (solución madre 5 g/l ácido bórico, 4 g/l MnSO₄, 4 g/l ZnSO₄·7H₂O, 2 g/l FeCl₂·6H₂O, 0,4 g/l ácido molíbdico, 1 g/l KI, 0,4 g/l CuSO₄·5H₂O, 10 g/l ácido cítrico).

- **EMM-low glucose:** medio mínimo que permite deprivar las células por deficiencia de glucosa.
3g/l hidrógeno-ftalato de potasio 2,2 g/l Na_2HPO_4 5 g/l NH_4Cl , 2% glicerol, 0.1 % glucosa, 20 ml/l sales (solución madre: 52,5 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,735 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 g/l KCl , 2 g/l Na_2SO_4) 1ml/l vitaminas (solución madre: 1 g/l ácido pantoténico, 10 g/l ácido nicotínico, 10 g/l inositol, 10 mg/l biotina) 0,1 ml/l minerales (solución madre 5 g/l ácido bórico, 4 g/l MnSO_4 , 4 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g/l ácido molíbdico, 1 g/l KI , 0,4 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l ácido cítrico).

- **SSA:** Medio de esporulación
Dextrosa 10 g/l Ácido aspártico 0,5 g/l KH_2PO_4 2 g/l Na_2HPO_4 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l Vitaminas 1 ml/l Minerales 0,1 ml/l 1N NaOH 4,2 ml/l (225 mg/l Aminoácidos, según auxotrofías)

En el caso de las placas, se añade 20 g/l de agar a cualquier medio líquido antes de autoclavar.

Las placas que incorporan drogas u otro tipo de agentes, se añadieron a las concentraciones indicadas después de autoclavar el medio.

3.2 Medio y Condiciones de cultivo para *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se manipularon bajo condiciones descritas previamente (Sambrook et al, 1998). Se cultivaron a 37°C en medio LB (Luria-Bertani; 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl). A este medio se le añaden antibióticos en función de los marcadores de la cepa o las resistencias aportadas por el plásmido con el que han sido transformadas (normalmente 50 mg/l ampicilina para la cepa DH5 α o 50 mg/l ampicilina y 20 mg/l cloranfenicol en el caso de la cepa BL21).

4. Transformación de cepas

La transformación es el proceso que permite la introducción de DNA en bacterias y levaduras.

4.1 Transformación de *Schizosaccharomyces pombe*

La transformación en *S. pombe* permite la introducción de ADN de forma episomal y la integración en el genoma de epítomos, promotores inducibles o la delección de genes. En este trabajo se han seguido dos protocolos distintos el primero es el método de acetato de litio (Norbury and Moreno, 1997) y el segundo la electroporación.

4.1.1 Método de acetato de litio

Se utiliza un cultivo exponencial de 50 ml se centrifuga a 3000 RPM. Se hace un primer lavado con agua, otro lavado con agua y tercero con 1 ml de solución de acetato de litio (LiAc-TE: 0,1 M LiAc, 10 mM Tris-HCl pH=7,5 y 1 mM EDTA). Resuspender el pellet en 500 μ l de la misma solución; hacer alícuotas de 100 y se añade 2 μ l de ssDNA (10 mg/ml de DNA de esperma de salmón) y de 100- 2 000 η g de ADN. Incubar durante 10 minutos y se añade 260 μ l de PEG-LiAc-TE (40 % PEG en LiAc-TE). Incubar entre 30 y 60 minutos a 30°C. Se añaden 43 μ l de DMSO y se incuba 5 minutos a 42°C. Lavar las células con agua destilada y plaquar.

4.1.2 Electroporación

Este método consiste en provocar un aumento en la permeabilidad de la membrana mediante un campo eléctrico aplicado; así como una diferencia de voltaje favorable para la entrada de DNA al interior de la célula (Neumann et al., 1982). Se lava un cultivo de 50 ml en fase exponencial con agua y luego se realiza un lavado del pellet con 1 ml de Sorbitol 1M frío, centrifugar 2 minutos a 3 000 RPM; y resuspender en 1 ml de la misma solución de sorbitol; y mantener en frío. Hacer alícuotas de 150 μ l y se agrega el ADN; esta mezcla se transfiere a una cubeta de 0.2 cm (Eppendorf) y se aplica un pulso de 1.500 V con el Eppendorf Eporator®.

Plaquar directamente en el medio de selección si se trata de un plásmido o en medio rico si se trata de una integración.

4.2 Transformación de *Escherichia coli*

Las células denominadas competentes de *E. coli* previamente tratadas con CaCl_2 y MgCl_2 , se transforman aplicando un choque térmico (Kushner, 1978). Se incuba el ADN plasmídico con las células ya sea DH5 α o BL21 durante 30 minutos en hielo, luego se aplica el choque térmico a 42°C por 45 segundos seguido de una incubación en hielo durante dos minutos. Agregar 1 ml de LB e incubar para la recuperación de las células a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo centrifugar la transformación, eliminar el sobrenadante y plaquear las células en el medio de selección.

4.2.1 Producción de células competentes

Las células se incuban hasta una OD exponencial y se resuspende el pellet en 50 ml de 100mM MgCl_2 (a 4°C) y se deja en hielo 30 min. Se centrifugan las células y se resuspende el pellet en 10 ml de 100mM CaCl_2 (a 4°C). Se deja en hielo de 30 a 90 minutos, se centrifuga y por último se resuspende el pellet en 20 ml de 5 mM CaCl_2 - 15% glicerol 60% y se almacena a -80.

5. Ensayos de sensibilidad y tratamiento a estrés

Este ensayo permite ver el comportamiento de un mutante frente a diferentes condiciones o drogas. Las cepas de interés se cultivan en el medio adecuado hasta alcanzar un OD a 595nm de 0.3 y se realizaron 5 diluciones seriadas en una placa de 96 pocillos y se siembran en las placas con las diferentes condiciones. Se incuba a 30°C, por 2-3 días, según la cepa salvaje. Los agentes utilizados en este trabajo son los siguientes: cloruro de calcio (CaCl_2), Calcofluor, latrunculina B (LatB), tiabendazol (TBZ).

6. Determinación de número de células

El número de células fue determinado con el contador de células SCEPTERM, se realiza una dilución uno diez del cultivo y se procede a leer con el equipo siguiendo las instrucciones de manufactura.

7. Técnicas de Manipulación de proteína

7.1 Extracción de proteínas

S. pombe posee pared celular por lo que la lisis se lleva a cabo a través de una acción conjunta de la lisis química y mecánica. En el laboratorio rutinariamente se utilizan dos métodos de extracción de proteínas:

7.1.1 Extracción de proteínas con STOP Buffer

Las células se recogen utilizando la rampa de vacío (PALL Corporation) y se resuspenden en 1 ml de STOP Buffer, el sobrenadante se elimina por centrifugación y el pellet que contiene las células se puede conservar a -80°C hasta su procesado. Es recomendable evitar la centrifugación antes de tratar con el tampón ya que las fuerzas centrífugas pueden activar la vía de las SAPK (Soto et al., 2007). Para la ruptura, se añaden 500 μl de bolas de vidrio y 300 μl de tampón de lisis (50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 0,002 % NP-40, 50 mM NaF y cocktail de inhibidores (Complete Mini EDTA-free, Roche)) sobre el pellet y se someten a 4 pulsos de 30 segundos a 5.000 rpm en el agitador FAST-PREP TM (FP120 BIO101 Thermo Electron Corporation) a 4°C . Desde este momento, las muestras se mantienen en hielo para evitar la degradación de las proteínas. El lisado se recoge por centrifugación, agujereando la base del tubo en el que se ha llevado a cabo la lisis e introduciéndolo dentro de otro. Así se consigue separar el lisado de las bolas de vidrio. Por último se lleva a cabo una limpieza del lisado por centrifugación durante 2 minutos a 14.000 rpm y se recoge el sobrenadante. Con esto se consigue separar los restos celulares que no han sido eliminados con la primera centrifugación. El lisado se puede guardar a -80°C o cuantificar.

7.1.2 Extracción de proteínas con TCA (ácido tricloroacético)

La extracción de proteínas con TCA es un método que se usa en el caso de proteínas inestables y de baja presencia en el proteoma, ya que supone una elevada capacidad extractiva así como la inactivación de proteasas, fosfatasa y quinasas. Las células se recogen con la rampa de vacío y se resuspenden en 1 ml de TCA al 20 %. El pellet se lava en 1 ml de

Tris-base (Trizma sin ajustar el pH). El sobrenadante se elimina luego de la centrifugación y el pellet se puede almacenar al -80°C hasta su procesado. Resuspender el pellet en 100 μl de Tris-HCl 67mM pH 6.8 SDS 2% y se añaden 200 μl de bolas de vidrio; se realizan los 4 pulsos de agitación con la FAST-PREPTM. El lisado se recoge de la misma forma que en el apartado anterior y se puede conservar a -80°C o cuantificar inmediatamente para preparar las muestras.

7.2 Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se lleva a cabo principalmente a través de dos técnicas colorimétricas: el método de Bradford (Bradford, 1976) y el método de Lowry (Frolund et al., 1995). La sensibilidad y sencillez del método de Bradford hacen que normalmente sea el método de elección a la hora de cuantificar proteínas aunque presenta ciertas limitaciones: el SDS, detergente presente en muchos de los tampones de lisis, interfiere con el método de Bradford; en cuyo caso lo más indicado es realizar el método de Lowry. Ambos métodos se basan en el cambio de color de un reactivo al reaccionar con las proteínas del lisado. El color obtenido depende de la concentración de proteínas presente en el lisado. Por lo tanto, la cuantificación se lleva a cabo a través de la medida de la absorbancia a la longitud de onda del color producido por el reactivo al reaccionar con la proteína. La determinación de la concentración se realiza por comparación con una recta patrón de concentraciones crecientes conocidas de proteína, que generalmente es la albúmina sérica bovina (BSA)

7.2.1 Método de Bradford

Este método se basa en el cambio de coloración que sufre el reactivo de Bradford (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Biorad*) al entrar en contacto con los enlaces peptídicos de las proteínas. Estos cambios se pueden valorar mediante la medida de la absorbancia a 595 nm. La concentración se calcula en base a los valores obtenidos con una muestra patrón de concentración conocida, elaborada con BSA.

7.2.3 Método de Lowry

Este método se basa en la asociación de dos reacciones complementarias: La Reacción de Biuret: característica de grupos

aminopeptídicos, con los que el Cu (II) en medio alcalino forma enlaces de coordinación, originando complejos de color violeta. Y el Reactivo de Folin-Ciocalteu: característica de grupos-OH reductores que, junto con los complejos cuproproteicos de la reacción de Biuret, reducen el reactivo de Folin, el cual vira a color azul oscuro. El espectro de absorción del reactivo de Folin reducido es proporcional a la de proteínas que existe en la muestra. Estos cambios de coloración se pueden valorar mediante la medida de la absorbancia a 750 nm. La reacción se realiza según las especificaciones del fabricante (DC™ Protein Assay, Bio Rad) La concentración se calcula en base a los valores obtenidos con una muestra patrón de concentración conocida, elaborada con BSA.

7.3 Electroforesis de Proteínas en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis de proteínas mediante geles de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes permite la separación de las proteínas presentes en una muestra en función de su peso molecular (Laemmli 1970). Las muestras que se quieren analizar son tratadas previamente con un detergente aniónico, el SDS, este tratamiento confiere carga negativa a las proteínas, anulando su carga intrínseca. Por tanto si son sometidas a campo eléctrico promueve la migración de las proteínas a través de la matriz porosa de poliacrilamida hacia el polo positivo del campo (ánodo). Dado que el tratamiento con el detergente anula la propia carga de la proteína, la velocidad de migración dependerá únicamente del tamaño de ésta, siendo inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular.

La matriz de poliacrilamida está formada por una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida, y la concentración de estos polímeros en el gel determinará el tamaño del poro resultante. Esto influirá en la idoneidad de un tipo de gel u otro para la correcta separación de la muestra. Así, si se quieren separar proteínas de peso molecular grande, se emplearán geles de baja concentración de acrilamida/bis-acrilamida, es decir, geles con poros mayores. En cambio, si se quieren separar proteínas de bajo peso molecular, será más adecuado utilizar geles con poro pequeño o de alta concentración de acrilamida/bis-acrilamida. El APS (persulfato amónico) actúa como iniciador de la reacción y el TEMED como agente catalizador de la polimerización de la acrilamida.

Los geles para la electroforesis de proteínas constan de dos fases:

- Gel empaquetador: corresponde a la parte superior del gel y dado que tiene una baja concentración de acrilamida (3,6%) permite que la muestra se empaquete en el límite con la siguiente fase del gel. Está compuesto por:

3 ml	0,5M Tris-HCl pH=6,8
2 ml	Mix Acrilamida*
6,8 ml	dH ₂ O
60 µl	SDS 20 %
90 µl	APS 10 %
9 µl	TEMED

*Mix acrilamida: 500 ml Acrylagel Nathional Diagnostics, 1,51 g Ultra-Pure Bisacrylamide Sigma, 5,05 ml dH₂O

- Gel resolutivo: situado en la parte inferior del gel, permite la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular; debido a que contiene un mayor porcentaje de acrilamida (que puede variar de 8-15%).

55

4,5 ml	2M Tris-HCl pH=8,8
8 ml	Mix Acrilamida
11, 2 ml	dH ₂ O
120 µl	SDS 20 %
240 µl	APS 10 %
24 µl	TEMED

Las cantidades indicadas en esta receta son suficientes para un gel de dimensiones 14 x 15 cm y 1,5 mm de grosor.

Las muestras se preparan calculando la cantidad de proteína que se quiere cargar y añadiendo el mismo volumen de tampón de muestra 2x (10 ml de 0,5 M Tris-Cl pH 6,8, 5 ml de 20 % SDS, 17 ml de 60 % glicerol, dH₂O hasta 50 ml y una pizca de azul de bromofenol al que se le añade 1/10 de β-Mercaptoetanol en el momento de ser utilizado). Una vez preparadas, las muestras se hierven durante 5 min y se cargan en el gel. Para poder aplicar la corriente eléctrica, el electrodo y los geles deberán estar sumergidos en una cubeta que contenga tampón electrolito (25 mM Tris-HCl, 192 mM

glicina, 0,1 % SDS pH 8,3). La corriente aplicada será la correspondiente a un amperaje constante de 35 mA por gel.

7.4 Electrotransferencia e inmunodetección: *western blotting*

Esta técnica permite la detección de una proteína concreta presente en una muestra mediante el uso de anticuerpos que reaccionan específicamente contra un epítipo presente en la proteína. La muestra debe haber sido previamente separada mediante un gel de poliacrilamida entonces la electrotransferencia, es la transferencia de las proteínas presentes en el gel hacia una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico. Las proteínas de la muestra, al tener carga negativa, migrarán hacia el polo positivo del electrodo donde se encontrarán con la membrana y quedarán retenidas. Una vez montado el sistema, se aplicará un campo eléctrico de 70 V durante 1:30 horas o de 20 V durante toda la noche, en ambos casos a 4°C para evitar el calentamiento de la muestra. Todo el sistema se encontrará sumergido en un tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 0,02 % SDS, 20 % etanol) que permita la transmisión del campo eléctrico.

56

La inmuno-detección se trata de una técnica de detección indirecta, dado que el anticuerpo que da la señal no se une a la proteína directamente, sino que lo hace a través de un anticuerpo primario, que en este caso sí que reacciona con la proteína. Así se diferencian dos tipos de anticuerpo:

- Anticuerpo primario: este anticuerpo reconoce específicamente uno (anticuerpos monoclonales) o más epítopos (anticuerpos policlonales) contenidos en la proteína.
- Anticuerpo secundario: este anticuerpo reconoce la región constante presente en el anticuerpo primario y que es igual para todos los anticuerpos generados en una misma especie animal. Los anticuerpos secundarios llevan conjugada una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que al reaccionar con su sustrato dan lugar a una señal detectable, proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. La finalidad de utilizar un anticuerpo secundario es que permite amplificar la señal, que sería muy baja si solo se empleara un solo anticuerpo.

El protocolo de *western blot* es el siguiente:

- Bloquear la membrana mediante la incubación con una solución de bloqueo: 5 % de leche en polvo o BSA disuelto en TBST (TBS 0,05 % Tween20; TBS: 20 mM Tris-HCl pH=7,5 150 mM NaCl) para evitar que los anticuerpos se unan de forma inespecífica a la membrana. Esta incubación se realiza durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación suave.
- Incubar la membrana en la solución del anticuerpo primario (2,5 % leche en TBST o 2,5 % BSA en TBST) durante 2 h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche en 4°C. La dilución del anticuerpo será diferente dependiendo de cada anticuerpo y según las instrucciones de la casa comercial.
- 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con TBST.
- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario disuelto en la solución de anticuerpo. En este trabajo todos los anticuerpos secundarios empleados estaban conjugados a la enzima peroxidasa (HRP).
- 2 lavados de 10 minutos con TBST y un último lavado de 10 min con TBS.
- Para detectar la señal del anticuerpo, tratar la membrana con el sustrato proporcionado por el sistema de detección EZ-ECL (Chemiluminescence Detection Kit for HRP, de Biological Industries) y captar la quimioluminiscencia en una película fotográfica (Fuji Medical X-Ray filme, de Fujifilm).

Anticuerpo	Dilución	Origen	Casa comercial
HA (12CA5)	1:1.000	Monoclonal	Roche (12CA5)
HA	1:1.000	Policlonal	Santa Cruz (sc-7392)
pSTAIR	1:2.000	Policlonal	Upstate (06-923)
Anti-mouse	1:2/5.000	Cabra	Bio Rad (172-1011)
Anti-rabbit	1:2/5.000	Cabra	Bio Rad (170-6516)
GFP	1:5.000	Policlonal	Abcam (Ab-290)
GFP	1:1.000	Monoclonal	Abcam (Ab-1218)

7.5 Ensayo de actividad quinasa *in vitro*

Las quinasas catalizan la reacción de incorporación del fosfato-γ del ATP a los grupos hidroxilo de los aminoácidos Serina, Treonina o Tirosina. Esta reacción se puede monitorizar utilizando un ATP en el que el fósforo del grupo fosfato γ ha sido sustituido por el isótopo radiactivo ^{32}P ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$). De forma orientativa la reacción se realiza en presencia de 1 μg de quinasa, 1 μg de sustrato, 3 μl de Tampón quinasa 10x (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl_2 , 5 mM β-Mercaptoetanol) 250 μM de ATP frío, no marcado y 0,2 μl de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Perkin-Elmer, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml). Estas condiciones pueden variar, por ejemplo es posible modular la astringencia de la reacción cambiando la cantidad de ATP frío: a mayor cantidad de ATP frío, más específica es la reacción. Por el contrario, si la señal obtenida tras la reacción es muy débil esta puede aumentarse disminuyendo la cantidad de ATP frío de la reacción. Otro factor que hay que considerar es que el $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ tiene una vida media de 15 días lo que implica que cada 15 días que pasan tras su producción, debe aumentarse al doble la cantidad de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ incorporado en la reacción para obtener la misma señal. Al trabajar con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, se hace en una cámara habilitada específicamente para trabajar con isótopos radiactivos y siempre detrás de una pantalla de metacrilato.

La reacción se incuba durante 30 minutos a 30°C y se detiene al incorporar tampón de muestra. Las muestras se separan por electroforesis SDS-PAGE y el gel de poliacrilamida se tiñe con azul de *Coomassie* para garantizar que se ha utilizado la misma cantidad de enzima y sustrato en todos los casos analizados. Una vez desteñido el gel se seca y se expone a una placa amplificadora y se revela utilizando el escáner Typhoon (*Trio Variable Mode Imager*). El gel también puede exponerse a una película o film y las partículas β emitidas por la proteína radiactiva activa unos cristales de bromuro de plata presentes en la película que durante el proceso de revelado se reducen a plata para formar la imagen (Revisado en Johnson and Hunter, 2005).

7.5.1 Ensayo quinasa de fosfopéptidos

Los péptidos fueron resuspendidos según las indicaciones de la casa comercial. Una vez obtenidos los péptidos en solución se procedió a realizar

el ensayo quinasa. La reacción se realiza en presencia de 1 µg de quinasa, 1 µg de sustrato, 3 µl de Tampón quinasa 10x (200 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 2,5 mM de ATP frío, no marcado y 0,2 µl de [³²P]-ATP (Perkin-Elmer, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml). La reacción se incubó durante 30 minutos a 30°C. Los péptidos fosforilados se separan por cromatografía de capa fina, usando como fase sólida placas de MERCK (Proteochrom HPLTC silica gel 60F_{254S}/1.05650.0001) y como fase líquida una mezcla de N-butanol piridina: ácido acético: agua en una proporción 3:2:1:4. Las placas de silica gel se expusieron a una placa amplificadora y se reveló utilizando el escáner Typhoon.

7.6 Tinción de proteínas con Azul de Coomassie

El azul de *Coomassie* es un pigmento cargado negativamente que forma complejos con las proteínas para su estabilización y permite así la visualización de éstas en geles de poliacrilamida. El número de moléculas de pigmento unidas es proporcional a la cantidad de proteína presente en la banda. Sin embargo, el azul de Coomassie se une de forma más eficiente a los aminoácidos básicos que a los ácidos por lo que pueden existir pequeñas diferencias en la eficiencia de tinción de diferentes proteínas (Fazekas de St Groth et al., 1963; Meyer and Lambert, 1965).

Una vez realizada la electroforesis, el gel de poliacrilamida se tiñe con solución de Coomassie (2,5 mg azul de *Coomassie* G-250, 45 % metanol, 10 % ácido acético) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave y se destiñe durante toda la noche con solución desteñidora (50 % metanol, 10 % ácido acético) para eliminar el exceso.

7.7 Expresión y purificación de proteínas

7.7.1 Expresión y purificación de proteínas de fusión a GST

La expresión de proteínas de fusión a GST (glutación-S-transferasa) se realiza utilizando la cepa de *E. coli* BL21. El plásmido en el que se clona el gen codificante para la proteína de interés en cada caso es el plásmido pGEX-KG. Este permite fusionar el epítipo GST en el extremo N-terminal de la proteína y, de esta manera, una vez expresada, la proteína puede purificarse mediante bolas de glutatión-sefarosa a partir del extracto total.

El paso previo a la purificación es optimizar la concentración de IPTG, la temperatura y el tiempo de inducción. Una vez optimizados, se lleva a cabo la inducción. Para ello se cultiva un gran volumen hasta fase exponencial momento en el que se añade el IPTG. Pasado el tiempo de inducción, las células se recogen por centrifugación y el pellet puede conservarse a -80°C . Para la obtención del lisado, el pellet se resuspende en 10 ml de NETN (20 mM Tris-HCl pH=8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % NP-40) con inhibidores de proteasas (10 mg/ml aprotinina, 5 mg/ml leupeptina, 1 mM PMSF). Se sonica para disminuir la viscosidad causada por la liberación del DNA bacteriano y se recoge el sobrenadante por centrifugación.

Por último, la proteína de fusión se purifica incubando el lisado las bolas de glutatión-sefarosa. Lavar 1 ml de la resina de glutatión-sefarosa 4B (GE Healthcare) una vez con PBS frío y dos veces con NETN, para equilibrarla. Centrifugar y descartar el sobrenadante. Añadir el lisado de BL21 a la resina e incubar 2 h a 4°C en agitación. Centrifugar la mezcla y descartar el sobrenadante. Hacer dos lavados de la resina con NETN y lavar de nuevo con NET (20 mM Tris-HCl pH=8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Centrifugar y descartar el sobrenadante. Por último, eluir la proteína añadiendo a la resina 1 ml de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 10 mM Glutatión, 2 mM DTT) e incubando 30 min a 4°C en agitación. Centrifugar y recoger el sobrenadante, que será el eluido1. Repetir el proceso para obtener una segunda fracción de proteína purificada (eluido2). Conservar la proteína -80°C .

7.7.2 Expresión y purificación de Calmodulina

La Calmodulina es una proteína termo-resistente y se aprovecha esta cualidad para su purificación. Se clonó en el plásmido pET20 que incorpora el promotor *Plac* inducible por IPTG pero no incorpora el GST para la purificación. El lisado se obtiene de la misma forma que en el apartado anterior y la purificación se lleva a cabo por ciclos sucesivos de hervido-frío. La purificación se monitoriza por azul de *Coomassie*.

7.8 "Pull-down" de proteínas

Esta técnica se utiliza para comprobar la interacción de proteínas y se basa en la capacidad de éstas para unirse. Para ello ha sido necesario la obtención de la proteína recombinante (Ckk2:GST) y en el caso de calmodulina hemos usado las bolas comerciales de STRATAGENE. La unión

de las proteínas se realizó bajo las siguientes condiciones Tris 50 mM pH 7.4, KCl 150 mM, CaCl₂ 0,5 mM y la condiciones control (no unión) Tris 50 mM pH 7.4, KCl 150 mM, EGTA 5 mM. Se incubó dos horas y luego se realizan tres lavados con las mismas soluciones respectivamente. Finalmente se eluye con tampón de muestra, se carga en un gel de poliacrilamida y se hace la tinción de azul de *comassie* para observar los resultados.

8. Técnicas de manipulación de RNA

8.1 Extracción de RNA

El RNA total se extrae utilizando el kit comercial RNeasy plus mini kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante específicas para el trabajo con levaduras (Qiagen, Crawley, UK). Dado que el RNA es una molécula muy sensible a la degradación por parte de RNasas, es imprescindible la utilización de guantes y la utilización de material doblemente autoclavado. La concentración y calidad del RNA total extraído se lleva a cabo utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

8.2 Análisis de la expresión génica por Real-Time PCR

Como paso previo a la Real Time se realiza una retro-transcripción. La técnica de RT-PCR consta de una reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA a partir de mRNA, seguida de una amplificación específica. 1 µg de mRNA se retro-transcribe en presencia de 2 µl de *random primers* 10X, 0,8 µl de dNTPs 25X, 1 µl de retro-transcriptasa 50 U/µl, 2 µl de tampón 10X en un volumen final de 20 µl tal y como indica el fabricante (Applied Biosystems) La mezcla se incubó en un termociclador a 25°C durante 10 minutos y seguidamente a 37°C durante 2 horas. La cuantificación del cDNA se llevó a cabo por duplicado en un termociclador Mx3000p qPCR (Stratagene) usando Express SYBR® GreenERTM qPCR Supermix Universal (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo a 95°C for 10 minutos seguido de 40 ciclos del siguiente programa: 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por Real-Time PCR se indican en el apartado 1.7 de materiales y métodos. El gen *cdc2* que codifica para la quinasa dependiente de ciclina

Cdc2 se utilizó para la normalización. Los datos que se muestran son representativos de mínimo 3 experimentos.

9. Microscopía

9.1 Microscopía de epifluorescencia

Para observar las células, se realizó la tinción de calcofluor según el protocolo descrito para la levadura de fisión (Alfa et al. 1993) se lavaron con PBS y se tiñeron con calcofluor. Para visualizar las células se utilizó el microscopio de epifluorescencia: Leica DMI 6000B.

9.2 Análisis de imágenes

Las imágenes se procesaron con los programas Image J, MultiGauge y Adobe Photoshop. Para el análisis de los datos se utilizó Microsoft Excel.

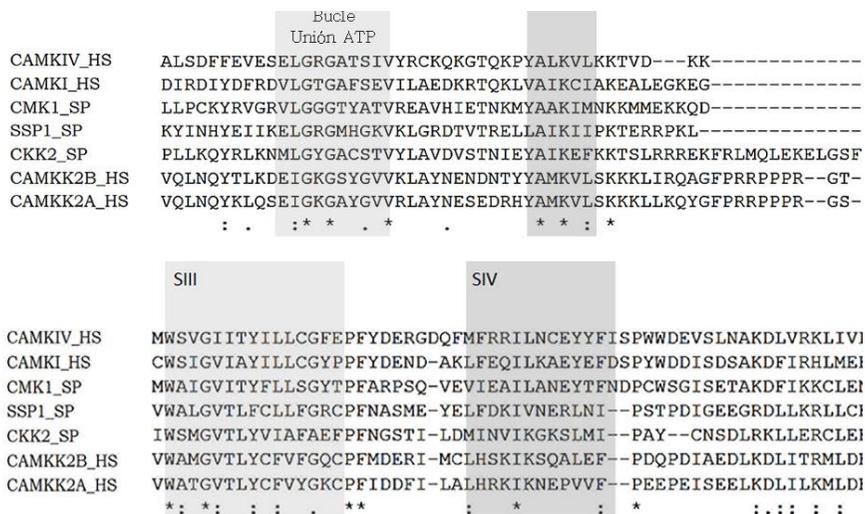
RESULTADOS

1. Análisis de la secuencia y la actividad de Ckk2

1.1 Análisis de la secuencia

A través de un alineamiento de secuencias de algunas quinasas pertenecientes a estas familias, tanto de humanos como de *S. pombe*, corroboramos que Ckk2 presenta homología de secuencia con esta familia de quinasas y que presenta los dominios ya descritos para las quinasas (Hanks et al. 1988), así como los aminoácidos conservados para esta familia de quinasas (Figura 19). El subdominio VI contiene el dominio catalítico general de las quinasas (HRDLKPXXN) y observamos que el dominio específico consenso para las CAM quinasas es [I/V][I/V]IHRD[I/L]KPXN[I/L]L.

Figura 19. Alineamiento de las secuencias de quinasas pertenecientes a la familia de las CAM quinasas; CAMKIV, CAMKI, CAMKK1, CAMKK2 humanas, y CMK1, SSP1, CKK2 de *S. pombe*. En gris se encuentran destacados los subdominios descritos para las quinasas con los residuos conservados. Enmarcado en rojo se encuentra el bucle de activación de las CAM quinasas.



	SV		SVI	Bucle catalítico
CAMKIV_HS	ELVTGGELFDRI	---	VEKGYSERDAADAVKQILEAVAYLHENGIVHRDLKPENLLYATP	
CAMKI_HS	QLVSGGELFDRI	---	VEKGFYTERDASRLIFQVLDAVKYLHDLGIVHRDLKPENLLYSL	
CMK1_SP	ELATGGELFDRI	---	CAKGSFYEADAALMRTTTSAVKYLHDNGIVHRDLKPENLLYRSK	
SSP1_SP	EYMSGGEVPTD	---	CDSPVLSISEARQYFRDVLGLEYLHYQGIHRDIKPANLLLN	
CKK2_SP	NYCPGGKLASVDHGISFDP	---	MLETCKRSFRQLVLAVNYIHGKGVHRDIKPDNLFK	
CAMKK2B_HS	ELVNQGPVMEVP	---	TLKP-LSEDQARFYFDLIKIEYLHYQKIHRDIKPSNLLVG	
CAMKK2A_HS	DLLRKGVPVMEVP	---	CDKP-FSEEQARLYLRDVLGLEYLHCQKIVHRDIKPSNLLG	
	:	*	:	.*.* :.*.*.*.*

	VII	Bucle unión Mg ²⁺	Bucle de activación	VIII	Bucle P+1	IX
CAMKIV_HS	APDAPLKIADFGLS	KIVEHQ	-----VLMKTVCG	TPGYCAPEILRGC	-----AYGPEVD	
CAMKI_HS	DEDSKIMISDFGLS	KMEDPG	-----SVLSTACG	TPGYVAPEVLAQK	-----PYSKAVD	
CMK1_SP	DPNSDLLIADFGLS	HFYEDS	-----QYMLMTACG	TPEYMAPEVFRRT	-----GYGKPYD	
SSP1_SP	-SSNCVKISDFGVS	YIANAGLNEDNDVELAKTV	GT	PAFFAPELCWTDLDRPRPKISEAID		
CKK2_SP	-ENNNLCVIDFGLAE	-----FLPKDGFVKPAS	GT	PAFMAPELFDNELKK	---	IKGKPLD
CAMKK2B_HS	-EDGHIKIADFGVSN	-----FKGSDALLSNTV	GT	PAFMAPELSETRKI	---	FSGKALD
CAMKK2A_HS	-DDGHVKIADFGVSNQ	-----FEGNDAQLSSTA	GT	PAFMAPEAISDSGQS	---	FSGKALD
	.	:	:	***:	***	.

	IX	X		XI
CAMKIV_HS	MWSVGIITYILLCGFEPFYDERGDQFMFRRI	LNCEYYFIS	PPWDEVSLNAKDLVRKLV	L
CAMKI_HS	CWSIGVIAYILLCGYPPFYDEND	AKLFEQILKAIEYFDS	SPYWDSDISAKDFIRHLM	EK
CMK1_SP	MWAIGVITYFLLSGYTPFARPSQ	VEVIEAILANEYTFNDPCW	SGISSETAKDFIKKCL	EN
SSP1_SP	VVALGVTFLCFLGRCPFNASME	YELFDKIVNERLNI	---	PSTPDIGEEGRDLKRL
CKK2_SP	IWSMGVTLYVIAFAEFPFNGSTI	LDMINVIKGS	LMIPAY	---
CAMKK2B_HS	VWAMGVTLYCFVFGQCPFMDERI	MCLHSKI	KSQALEF	---
CAMKK2A_HS	VWATGVTLYCFVYGKCPFIDDFI	LALHRKIKNEPVVF	---	PEEPEISEELKDILKMLDK
	*:	*	:	:

1.2 Análisis de la actividad de Cck2 frente a Ca²⁺ y CaM

1.1.1 Unión de Cck2 y CaM

La quinasa Cck2 presenta homología de secuencia con la familia de las CaM quinasas por ello quisimos comprobar si es una proteína de unión a calmodulina. Para determinar si existe interacción entre las proteínas realizamos un ensayo de *pull down*; tanto en presencia de Ca²⁺ y el agente quelante de Ca²⁺, EGTA. Como se puede observar en la Figura 20 la proteína Cck2 se une a calmodulina en presencia de Ca²⁺, y dicha interacción se ve interrumpida por EGTA. Es decir la unión Cck2-CaM es dependiente de Ca²⁺; confirmando que la Cck2 es una CaM quinasa no solo por la homología de secuencia sino también por su interacción con el complejo Ca²⁺/CaM.

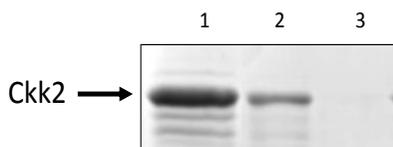


FIGURA 20. Cck2 es una proteína de unión a CaM dependiente de Ca^{2+} . La proteína recombinante Cck2 (carril 1) se incubó con la proteína CaM en presencia de Ca^{2+} (carril 2) y como condición control se incubó con el agente quelante de calcio EGTA (carril 3).

1.1.2 Actividad de Cck2 dependiente de Ca^{2+} /CaM sobre Cmk1

Nos planteamos analizar la actividad de Cck2 mediante un ensayo quinasa *in vitro* utilizando como sustrato la quinasa Cmk1. El resultado de este ensayo tendrá dos finalidades, por una parte determinar si la actividad de Cck2 depende de Ca^{2+} y CaM; y por otra parte si Cmk1 es un sustrato directo de Cck2. Tal como se ha descrito en antecedentes, la fosforilación y regulación de Cmk1 en respuesta a Ca^{2+} dependen de la quinasa Cck2 *in vivo*, por tanto era necesario examinar si dicha fosforilación era directa. Para realizar el ensayo quinasa *in vitro* utilizamos las proteínas recombinantes Cck2 y el sustrato Cmk1-K60A (Cmk1KA), que presenta la mutación en la K60 que tiene como resultado una quinasa catalíticamente inactiva (Rasmussen 2000) pues Cmk1 es capaz de auto-fosforilarse *in vitro*. También utilizamos como sustrato la Cmk1-K60A-T192A (Cmk1KATA) la cual además de ser catalíticamente inactiva presenta la T192 mutada a alanina. La T192 es la homóloga a la T177 de la CAMKI humana que es fosforilada por la CAMKK. Como observamos en la Figura 21, Cck2 es capaz de fosforilar a Cmk1 *in vitro* y dicha fosforilación se ve fuertemente disminuida en el mutante no-fosforilable Cmk1KATA, sugiriendo que así como la CAMKK fosforila a CAMKI en la T177, la quinasa Cck2 fosforila a Cmk1 en la T192. También pudimos determinar que la actividad de Cck2 depende de Ca^{2+} y CaM; pues en presencia de EGTA desaparece la fosforilación de Cmk1KA (Figura 21).

Como parte de la caracterización de la actividad quinasa realizamos ensayos con la quinasa recombinante Cck2 y el sustrato general de quinasas MBP (*myelin basic protein*). Observamos que Cck2 se auto-fosforila *in vitro* y que esta auto-fosforilación es más intensa en ausencia de Ca^{2+} y CaM, pues añadirle dichos compuestos la banda desaparece, de la misma manera que en presencia de EGTA. Además observamos que la fosforilación del sustrato MBP es muy tenue ya sea con o sin Ca^{2+} y CaM, indicando la especificidad de nuestra quinasa Cck2 sobre el sustrato Cmk1 (Figura 22).

Ckk2	+	+	+	+	+	+
CaM	+	+	+	+	+	+
Cmk1 KA	-	+	-	-	+	-
Cmk1 KATA	-	-	+	-	-	+
Ca ²⁺	+	+	+	-	-	-
EGTA	-	-	-	+	+	+

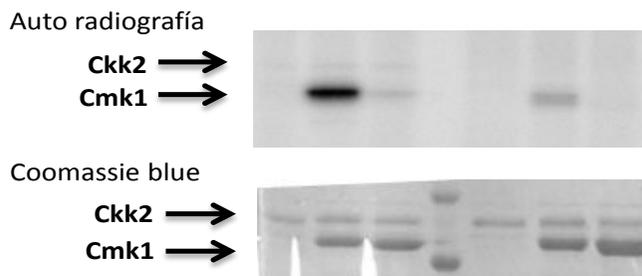


FIGURA 21. Ckk2 Fosforila a Cmk1 *in vitro*. La quinasa Ckk2 y los sustratos catalíticamente inactivo Cmk1KA y el no fosforilable Cmk1KATA fueron expresados en *E. coli* y se incubaron en presencia de CaM y Ca²⁺, o EGTA como control de la reacción.

68

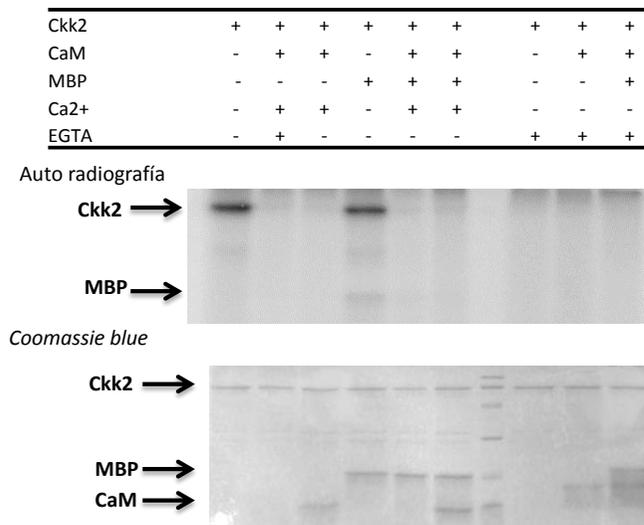


FIGURA 22. Ckk2 no fosforila al sustrato MBP. La quinasa Ckk2 y el sustrato universal MBP se incubaron en presencia de CaM y Ca²⁺, o EGTA como control de la reacción.

2. Respuesta del mutante $\Delta cck2$ frente a diferentes tipos de estrés y condiciones celulares

Con el fin de caracterizar en mayor profundidad la quinasa Ckk2 y averiguar si presenta otras funciones además de la descrita en repuesta a calcio (Cisneros-Barroso et al. 2014), analizamos la respuesta del mutante $\Delta cck2$ frente a distintos tipos de estrés y condiciones celulares.

2.1 Respuesta del mutante $\Delta cck2$ frente a agentes y drogas que afectan las funciones celulares

Las alteraciones en el crecimiento observadas en respuesta a una condición particular implican que la proteína deletionada está potencialmente involucrada en la mediación de las señales que tienen lugar en la respuesta celular frente al factor de estrés en cuestión. Por lo tanto, se evaluó el crecimiento del mutante $\Delta cck2$ en presencia de diferentes tipos de estrés que comprometen la mayoría de las funciones celulares. Para ello, el medio YES fue suplementado con agentes que causan estrés salino (KCl, NaCl), agentes osmóticos (sorbitol), agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno), agentes que inhiben la replicación del DNA (hidroxiurea: HU), agentes que causan daño al DNA (camptotecina: CPT), agentes despolimerizadores de microtúbulos (tiabendazol, TBZ), inhibidores de la polimerización de actina (latrunculina B, LatB), agentes que dañan la pared y membranas (calcofluor, SDS).

69

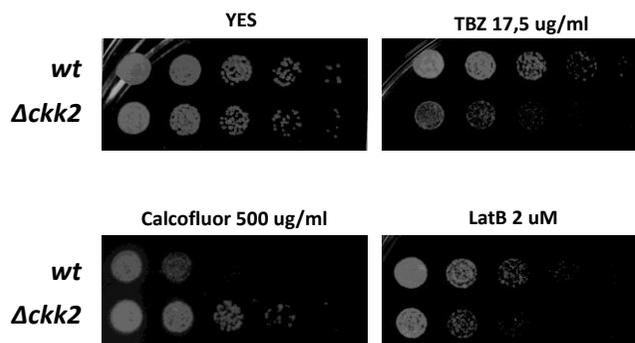


FIGURA 23. Ensayo de viabilidad en placa de la delección de *cck2*. Se hicieron diluciones seriadas de los cultivos exponenciales de las cepas *wt* y $\Delta cck2$, se sembraron en placas de YES con diferentes tratamientos. Se dejaron crecer de 48 - 72 h.

Encontramos que la delección de *ckk2* comprometía ligeramente la viabilidad en presencia del agente depolimerizador de microtúbulos TBZ. También se observó que el mutante $\Delta ckk2$ era sensible Latrunculina, y por el contrario resistente a altas concentraciones de calcofluor (Figura 23).

2.2 Ckk2 y la respuesta a privación por nutrientes

2.2.1 Respuesta del mutante $\Delta ckk2$ frente a privación de glucosa (EMM-G)

Trabajos anteriores han determinado la importancia de la CAMKK Ssp1 en *S. pombe* (Hanyu et al. 2009), en condiciones de privación de glucosa. El mutante deleciónado del gen de *ssp1* detiene su crecimiento a concentraciones de 0.1% de glucosa en el medio. Para analizar si Ckk2, así como Ssp1, es susceptible al crecimiento en condiciones deficientes de glucosa decidimos hacer un ensayo a diferentes concentraciones de glucosa (0.02%, 0.1% y 2%) y observar la viabilidad de las células *wild type*, $\Delta ckk2$ y $\Delta ssp1$.

70

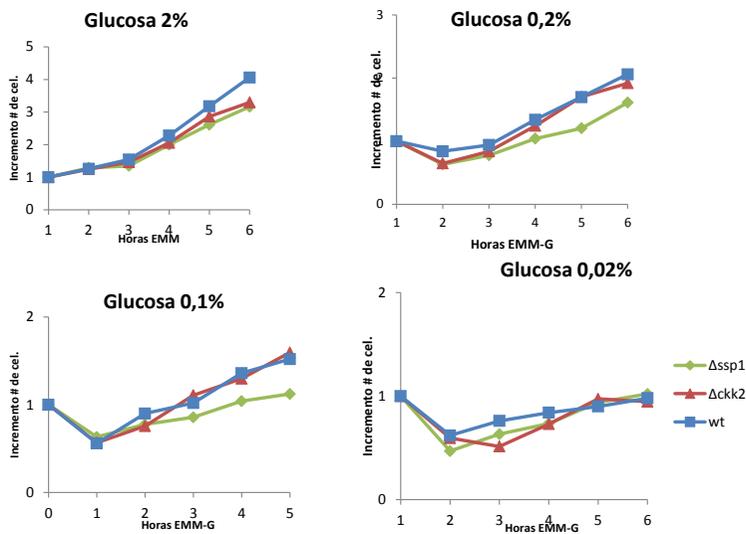


FIGURA 24. Ckk2 no es indispensable para el crecimiento celular en condiciones de privación por glucosa. Las cepas *wild type*, $\Delta ckk2$ y $\Delta ssp1$ fueron crecidas en medio EMM conteniendo 2%, 0.1% y 0.02% de glucosa a 26°C, y se midió el incremento en el número de células.

Como observamos en la Figura 24 el crecimiento de la cepa $\Delta cck2$ sigue la misma pauta que la cepa *wild type* en las distintas concentraciones de glucosa, a diferencia de $\Delta ssp1$ cuyo crecimiento se detiene a 0.1%, tal como ha sido descrito anteriormente (Hanyu et al. 2009). En la Figura 25 se puede observar con más detalle el crecimiento de las cepas *wild type* y $\Delta cck2$ en tiempos más prolongados, encontramos que ambas cepas tienen el mismo comportamiento; es decir que a pesar de la deficiencia en glucosa son capaces de crecer.

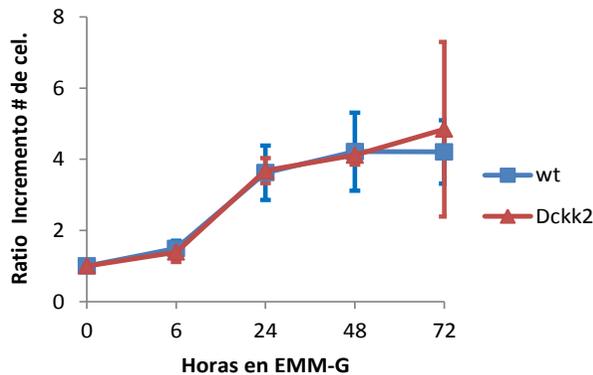


FIGURA 25. El crecimiento del mutante $\Delta cck2$ es semejante al de la cepa *wild type* en medio bajo en glucosa. Las cepas *wild type*, $\Delta cck2$ fueron crecidas en medio EMM conteniendo 0.1% de glucosa a 26°C, y se midió el incremento en el número de células.

Análisis del fenotipo del mutante $\Delta cck2$ en EMM-G

A pesar de que las células $\Delta cck2$ presentaran un crecimiento similar a las células normales, decidimos observar el fenotipo del mutante $\Delta cck2$ en privación por glucosa. Realizamos un seguimiento en el tiempo de cultivos en medio mínimo (EMM) a 0.1% de glucosa tanto de las cepas *wild type* y $\Delta cck2$ a 4, 8, 12 y 24 horas, medimos el número de células, el índice de septación y observamos las células con la tinción de calcofluor. En la Figura 26 se observa que el comportamiento de la cepa $\Delta cck2$, como ya habíamos visto en el experimento anterior, es muy semejante a la cepa *wild type* en cuanto al aumento en el número de células a lo largo del tiempo. Sin embargo observamos un aumento en el índice de septación entre las 4 y 12 horas en privación en la cepa $\Delta cck2$ que no existe en la cepa *wild type*. Después de 24 horas alcanza el mismo valor que las células *wild type*; podría indicarnos que el mutante $\Delta cck2$ tiene un defecto en la citocinesis que

ocasione un retraso en el proceso de división celular ocasionando un incremento en el índice de septación. También cabe destacar que los septos no presentan la misma morfología en las dos cepas.

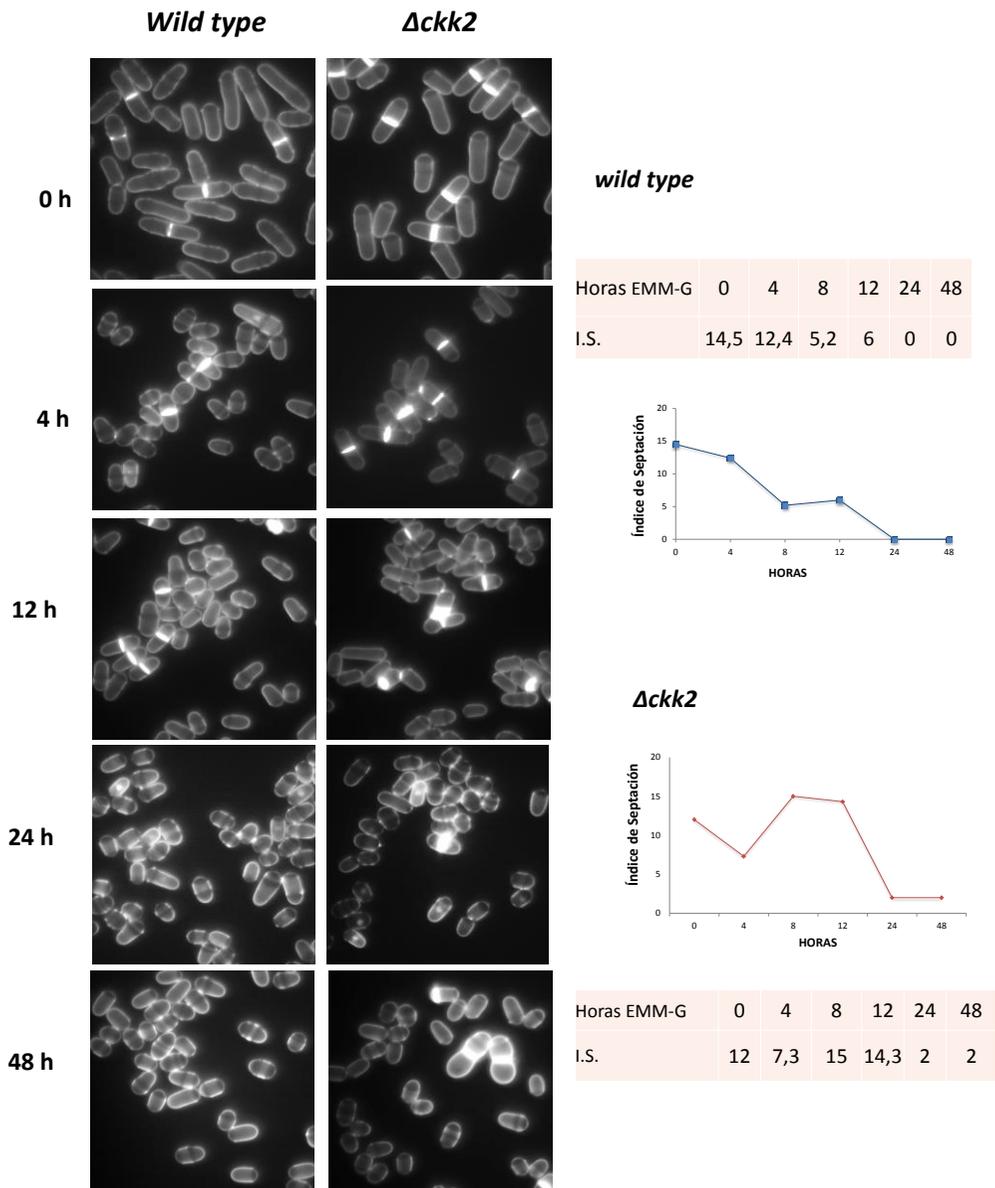


FIGURA 26. La células $\Delta cck2$ muestran un aumento en el índice de septación a diferencia de las células *wild type*. Cultivos exponenciales fueron colocados en medio EMM conteniendo 0.1% de glucosa a 26°C, y se midió el índice de septación.

Expresión de Ckk2 en condiciones de privación por glucosa

Decidimos analizar que sucede con la proteína en las condiciones de privación por glucosa. Para ello la cepa Ckk2-HA fue criada en medio mínimo EMM y luego transferida a un medio con bajos niveles de glucosa EMM-G (Glucosa 0,1%) y cogimos muestras a 4, 8, 12, 24 y 48 horas, y se realizó el *western blot*. Como se puede observar en la Figura 27 los niveles de Ckk2 aumentan en respuesta a privación por glucosa 4 horas después de hacer el cambio de medio. Este incremento se mantiene progresivamente hasta las 24 horas momento en el que se aprecia una banda de movilidad electroforética retardada (10 kDa aproximadamente) que aumenta hasta las 48 horas.

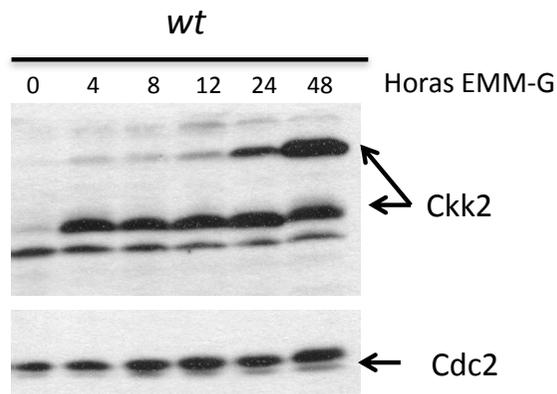


FIGURA 27. La expresión de Ckk2 está regulada positivamente en condiciones de privación por glucosa. El cultivo exponencial de la cepa *ckk2-HA* se creció en medio EMM-G y se cogieron muestras a los tiempos indicados. Se realizó el *western blot* anti HA para la proteína Ckk2 y anti-PSTAIR para el control de carga Cdc2.

2.2.2 Respuesta del mutante $\Delta cck2$ frente a privación de nitrógeno (EMM-N)

La función de las CAMKK en mamíferos está relacionada con la respuesta al AMPc, y la captación de glucosa. Quisimos saber si, así como Ssp1 era importante para el crecimiento en condiciones de privación por glucosa, esta otra CAMKK de *S. pombe* podría estar implicada en la respuesta a estrés de nitrógeno.

Para determinar si Cck2 es indispensable para el crecimiento en privación de nitrógeno hicimos un ensayo como al de estrés por glucosa, pero a diferencia el medio que se utiliza es completamente libre de nitrógeno (EMM-N). En la Figura 28 podemos observar el crecimiento de ambos tipos celulares, los ratios del incremento de número de células se comportan de manera semejante, aunque es posible observar que las células delecionadas para *cck2* son ligeramente más bajas en comparación al *wild type*.

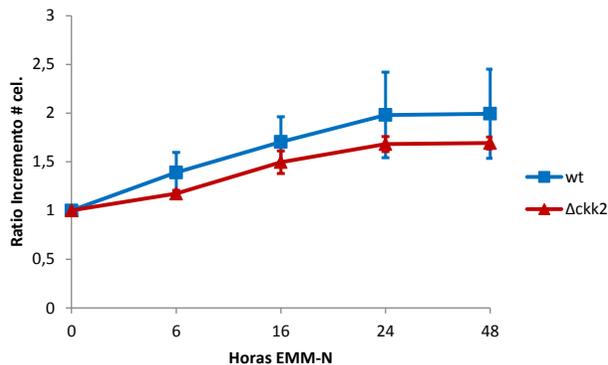


FIGURA 28. El crecimiento del mutante $\Delta cck2$ es semejante al de la cepa *wild type* aunque es ligeramente menor a lo largo del tiempo. Las cepas *wild type* y $\Delta cck2$ fueron crecidas en medio EMM y luego transferidas a medio EMM-N a 26°C, se midió el incremento en el número de células.

Análisis del fenotipo de las células $\Delta cck2$ en medio deficiente en nitrógeno

Al observar que hay una ligera diferencia en el crecimiento decidimos observar el fenotipo del mutante $\Delta cck2$ en condiciones de

deprivación de nitrógeno a través de la tinción con calcofluor y además medimos el índice de septación. Como podemos observar en la Figura 29 el mutante $\Delta ckk2$ presenta un elevado índice de septación en deprivación de nitrógeno. Es apreciable la gran diferencia en el índice de septación, a partir de las 24 horas la cepa $\Delta ckk2$ alcanza un valor de 26 ± 10 mientras que la cepa *wild type* tiene un valor de 0 (Figura 30).

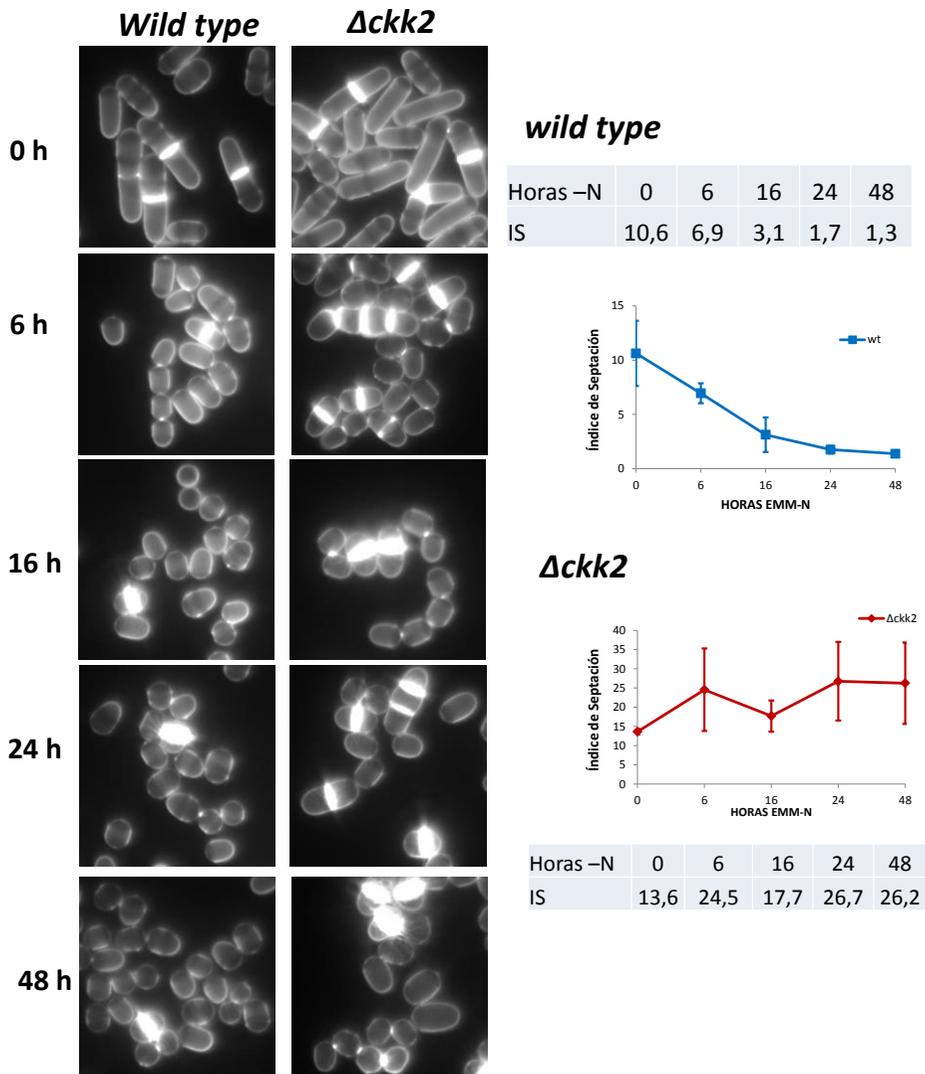


FIGURA 29. El mutante $\Delta ckk2$ presenta un alto índice de septación en condiciones de deprivación por nitrógeno. Cultivos exponenciales de las cepas *wild type* y $\Delta ckk2$ fueron colocados en medio EMM-N e incubados a 26°C, se recogieron puntos a las horas indicadas.

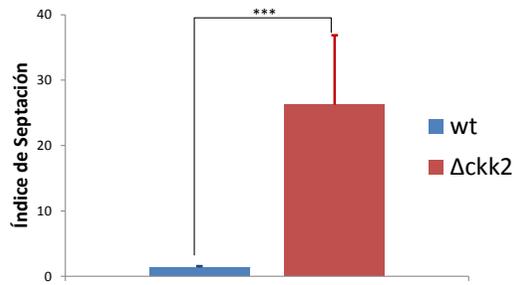


FIGURA 30. El mutante $\Delta cck2$ presenta un alto índice de septación en condiciones de privación por nitrógeno. Los valores son estadísticamente significativos (p value < 0.001).

Expresión de *cck2* en condiciones de privación de nitrógeno

Dado el elevado índice de septación que presenta el mutante delecionada para el gen decidimos analizar la expresión de *cck2* en condiciones de privación de nitrógeno. La cepa *wild type* fue crecida en medio EMM y luego transferida a un medio sin nitrógeno (EMM-N). Se tomaron muestras a los tiempos 0, 6, 16 y 24 horas. En la Figura 31A observamos que los niveles de RNA mensajero de *cck2* aumentan a partir de las 6 horas de privación de nitrógeno y se mantiene casi constante desde las 16 horas hasta las 24 horas, las diferencias a nivel de expresión entre el punto cero y las 24 horas se observa en la figura 39B siendo estadísticamente significativo (p value < 0.05).

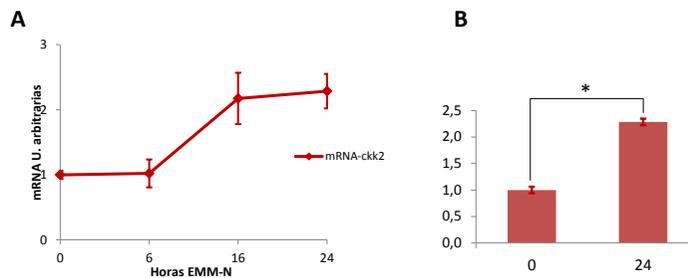


FIGURA 31. La expresión de *cck2* está regulada positivamente a nivel transcripcional en condiciones de privación de Nitrógeno. El cultivo exponencial fue colocado en medio EMM-N y se tomaron muestras a las 0, 6, 16, y 24 horas. (a) Incremento en los niveles de mRNA de *cck2*. (b) Niveles de mRNA de *cck2* a las 0 y 24 horas en EMM-N.

Al observar estos resultados decidimos analizar también el nivel proteico de Ckk2. Para ello La cepa Ckk2-HA fue crecida en medio mínimo EMM y luego transferida un medio con bajos niveles de glucosa EMM-G (Glucosa 0,1%) y cogimos muestras a 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas; y se realizó el *western blot*. Encontramos que el aumento transcripcional se encuentra reflejado en un aumento a nivel proteico; el nivel de proteína aumenta a partir de las 6 horas de igual manera que lo hace el RNAm, y se observa un mayor incremento proteína a partir de las 16 horas. Así como en privación de glucosa observamos una banda de movilidad electroforética retardada (10 kDa aproximadamente) que aumenta a partir de las 16 horas (Figura 32).

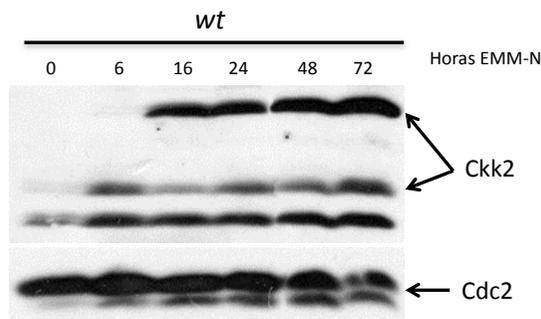


FIGURA 32. Los niveles de Ckk2 incrementan en condiciones de privación de nitrógeno. El cultivo exponencial fue colocado en medio EMM-N y se tomaron muestras a las 0, 6, 16, 24, 48 y 72 horas. El western blot se realizó con anticuerpo anti-HA para detectar Ckk2 y anti-PSTAIR para el control de carga Cdc2.

2.3 Estudio de la modificación post-traduccion de Ckk2 en condiciones de privación de nutrientes

Tanto en las condiciones de privación por glucosa y nitrógeno observamos que la proteína Ckk2 sufre una modificación post-traduccion, encontrando una banda de movilidad electroforética retardada aproximadamente unos 10 kDa arriba (Figuras 27 y 32); debido al aumento en el tamaño de la proteína, pensamos que se podría tratar de una modificación por ubiquitina o por sumo (Pmt3 en *S. pombe*). La modificación por ubiquitina la descartamos después de obtener resultados negativos utilizando diferentes anticuerpos anti-ubiquitina (datos no mostrados). Por

tanto nos centramos en la modificación por sumo. Examinamos la secuencia de Cck2 a través de programas informáticos como SUMOPlot, JASSA y See SUMO; encontramos que la lisina K202 es un aminoácido candidato de ser sumoilado y con una alta probabilidad. Las lisinas K69 y la K251 también podrían ser candidatos aunque presentan baja probabilidad de ser sumoilados (Figura 33). El programa GPS-SUMO destaca además un motivo de interacción con Sumo (*sumo interaction motif*) en la secuencia 267-LIVYA-271, adyacente a la K202, aunque otros programas no lo determinan como tal. Cabe mencionar que según el alineamiento de secuencias con proteínas homólogas de mamíferos esta lisina se encuentra bastante conservada aunque en este caso se ha descrito como un sitio probable de modificación por ubiquitina.

Results for putatifs SUMO site								
Position K	Sequence	Best PS	Consensus direct			Consensus Inverted		
			Type	PSd	DB Hit	Type	PSi	DB Hit
K43	EGPLLKQYRLKNMLGYGACST	None	None	None	1	None	None	1
K69	DVSTNIEYAIKEFKKTSLRRR	None	None	None		None	None	2
K72	TNIEYAIKEFKKTSLRRREKF	Low	None	None	3	None	Low	1
K73	NIEYAIKEFKKTSLRRREKFR	None	None	None		None	None	3
K202	HGKGVIHRLKPDNILFKENN	Low	Strong Consensus	Low		Consensus inv	Low	10
K251	MAPELFDNELKKIKGKPLDIW	Low	None	None	1	None	Low	3
K292	ILDMINVIKGSMLIPAYCNS	None	None	None	1	None	None	1
K306	IPAYCNSDLRKLLEKLEKNP	None	None	None	3	None	None	

FIGURA 33. Cck2 tiene la secuencia consenso en la K202 de la modificación por SUMO según el programa JASSA (Beauclair et al. 2015). La primera columna de la gráfica muestra las lisinas de Cck2, la segunda la secuencia que incluye la lisina y a continuación el grado de consenso con las secuencias de sumoilación definidas teóricamente.

2.3.1 Expresión de Cck2 en una cepa delecionada para el gen que codifica sumo

Dada a la alta probabilidad de que la proteína Cck2 sea modificada por sumo (Pmt3) según los programas informáticos, decidimos realizar el seguimiento de la proteína en la cepa $\Delta pmt3$ en deprivación de nitrógeno. Como observamos en la Figura 34 la banda de Cck2 que aparece en condiciones de deprivación por nitrógeno a partir de aproximadamente las 16 horas se encuentra ausente en la cepa $\Delta pmt3$. Esto nos indica que la

modificación post-traducciona de Ckk2 en condiciones de deprivación por nutrientes es una sumoilación.

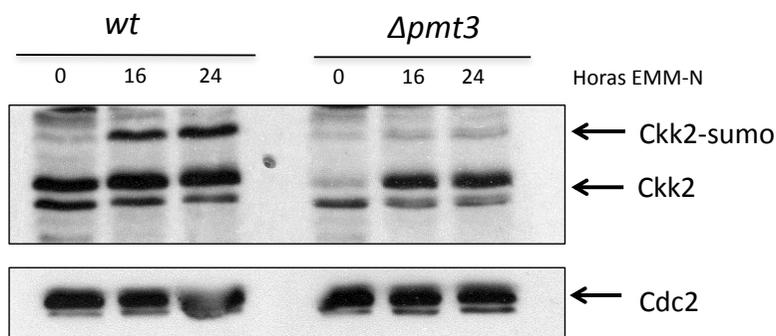


FIGURA 34. Expresión de Ckk2 en el mutante $\Delta pmt3$. Los cultivos exponenciales de las cepas *wild type* y $\Delta pmt3$ fueron colocados en medio EMM-N y se tomaron muestras a las 0, 16 y 24 horas. El *western blot* se realizó con anticuerpo anti-HA para detectar Ckk2 (Ckk2 y Ckk2-sumo) y anti-PSTAIR para el control de carga Cdc2.

2.4 Posibles Reguladores de Ckk2

En la literatura está descrito que las proteínas GSK3, PKA y CDK5, y CK regulan la CAMKK (Racioppi & Means 2012), por tanto decidimos observar que sucedía con los mutantes de las proteínas homólogas en *S. pombe*.

2.4.1 Proteína quinasa GSK3

Está descrita como la homóloga de la GSK3 (*glycogen synthase kinase*) en mamíferos, Gsk3 no es esencial en *S. pombe* y está implicada en la regulación de la mitosis y la segregación cromosómica. La proteína GSK3 humana fosforila a la CAMKK2 en el extremo N-terminal en las S129, S133 y S137, estas fosforilaciones son importantes para la actividad autónoma de la CAMKK2. Si bien este extremo no se encuentra conservado en la Ckk2 quisimos observar que sucedía con la doble mutación, es decir si la doble mutación tenía algún efecto sobre el índice de septación en el mutante $\Delta ckk2$. Para este estudio utilizamos las cepas $\Delta gsk3$, $\Delta ckk2$, *wild type* y el doble mutante $\Delta gsk3 \Delta ckk2$. Los cultivos exponenciales de las cepas fueron crecidos en medio mínimo, y se transfirieron a un medio EMM-N, a continuación medimos los mismos parámetros que hemos utilizado hasta el

momento, el número de células y el índice de septación. En la figura 35A podemos observar que el incremento en el número de células no cambia en el doble mutante con respecto al simple mutante $\Delta cck2$, por el contrario el índice de septación tiene un valor intermedio, es decir no es tan alto como el del mutante $\Delta cck2$ pero tampoco como el del mutante $\Delta gsk3$ (Figura 35B). Además el fenotipo de las células del doble mutante son ligeramente más grandes que los mutantes simples en condiciones de EMM-N; siendo más alargadas con respecto a los simples mutantes y la cepa *wild type* (Figura 35C). En el análisis de la proteína Cck2 a través del *western blot* no observamos diferencias entre la cepa *wild type* y $\Delta gsk3$ (Figura 35D).

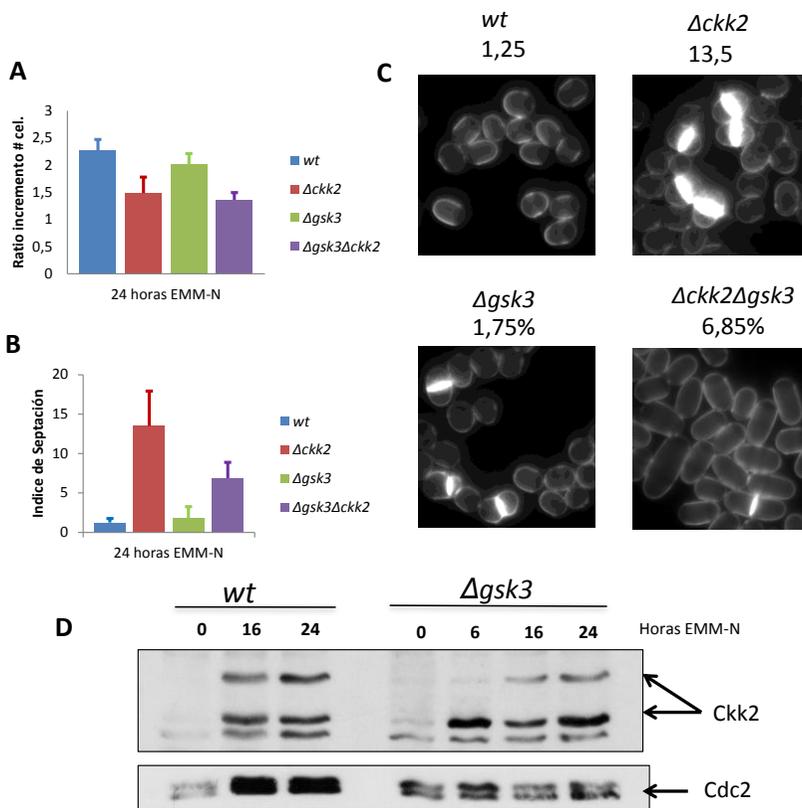


FIGURA 35. Análisis de Gsk3 como posible regulador de Cck2. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo EMM y transferidos a un medio EMM-N. (a) Ratio del incremento en el número de células. (b) Índice de Septación. (c) Tinción en calcofluor de las cepas *wt*, $\Delta cck2$, $\Delta gsk3$ y $\Delta gsk3 \Delta cck2$ y porcentajes de septación (d) Análisis de la expresión de Cck2 en una cepa *wild type* y $\Delta gsk3$ mediante *western blot* con anti-HA para detectar Cck2 y anti-PSTAIR para el control de carga Cdc2.

2.4.2 Subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente del AMPc, Pka1

Además de la proteína Gsk3, Pka1 también está implicada en la fosforilación de la CAMKK2 en las S129, S133 y S137. Pka1 de *S. pombe* está implicada en la respuesta a los cambios de glucosa en el medio. Pues controla la represión transcripcional de genes de respuesta a privación de glucosa, por otra parte está descrito que el mutante $\Delta pka1$ es viable en privación por nitrógeno y presenta un índice de septación bajo en estas condiciones. Por tanto decidimos observar los parámetros de índice de septación, número de células y fenotipo de los mutantes $\Delta pka1$, $\Delta pka1 \Delta cck2$ en condiciones de privación de nitrógeno.

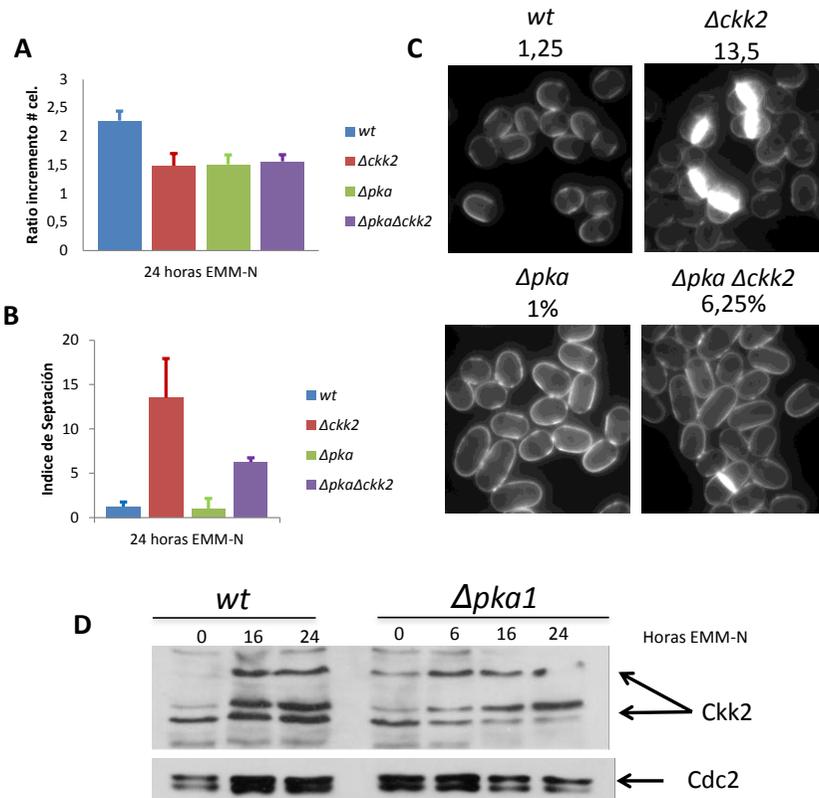


FIGURA 36. Análisis de Pka1 como posible regulador de Cck2. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo EMM y transferidos a un medio EMM-N. (a) Ratio del incremento en el número de células. (b) Índice de Septación. (c) Tinción en calcofluor de las cepas *wt*, $\Delta cck2$, $\Delta pka1$ y $\Delta pka1 \Delta cck2$ y porcentajes de septación (d) Análisis de la expresión de Cck2 en una cepa *wild type* y $\Delta gsk3$ mediante *western blot* con anti-HA para detectar Cck2 y anti-PSTAIR para el control de carga Cdc2.

En la figura 36A observamos que el incremento en el número de células, tanto los mutantes simples como el doble, es más bajo con respecto al *wild type*. El índice de septación del mutante simple $\Delta pka1$ es semejante al de la cepa *wild type* (Figura 36B), mostrando un índice de septación de 1%, mientras que el doble mutante $\Delta pka1 \Delta cck2$ muestra un valor intermedio con respecto a los mutantes simples. El fenotipo de las células del doble mutante es semejante al mutante simple $\Delta pka1$ (figura 36C). Al analizar la proteína Cck2 en la cepa $\Delta pka1$ observamos que la banda correspondiente a la sumoilación de Cck2 está presente desde el punto cero (figura 36D).

2.4.3 Proteína quinasa Hhp1

Homóloga a la Caseína Quinasa I (CKI) de mamíferos, y está implicada en el proceso de reparación del ADN. El mutante $\Delta hhp1$ presenta una morfología alargada y además un índice de septación incrementado en condiciones de privación de nitrógeno por ello decidimos observar que sucede con el doble mutante $\Delta hhp1 \Delta cck2$. Los cultivos exponenciales de las cepas $\Delta hhp1$, $\Delta cck2$ y $\Delta hhp1 \Delta cck2$ fueron crecidos en medio EMM y transferidos a EMM-N. Se midió el incremento en el número de células y el índice de septación. En la Figura 37A observamos que el crecimiento de las cepas mutantes es ligeramente menor que la cepa *wild type*. En la figura 37B se observa que el índice de septación del mutante $\Delta hhp1$ es más alto que la cepa *wild type* aunque no alcanza el valor que el de la cepa $\Delta cck2$; además observamos células alargadas 24 horas después de ser transferidas a un medio deficiente en nitrógeno y además no consiguen reducir el tamaño celular (Figura 37C); el índice de septación es de 11% y, el doble mutante de 11.5% (Figura 37B), hay que mencionar que en el doble mutante $\Delta hhp1 \Delta cck2$ se observan células con dos o 3 septos característica no observada en el simple mutante $\Delta cck2$. De la figura 37D podemos decir que no hay diferencias apreciables en cuanto a la cantidad de proteína, si bien los *western* no son comparables debido a la diferencia en el control de carga se puede pensar que no existe diferencia a nivel proteico en la cepa $\Delta hhp1$ con respecto a la cepa *wild type*.

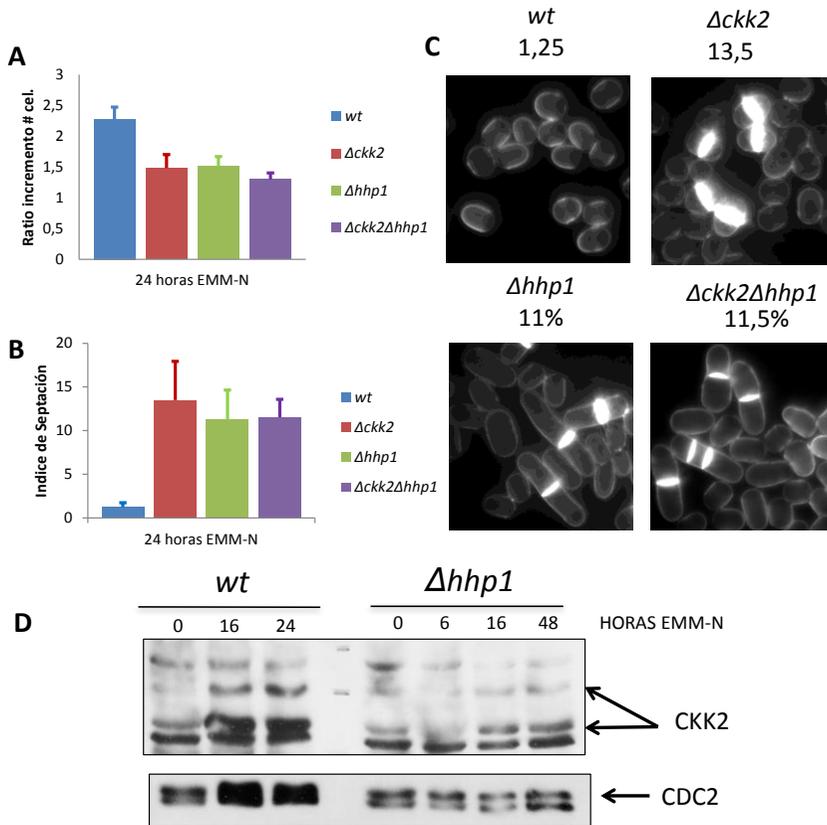


FIGURA 37. Análisis de Hhp1 como posible regulador de Cck2. Cultivos exponenciales fueron crecidos en medio mínimo EMM y transferidos a un medio EMM-N. (a) Ratio del incremento en el número de células. (b) Índice de Septación. (c) Tinción en calcofluor de las cepas *wt*, $\Delta cck2$, $\Delta hhp1$ y $\Delta hhp1 \Delta cck2$ y porcentajes de septación (d) Análisis de la expresión de Cck2 en una cepa *wild type* y $\Delta gsk3$ mediante *western blot* con anti-HA para detectar Cck2 y anti-PSTAIR para el control de carga Cdc2.

2.5 Cck2 y el inhibidor de Calcineurina FK506

Complementario al estudio de sensibilidades y dado que calcineurina ha sido implicada en la citocinesis (Yoshida et al. 1994) y, además, hemos descrito que Cck2 regula negativamente el eje calcineurina-Prz1 (Cisneros-Barroso et al. 2014), quisimos observar que sucedía con el mutante $\Delta cck2$ cuando se le añade el inhibidor de calcineurina. Para ello los cultivos exponenciales de la cepa *wild type* y $\Delta cck2$ fueron crecido en medio rico hasta alcanzar una OD de 0.3 y agregamos FK506 a una concentración

de 5ug/ml. Evaluamos el índice de septación y el número de células a las 3 y 6 horas. En la Figura 38A podemos observar que la viabilidad del mutante $\Delta cck2$ se encuentra comprometida frente al inhibidor de calcineurina FK506 y en la figura 38B observamos que el incremento en el número de células también está afectado en el mutante $\Delta cck2$ en presencia del inhibidor, en cambio la cepa *wild type* es capaz de crecer casi normalmente en presencia de la droga. El índice de septación del mutante $\Delta cck2$ se encuentra incrementado, a diferencia de la cepa *wild type*, alcanzando unos valores de hasta 60% (Figura 38C). Calcineurina ha sido implicada en la citocinesis, nosotros encontramos que la droga inhibidora de calcineurina retrasa la citocinesis en la cepa $\Delta cck2$ simulando el fenotipo que observamos en condiciones de privación de nutrientes pero en crecimiento exponencial. Además es posible observar células alargadas y algunas de ellas, en un porcentaje muy bajo, presentan 2 o incluso 3 septos (Figura 38D).

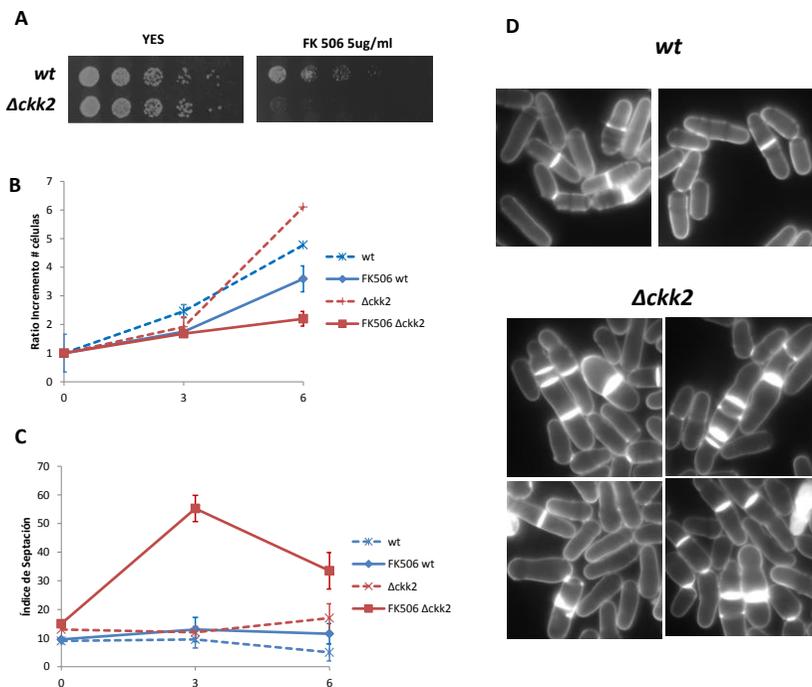


FIGURA 38. Inhibición de calcineurina en cepas *wild type* y $\Delta cck2$. Cultivos de las cepas *wild type* y $\Delta cck2$ fueron crecidos en medio rico hasta alcanzar una OD de 0.3 (A) Ensayo de viabilidad en placa. (B) A los cultivos líquidos se le añadió FK506 5ug/ml y se cogieron puntos a las 3 y 6 horas para medir el incremento en el número de células. (c) Índice de Septación. (D) Tinción en calcofluor a las 6 horas.

3. Identificación de Nuevos Sustratos de la quinasa Ckk2

3.1 Identificación de sustratos de la quinasa Ckk2 en respuesta a Ca^{2+}

Con la finalidad de determinar si Ckk2 tenía otros sustratos además de Cmk1 decidimos realizar un análisis de fosfo-péptidos en estrés por Ca^{2+} . Para ello crecimos las cepas *wild type* y la cepa delecionada para *ckk2* en medio rico y agregamos Ca^{2+} (CaCl_2 100mM). Los extractos proteicos fueron digeridos y pasaron por un proceso de enriquecimiento de fosfopéptidos, luego se analizaron por espectrometría de masas (Plataforma de Proteómica- Parc Cientific). A partir de la información obtenida desde proteómica, hicimos un análisis de los péptidos que se encontraban fosforilados en la cepa *wild type* y no lo estaban en el mutante $\Delta ckk2$ (Figura 39, Tabla A en anexos). Encontramos que los genes que regulan el ciclo celular están ampliamente representados (26%) y tal como se esperaba de la respuesta a Ca^{2+} , se activan cascadas de señalización (16%). También encontramos proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto (14%), regulación de la transcripción (13%), regulación de la transducción de señales de la vía de Ras (12%), regulación de la biogénesis de componentes celulares (1%), y también proteínas de respuesta a estímulos abióticos y de respuesta a sustancias inorgánicas (2% cada una de ellas).

85

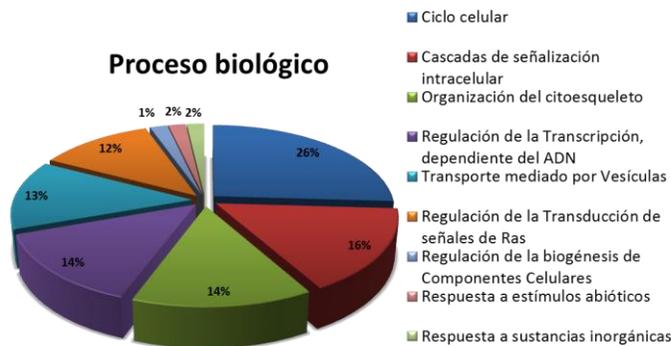


FIGURA 39. Ckk2 está implicada en la señalización de numerosos procesos celulares. Cultivos de las cepas *wt* y $\Delta ckk2$ fueron tratadas con CaCl_2 . Las muestras pasaron por un enriquecimiento de fosfopéptidos y fueron analizadas por espectrometría de masas. Las proteínas fosforiladas dependientes de Ckk2 se clasificaron a través de *Gene ontology*, análisis realizado con el programa DAVID.

El análisis se realizó también para determinar la ubicación celular de las proteínas enriquecidas en nuestra muestra. Observamos que un 54% de las proteínas se encuentran en estructuras celulares no envueltas por membrana, esto quiere decir estructuras citoplasmáticas, complejos proteicos, etc. Por otra parte un grupo bastante representativo se encuentra en el lugar de división celular 34%, además encontramos un 5% de proteínas ubicadas en la cara interna de la membrana, y del complejo de remodelamiento de la cromatina. Un 1% se encuentra en los polos de crecimiento (Figura 40).

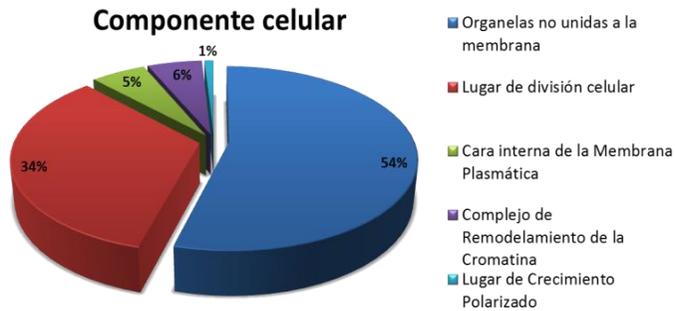


FIGURA 40. La función de Cck2 modifica proteínas que conforman estructuras dentro de la célula y del lugar de división celular. Clasificación por localización celular, análisis realizado con el programa DAVID.

3.1.1 Respuesta a Ca^{2+} de los posibles sustratos de Cck2

Dado que los péptidos analizados por espectrometría de masas fueron encontrados en condiciones de estrés por Ca^{2+} , decidimos hacer un ensayo de sensibilidad al ion con mutantes de algunas de las proteínas identificadas, en especial las que están implicadas en la organización del citoesqueleto, citocinesis y crecimiento polarizado (Tea4, Kin1, Rgf2, Myo2, Tip1, Par1, Klp6, Gef2, Mid2, Mod5, Mok12), señalización celular (Rga6, Gyp51, Pzh1, Pli1, Cgs1, Fab1, Sck2, Asp1, Gsk3, Hhp1, Pka1, Sec72, Cta3) o que estén implicadas en la respuesta a calcio (Cta3) y nitrógeno (Oca2). Como observamos en la figura 41 el mutante $\Delta pzh1$ presenta resistencia al calcio de forma similar a $\Delta cck2$; y los mutantes $\Delta tea4$, $\Delta tip1$, $\Delta kin1$ y $\Delta pka1$ mostraron viabilidad semejante a la cepa *wild type* en presencia de calcio. El resto de mutantes son más resistentes que la cepa *wild type* pero menos que $\Delta cck2$.

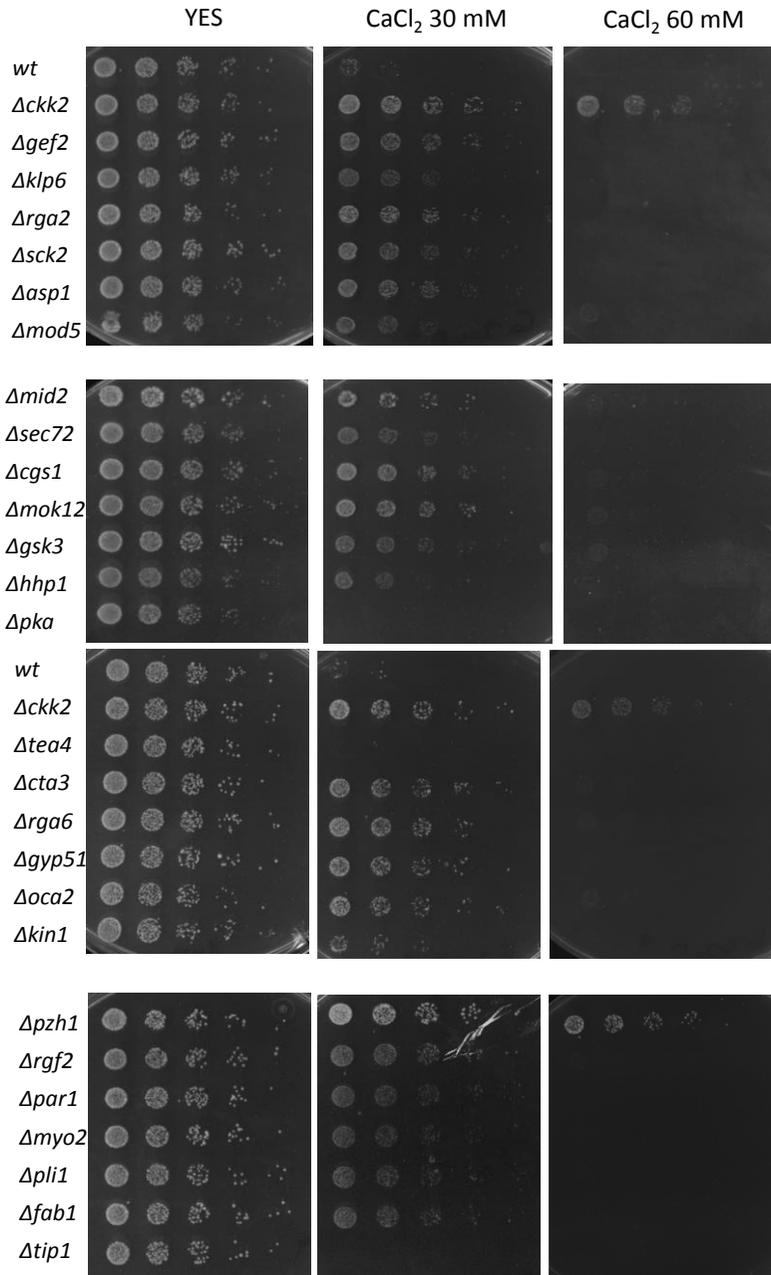


FIGURA 41. Ensayo de viabilidad de posibles sustratos de Cck2 en estrés por Ca²⁺. Los cultivos celulares crecieron hasta alcanzar una OD de 0.3 y luego se hicieron diluciones seriadas y se inocularon en placas, las placas se incubaron a 30°C 48-72h.

3.1.2 Respuesta a diferentes estreses y agentes de los mutantes seleccionados

De todos los posibles sustratos de Ckk2 nos hemos centrado en aquellos que estén implicados en la regulación del citoesqueleto debido al fenotipo que presenta el mutante $\Delta ckk2$ en los ensayos de viabilidad en placa frente a agentes como tiabendazol, latrunculina, calcofluor. Realizamos el ensayo de viabilidad de los sustratos derivados de la actividad de Ckk2, en la figura 42 se observa las diferentes condiciones. El mutante $\Delta kin1$ es sensible así como $\Delta ckk2$ al agente FK506, además a latrunculina, tiabendazol, y comparten la resistencia a calcofluor; sin embargo la respuesta a estrés por calcio de estos mutantes es opuesta, mientras $\Delta kin1$ es sensible el mutante $\Delta ckk2$ es resistente.

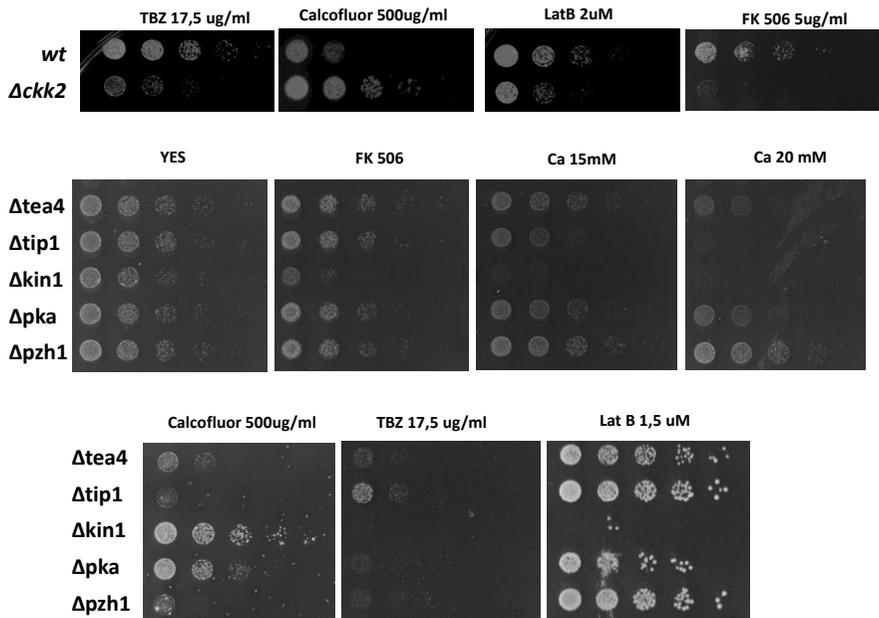


FIGURA 42. Ensayo de viabilidad a diferentes estreses de los posibles sustratos de Ckk2. Diluciones seriadas de los cultivos exponenciales fueron sembrados en placas de YES con los diferentes tratamientos. Las placas se incubaron 48-72

3.1.3 Ensayo quinasa de los posibles sustratos de Ckk2

A partir de los ensayos ya realizados teníamos múltiples candidatos posibles como dianas de Ckk2, para determinar cuáles podrían ser dianas

directas decidimos hacer un ensayo quinasa *in vitro*. El ensayo fue llevado a cabo con péptidos sintéticos como sustratos (Figura 43), cuya secuencia se determinó en la espectrometría de masas, y la proteína recombinante Ckk2. La quinasa y los sustratos fueron incubadas con Ca^{2+} y CaM, dado que hemos demostrado que la actividad de Ckk2 es dependiente del complejo Ca^{2+} /CaM, durante 30 minutos a 37°C. Realizamos una cromatografía en capa fina para poder separar el ATP libre de los péptidos fosforilados. Como se puede observar en la figura 43 la proteína Ckk2 es capaz de fosforilar a la fosfatasa Pzh1, la quinasa Gad8, la proteína reguladora de microtúbulos Tip1, la proteína organizadora del anillo contráctil Mid2; la quinasa Sid2, y las proteínas Sts5 y Shk1.

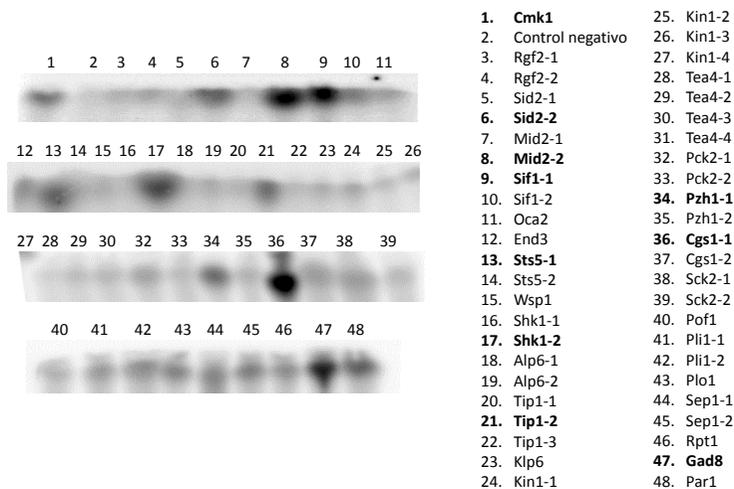


FIGURA 43. Ensayo quinasa *in vitro* con los péptidos sustratos de Ckk2. Los péptidos fueron diluidos según las indicaciones de manufactura y se realizó el ensayo quinasa en presencia de Ca^{2+} y CaM. En negrita los sustratos que dieron positivo.

3.2 Identificación de sustratos de la quinasa Ckk2 en privación de nitrógeno

El aumento a nivel transcripcional y a nivel de proteína en Ckk2 en condiciones de privación por nutrientes, nos indica que esta proteína podría cumplir un rol en estas condiciones. Para poder determinar que función desempeña la quinasa Ckk2 decidimos identificar posibles sustratos

mediante dos aproximaciones, el análisis de fosfopéptidos y mediante el análisis de proteínas relacionadas con Ckk2 y la respuesta a privación de nutrientes.

Analizamos la respuesta a privación de nitrógeno de proteínas relacionadas con Ckk2 como Cmk1 y Prz1 o Ssp2 sustrato de la CAMKK Ssp1. De estos mutantes no encontramos ninguno que mostrara el mismo fenotipo que el mutante $\Delta ckk2$, todos los mutantes presentaron un índice de septación y morfología como la cepa *wild type*. Otros mutantes como $\Delta ppk9$, otra subunidad catalítica de la AMPK en *S. pombe* y las MAPK $\Delta pmk1$ y $\Delta spk1$; también fueron analizados y mostraron un fenotipo semejante a las células *wild type* (resultado no mostrado).

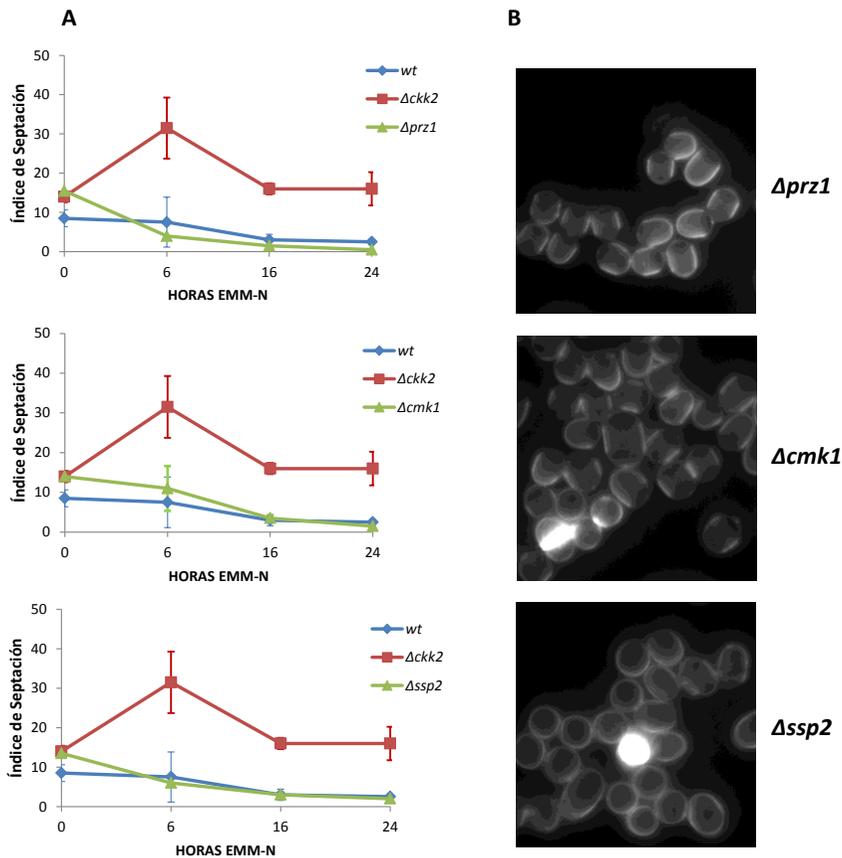


FIGURA 44. Cultivos exponenciales de las cepas $\Delta cmk1$, $\Delta ssp2$, $\Delta prz1$ y las cepas *wild type* y $\Delta ckk2$ como controles fueron crecidos en medio EMM y fueron transferidos a medio EMM-N. Se tomaron puntos a 0, 6, 16 y 24 horas. (A) Índice de septación. (b) Tinción en calcofluor de las mismas cepas a las 24 en EMM-N.

3.2.1 Análisis de fosfo-péptidos dependientes de Cck2 en EMM-N

Este experimento fue realizado siguiendo las mismas pautas que en las condiciones de estrés por calcio. Cultivos celulares de las cepas *wild type* y $\Delta cck2$ fueron crecidos en EMM y luego transferidos a medio EMM-N. Después de 24 horas se cogieron las muestras para el enriquecimiento de fosfopéptidos. A partir de la información obtenida, hicimos un análisis de los péptidos que se encontraban fosforilados en la cepa *wild type* pero no en el mutante $\Delta cck2$ (Figura 45). Encontramos que hay un grupo importante de proteínas que median el transporte celular (19%), proteínas reguladoras del ciclo celular (8%), proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto (7%), organización cromosómica (6%), proteínas implicadas en la degradación dependiente de ubiquitina (6%), regulación de la transcripción (6%), y organización o biogénesis de la pared celular (5%). Las proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto se encuentran mencionadas en la tabla 5, este grupo nos parece especialmente interesante debido a su posible relación con la modificación del fenotipo celular en las condiciones de privación de nitrógeno.

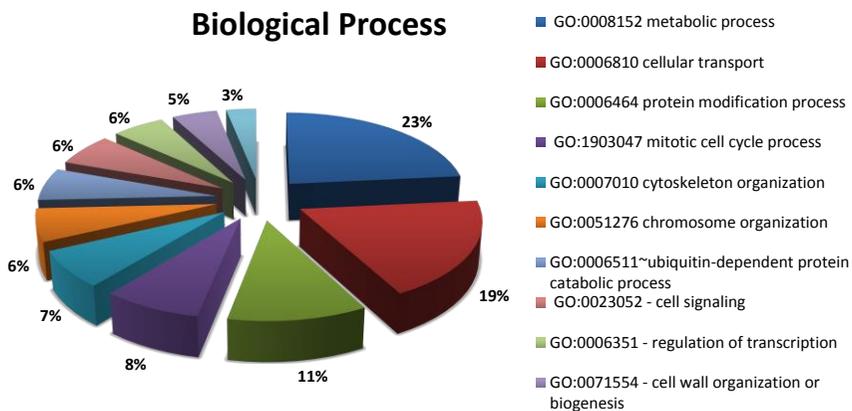


FIGURA 45 Clasificación de las proteínas sustratos de Cck2 en respuesta a privación de nitrógeno, según su función en procesos celulares. Los componentes de cada proceso celular se muestran en los anexos Tabla B.

Tabla 5. Proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto, cuya fosforilación depende de la actividad de Ckk2 en respuesta a privación de nitrógeno.

GO:0007010 cytoskeleton organization	
SPBC1604.20c	Kinesin-like protein tea2
SPAC890.02c	Microtubule protein alp7
SPBP35G2.05c	Casein kinase I homolog 2 cki2
SPAC17H9.09c	GTPase ras1
SPBC800.05c	alpha-tubulin 2 atb2
SPBC14C8.06	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1 arc1
SPCP1E11.02	Protein kinase ppk38
SPCC1020.02	Kinetochores protein scp7
SPCC1919.10c	Myosin-52 myo52

Con respecto a la ubicación celular de las proteínas cuya fosforilación es dependiente de Ckk2; encontramos que las proteínas se encuentran distribuidas en el citoplasma y/o núcleo (53%) y encontramos que algunas tienen ubicaciones más específicas como; proteínas componentes de la membrana (14%), proteínas del retículo endoplásmico (9%), proteínas que forman parte de la mitocondria (8%), proteínas que conforman el citoesqueleto (7%), proteínas que se encuentran en los polos de las células (sitio de crecimiento activo longitudinal de la célula) (5%) y componentes del aparato de Golgi (5%).

92

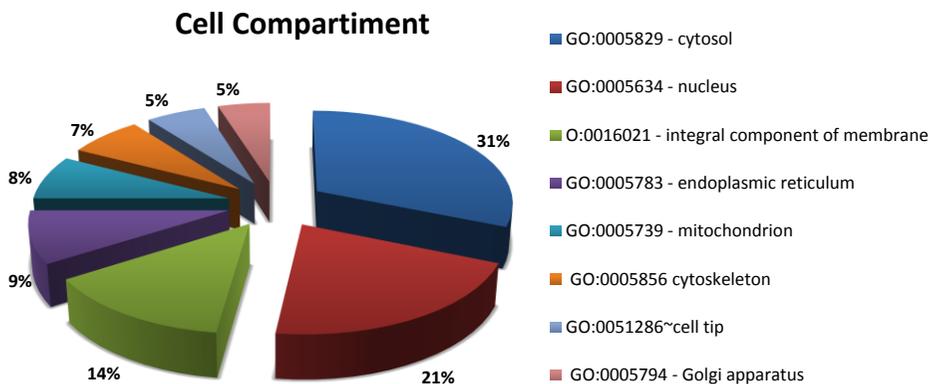


FIGURA 46. Clasificación de las proteínas reguladas por Ckk2 en respuesta a privación de nitrógeno, según su ubicación celular.

4. Análisis del dominio consenso de fosforilación de las CAMKK

La familia de las CAMKKs, a pesar de ser quinasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ no siguen el consenso de fosforilación descrito para las CAMKs (RXXS/T). Sin embargo, el hecho de que se conozcan varios sustratos de las CAMKKs incluido el residuo específico de fosforilación permite alinear estas secuencias y comparar homologías (Wen et al. 2013). Dado que uno de los objetivos de este trabajo era la identificación de nuevos sustratos de la CAMKK, Ckk2, nos planteamos analizar los sustratos ya conocidos de las CAMKKs tanto humanas como de levadura para definir un posible consenso de fosforilación y comprobar si está presente en los sustratos identificados.

4.1 Dominio consenso de fosforilación por CAMKKs a partir de los sustratos conocidos

Alineamos las secuencias de los sustratos conocidos de CAMKKs tanto de mamíferos como de *S. pombe*, como son la CAMKIV, CAMKI, AMPK y, Cmk1, Spp2 y Ppk9. Al realizar el alineamiento de los sitios de fosforilación de las proteínas (figura 47) encontramos la siguiente secuencia $\Phi\text{LXTXCG}[T/S]\text{PXY}$, donde la T fosforilada por las CAMKKs se encuentra después de dos aminoácidos hidrofóbicos y precede los aminoácidos CG y la secuencia TP conservada en las quinasas en general. También observamos que la T fosforilada por las CAMKKs se encuentra dentro del bucle de activación de las quinasas (figura 19).

$\Phi\text{LXTXCG}_{T/S}\text{PXY}$

CAMKIV_HUMAN	DFGLSKIVEHQ--VLMKTVCGTPGYCAPEIL
CAMKI_HUMAN	DFGLSKMEDPG--SVLSTACGTPGYVAPEVL
CMK1_SCHPO	.DFGLSHFYEDSQYYMLMTACGTPEYMAPEVF
PPK9_SCHPO	DFGLSNFMLDG--SFLSTSCGTPHYAAPEVI
AMPK_HUMAN	.DFGLSNMMSDG--EFLRTSCGSPNYAAPEVI
SSP2_SCHPO	.DFGLSNIMTDG--NFLKTS CGSPNYAAPEVI
	*****.: .: * **:* * **::

FIGURA 47. Dominio consenso de fosforilación por CAMKK. Alineamiento de las secuencias de las quinasas CAMKIV, CAMKI, AMPK humanas y, Cmk1, Spp2 y Ppk9 de *S. pombe*. Los (*) indican un único residuo conservado, los (:) indican residuos de grupos con características muy parecidas y los (.) indican residuos de grupos con características poco similares.

El bucle de activación se encuentra entre los subdominios VII y VIII de las serina/treonina quinasas. En el subdominio VII de estructura de las quinasas se encuentra el bucle de unión al magnesio y en el subdominio VIII se encuentra los residuos conservados TP (treonina y prolina).

4.2 Consenso de fosforilación por Ckk2 en los sustratos identificados.

Definido el consenso de fosforilación por CAMKKs analizamos los sustratos obtenidos de los análisis de fosfopéptidos para determinar si poseen dicho consenso. De los sustratos encontramos que al menos 9 poseen una T susceptible de ser fosforilada por CAMKKs, ubicada tres posiciones por delante de la secuencia TP conservada. Sid2 es la excepción pues presenta una S en lugar de la T. La mayoría de ellos también presentan los residuos CG en posición +2 de la T de fosforilación. Observamos que solo alguna de ellas presenta L en posición -2, además encontramos una tirosina +7 de la T de fosforilación en todos los sustratos excepto en Pck2. Es interesante remarcar que Kin1 muestra una mayor homología del dominio consenso con Cmk1, un sustrato de Ckk2 bien definido.

94

Cmk1	E D S Q Y Y M L M T	A C G T P E Y M	A P E V F R
Kin1	L Y R R Q S R L R T	F C G S L Y F A	A P E L L N
Sck2	N L S V G T T T R T	F C G T T D Y L	A P E V I L
Sid2	L S Q D P V Y A H S	V V G S P D Y M	A P E V L R
Shk1	I D S N M T K R T T	M V G T P Y W M	A P E V V T
Oca2	P F E A D I V E A T G	V V G S D P Y L	A P E T L V
Pck2	D M W H D N T T A T	F C G T P E F M	A P E I L L
Sck1	N L S A N A T T N T	F C G T T E Y L	A P E V L L
Gad8	N M A K T D R T N T	F C G T P E Y L	A P E L L L
Plo1	L M D D E E R K M T	I C G T P N Y I	A P E I L F
Ppk1	P T E K P D L F S T	S C G S P C Y A	A P E L V N
		* :	* * *

FIGURA 47. Alineamiento de los dominios de activación de los posibles sustratos de Ckk2. Alineamiento de las secuencias de las quinasas Cmk1, Kin1, Sck2, Sid2, Shk1, Oca2, Pck2, Sck1, Gad8, Plo1 y Ppk1. Los (*) indican un único residuo conservado, los (:) indican residuos de grupos con características muy parecidas.

DISCUSIÓN

1. Ckk2 una nueva quinasa dependiente de calcio y calmodulina

Como parte de la descripción de Ckk2, se realizó el análisis de la secuencia de Ckk2, que nos indica que la proteína contiene los dominios descritos para las quinastas (Hanks et al. 1988), además observamos que las quinastas pertenecientes a la familia de las CaM quinastas contienen la secuencia consenso [I/V][I/V]IHRD[I/L]KPXN[I/L]L en el dominio catalítico (Figura 19). Por otra parte analizando las secuencias de los sustratos identificados hemos detectado que algunos de ellos presentan un dominio consenso de fosforilación por CAMKKs; previamente definido a partir de los sustratos de CAMKKs ya descritos. Este dominio contiene la secuencia Φ LXTXCG[T/S]PXY. Cabe señalar que la T susceptible de ser fosforilada se encuentra en el bucle de activación, el cual se localiza entre los subdominios VII y VIII de las serina/treonina quinastas.

Además de la homología de secuencia con la familia de las CaM quinastas, quisimos evaluar si Ckk2 es una quinasa dependiente de Ca^{2+} y CaM. Como hemos demostrado nuestra proteína interacciona con la proteína CaM, dicha interacción está mediada por calcio puesto que al añadir el quelante de calcio (EGTA) se interrumpe la interacción. Con respecto a la actividad de la quinasa es interesante remarcar que la actividad de Ckk2 es específica, pues al realizar el ensayo quinasa *in vitro* con el sustrato general de quinastas MBP, no observamos fosforilación (Figura 22); al contrario de lo que sucede cuando se añade el sustrato Cmk1, se observa una fuerte fosforilación de Cmk1 por Ckk2. Éste ensayo *in vitro* nos permitió corroborar lo que habíamos visto anteriormente *in vivo*, que Ckk2 es la responsable de fosforilar a Cmk1 y que dicha fosforilación es directa y dependiente del complejo Ca^{2+} /CaM. Por tanto Ckk2 es una proteína de unión a CaM, y además su actividad catalítica, es dependiente del complejo Ca^{2+} /CaM, quedando establecido que a diferencia de otras CaM quinastas en *S. pombe* Ckk2 es una CaM quinasa no solo por homología de secuencia sino también porque su actividad depende del complejo Ca^{2+} /CaM.

Está descrito en la bibliografía que la CAMKK2 presenta un alto nivel de auto-fosforilación *in vitro* (Tokumitsu et al. 2011; Anderson et al. 1998), a partir del ensayo quinasa encontramos que Ckk2 también muestra auto-

fosforilación *in vitro* (Figura 22), curiosamente de igual manera que su homóloga en mamíferos; podría indicar algún tipo de actividad autónoma y/o actividad independiente del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$? En cualquier caso es difícil de evaluar; pero si es interesante puntualizar que esta autofosforilación disminuye en presencia de Ca^{2+} y CaM corroborando de manera indirecta que la quinasa interactúa con el complejo; quizás la unión del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ hace que la actividad quinasa sea más específica hacia su sustrato o module su actividad de acuerdo a las señales en el medio, así como sucedería con su homóloga en mamíferos (Racioppi & Means 2012).

2. Ckk2 y la viabilidad celular

La delección de Ckk2 compromete la viabilidad celular frente a agentes que desestabilizan el citoesqueleto

Tal como hemos indicado, la respuesta de un mutante a una condición particular implica que la proteína delecionada está potencialmente involucrada en la mediación de las señales que tienen lugar en la respuesta celular frente al factor de estrés en cuestión. Al evaluar el crecimiento del mutante $\Delta ckk2$ en presencia de diferentes tipos de estrés encontramos que la delección de *ckk2* comprometía la viabilidad frente al agente despolimerizador de microtúbulos Tiabendazol y al agente inhibidor de la polimerización de actina, Latrunculina. La polimerización de microtúbulos está implicada en los procesos de segregación cromosómica, división nuclear y polaridad celular (Chang & Martin 2009; Martin 2009). La polimerización de actina se produce en los sitios de endocitosis que acompaña el crecimiento polarizado siendo el primer paso para el establecimiento de la polaridad de la célula y su crecimiento, además de la formación de la pared celular (Osumi et al. 1998). En general los procesos en que participan tanto actina, como microtúbulos son el crecimiento, la morfología y la polaridad celular en *S. pombe* (Feierbach et al. 2004). Por otra parte, la delección de *ckk2* es resistente a altas concentraciones de calcofluor; el calcofluor se une a los polímeros de $\beta(1,3)$ y $\beta(1,4)$ glucano que conforman la pared celular desorganizándolos (Nicholas et al. 1994) resultando tóxico para la célula porque interfiere en el ensamblaje de la pared. Por tanto, nuestros resultados de viabilidad de $\Delta ckk2$ nos indican que

Ckk2 podría estar implicada en procesos de crecimiento, morfología o polaridad celular.

La delección de Ckk2 en condiciones de privación de nutrientes

La CAMKK Ssp1 ha sido descrita como esencial para el crecimiento en condiciones de privación por glucosa (Hanyu et al. 2009), y por tanto quisimos evaluar si Ckk2 la otra CAMKK en *S. pombe* es necesaria para la viabilidad en condiciones de privación de nutrientes. Nuestros resultados nos indican que Ckk2 no es esencial para el crecimiento celular en condiciones de privación de glucosa, a diferencia de Ssp1, la otra CAMKK (Figura 30). Aunque observamos que la viabilidad celular se encuentra ligeramente comprometida en condiciones de privación de nitrógeno (EMM-N) (Figura 33), es decir se observa que el incremento en el número de células a lo largo de las horas es inferior que el incremento observado en la cepa *wild type*. Sabemos que las células son viables en ausencia de nitrógeno y que esta diferencia en el incremento de número de células no es estadísticamente significativa, por lo cual concluimos que Ckk2 no es indispensable para el crecimiento celular en condiciones de estrés de nutrientes.

3. Ckk2 y el Índice de Septación

Las células delecionadas para *ckk2* muestran un incremento en el índice de septación en condiciones de privación de nutrientes

A pesar que Ckk2 no es indispensable para la viabilidad celular en condiciones de privación de glucosa encontramos que la delección de *ckk2* produce un aumento en el índice de septación en estas condiciones. Entre las 4 y 12 horas de privación el índice de septación del mutante $\Delta ckk2$ aumenta, pero en la cepa *wild type* disminuye a lo largo del tiempo. Este aumento en el índice de septación podría indicarnos un retraso en la división celular ya que se produce una acumulación de células que entran en citocinesis durante las 4 y 12 horas de privación, que luego disminuye porque las células concluyen la citocinesis hasta alcanzar el valor de la cepa *wild type*.

En condiciones de privación nitrógeno (EMM-N) observamos que la viabilidad celular se encontraba ligeramente comprometida (Figura 33), y que además se produce un incremento del índice de septación (Figura 34), al igual que en EMM-G. Si bien este incremento en el índice de septación es variable durante las primeras horas; a partir de 24 horas en privación de nitrógeno se establece alrededor de un 25% con una clara diferencia con respecto a la cepa *wild type* 1% ($p \leq 0,001$), diferenciándose de las condiciones de privación de glucosa donde el índice de septación disminuye a lo largo del tiempo. La diferencia en el índice de septación entre las cepas *wt* y $\Delta cck2$ podría explicar lo que observamos con respecto al incremento en el número celular, donde el mutante $\Delta cck2$ muestra un menor incremento.

Estas observaciones nos sugieren que la proteína Cck2 podría tener un rol en la citocinesis. La citocinesis en *S. pombe* está dada por la adición de azúcares como 1,3- α -glucanos, 1,3- β -glucanos, 1,6- β -glucanos y un α -galactomanano componentes de la pared celular (Bush et al. 1974; Grun et al. 2004; Ishiguro 1998) y la constricción del anillo contráctil (Simanis 1995; Pelham & Chang 2001; Naqvi et al. 1999). La digestión del septo primario por enzimas glucanasas, dará lugar a dos células hijas. El tráfico vesicular es muy importante para la formación del septo y la futura pared celular (Osumi et al. 1998; Simanis 1995). Cck2 tiene como dianas (directas o indirectas) componentes del transporte vesicular (Fab1, Sec5, Sec72, Sif1, Vps13a, Yop1, Arc1, Nxt3, etc), así como proteínas de la síntesis de componentes de la pared celular (Chr3, Lkh1, Chr4, Chr2, Exg3, Gas5, etc), de las cuales algunas se encuentran ubicadas en el sitio de división celular.

Cck2 y el inhibidor de Calcineurina

Calcineurina es la homóloga de PP2B en mamíferos, en *S. pombe* está conformada por la subunidad catalítica Ppb1 y la subunidad reguladora Cnb1 (Yoshida et al. 1994; Sio et al. 2005). Calcineurina en la levadura de fisión está implicada en la señalización por estrés, la homeostasis del calcio, el tráfico intracelular, la polaridad y la división celular (Yoshida et al. 1994; Hirayama et al. 2003; Fujita et al. 2002; Yada et al. 2001; Lu et al. 2002; Cheng et al. 2002). La droga FK506 se une a la calcineurina activa impidiendo su funcionalidad (Sio et al. 2005), se ha demostrado que FK506 promueve defectos en la estructura del anillo contráctil durante la mitosis retrasando la

progresión de la mitosis (Cadou et al. 2013). Nosotros hemos observado que el defecto del mutante $\Delta ckk2$ en condiciones de privación de nutrientes (aumento en el índice de septación), es el mismo que presenta en medio rico al añadir la droga FK506. Esto nos podría sugerir que tanto Ckk2, así como calcineurina, estaría implicada en la citocinesis o resolución de la septación.

En el cribado para encontrar nuevos sustratos de Ckk2, identificamos la proteína Kin1. La proteína Kin1 es una proteína de la familia PAR1 (Levin & Bishop 1990), implicada en la división celular, la polaridad de la actina y la citocinesis (Busch et al. 2004; Drewes & Nurse 2003; La Carbona et al. 2004; Carbona & Goff 2006). El mutante $\Delta kin1$ presenta problemas de citocinesis, alcanzando un 40% de índice de septación en condiciones de crecimiento exponencial, que se mantiene si las células son privadas (Levin & Bishop 1990); además las células son monopolares, por lo que Kin1 podría también estar implicada en el establecimiento de NETO. Cadou et al. 2013 sugieren que Kin1 y calcineurina cooperan para regular la citocinesis, nuestros resultados muestran que los mutantes $\Delta kin1$ y $\Delta ckk2$, ambos son sensibles a la droga FK506. Por tanto si aceptamos que calcineurina y Kin1 son las encargadas de prevenir los fallos en la citocinesis, es posible Ckk2 tenga alguna función en la citocinesis, junto con calcineurina y la quinasa Kin1.

4. Ckk2 y la privación de nutrientes

La expresión de Ckk2 está regulada positivamente en condiciones de privación de nutrientes

En general, en la respuesta a privación de nitrógeno los niveles proteicos se encuentran bastante disminuidos; para nuestra sorpresa encontramos que los niveles proteicos de la quinasa Ckk2 se encuentran fuertemente incrementados en estas condiciones, también encontramos que sucede lo mismo en condiciones de privación de glucosa. Este aumento a nivel proteico es el reflejo de un aumento a nivel transcripcional, tal como observamos al analizar la expresión génica por *Real time PCR* (Figura 36). Nuestra primera sospecha fue pensar que el factor de transcripción Prz1 fuese el responsable de la activación transcripcional de *ckk2*, sin embargo encontramos que la expresión de *ckk2* es igual en el

mutante *Δprz1* que la cepa *wild type* (datos no mostrados). Por tanto descartamos que la expresión de *ckk2* estuviera regulada por el factor de transcripción Prz1 y nos deja la pregunta abierta sobre cuál es el factor de transcripción responsable de regular la expresión de *ckk2*. Gaf1 es un factor de transcripción responsable de la activación de genes en respuesta a privación de nitrógeno (Kim et al. 2012; Laor et al. 2015), por tanto nos planteamos que quizás este factor de transcripción del tipo GATA podría regular la transcripción de *ckk2*. Al analizar la secuencia 3' del gen de *ckk2* encontramos sitios de unión GATA; a pesar de esta observación, Kim et al. 2012 describen que la transcripción de *ckk2* no es dependiente del factor de transcripción Gaf1, aunque acorde a nuestros datos, afirman que la transcripción de *ckk2* está aumentada en respuesta a privación de nitrógeno. Recientemente se ha descrito que Gaf1 cumple un rol clave y exclusivo en la respuesta temprana a privación de nitrógeno (Laor et al. 2015). Dado que *Ckk2* aumenta tanto en privación de glucosa y nitrógeno pensamos que difícilmente este factor de transcripción podría estar implicado en la regulación de *ckk2* y que la transcripción de *ckk2* este bajo el control de cualquiera de los otros 3 factores de transcripción de tipo GATA u otro tipo de factor de transcripción.

102

Es interesante plantear que *Ckk2* podría estar implicada en la respuesta a privación de nutrientes. De hecho su homóloga en mamíferos la CAMKK2 forma un complejo con la AMPK, principal encargada de la homeostasis energética de la célula (Ahn et al. 2012; Hurley 2005). En condiciones estables ambas se encuentran formando un complejo en el citoplasma y, cuando se induce un aumento intracelular de calcio la AMPK inmediatamente es transportada al núcleo y una parte de la CAMKK2 permanece citoplasmática mientras que otra se localiza a nivel de la membrana plasmática donde co-localiza con la actina (Green et al. 2011). En *S. pombe* se ha descrito que la AMPK *Ssp2* es fosforilada en la T189 por la CAMKK *Ssp1*, en respuesta a privación tanto de glucosa como de nitrógeno, y que esta fosforilación le permite localizarse en el núcleo donde activa la acumulación del factor de transcripción *Ste11*, activando la respuesta celular ya sea provocando una parada en G₁ o la conjugación de la célula y entrada en meiosis, si hay una célula del sexo opuesto (Valbuena & Moreno 2012). La función de la CAMKK *Ssp1*, aunque responde tanto a bajas concentraciones de glucosa como a privación de nitrógeno solo es esencial para la respuesta a bajas concentraciones de glucosa. Esto nos lleva

a pensar que quizás en respuesta a privación de nitrógeno sea Ckk2 la CAMKK con más relevancia, tal como observamos en el alto índice de septación que se mantiene en $\Delta ckk2$ en estas condiciones. Sin embargo, existen otras posibilidades. Recientemente el trabajo de Davie et al. 2015 muestra un aumento en el nivel de fosforilación de Ssp2 dependiente de Ckk2 en privación de nitrógeno. El mismo estudio demuestra que Ckk2 no fosforila a Ssp2 directamente, y sugieren que Ckk2 podría regular Ssp2 a través de una fosfatasa; aunque no identifican la fosfatasa. Nosotros hemos encontrado que la fosfatasa Pzh1 se encuentra fosforilada en el análisis de fosfopéptidos como parte de la identificación de nuevos sustratos de Ckk2, y además Ckk2 fosforila a Pzh1, *in vitro*, esta fosfatasa muestra homología con las fosfatasas responsables de la regulación de la AMPK en mamíferos. Por tanto, es posible pensar que Ckk2 se encargaría de fosforilar y regular a la fosfatasa Pzh1, quien a su vez regularía los niveles de fosforilación de la AMPK Ssp2 en estrés por nitrógeno?

Ckk2 es modificada post-traduccionalmente en respuesta a privación de nutrientes

Nuestros resultados han revelado que Ckk2 es regulada a nivel post-traducciona. La modificación se observa discretamente durante las primeras horas de privación y es totalmente visible a las 24 horas (Figuras 32 y 36). La modificación post-traducciona respondería a una estabilización de la proteínas o en el caso inverso, la modificación permite la estabilización de la proteína. Dado el tipo de modificación que observamos, un aumento del peso molecular de Ckk2 de unos 10 kDa aproximadamente, pensamos que esta modificación correspondería a una mono-ubiquitinación, sin embargo no pudimos detectar la ubiquitina por lo que descartamos la ubiquitinización de Ckk2 en condiciones de privación de nutrientes. Simultáneamente pensamos que podría tratarse de una modificación por sumo, inicialmente utilizamos diferentes anticuerpos anti sumo, y no obtuvimos ninguna señal. Esto podría indicarnos que nuestra proteína no es sumoilada o quizás estos anticuerpos no reconocen la proteína sumo de *S. pombe* Pmt3. En la bibliografía observamos que para detectar Pmt3 se habían desarrollado anticuerpos específicos para la proteína o se trabajaba con la proteína marcada con un epítipo (Tanaka et al. 1999; Ho et al. 2001; Xhemalce et al. 2007). Por tanto nos inclinamos a pensar que los anticuerpos que habíamos utilizado no son capaces de reconocer la proteína Pmt3 y decidimos analizar

la proteína Ckk2 en un fondo genético donde el gen *pmt3* se encuentre deletado ($\Delta pmt3$). Efectivamente de acuerdo a nuestras sospechas la banda correspondiente a la modificación post-traducciona de Ckk2 desaparece en el mutante $\Delta pmt3$. Por tanto Ckk2 es sumoila da en respuesta a deprivación de nutrientes (figuras 32 y 36).

Ckk2 es sumoila da en respuesta a deprivación de nutrientes

Ckk2 es sumoila da en las fases tardía de la respuesta a deprivación de nutrientes. Las modificaciones por sumo pueden alterar la actividad de una proteína regulando positiva o negativamente su interacción con otras proteínas, DNA y otras macromoléculas; su localización, y/o estabilidad (Geiss-Friedlander & Melchior 2007). ¿Cuál es el destino de la proteína Ckk2-sumoila da? Es presumible pensar que la sumoila ción favorezca la estabilidad de Ckk2, o que la estabilización de la proteína favorezca la sumoila ción. Independientemente de cual sea el mecanismo.

El análisis de la secuencia proteica de Ckk2 nos indicó una probable lisina de sumoila ción (Beauclair et al. 2015; Zhao et al. 2014), la K202. La K202 se encuentra justo después del bucle catalítico de la quinasa; además a través de un alineamiento de secuencia con las CAMKKs de mamíferos esta lisina se encuentra conservada. En un análisis masivo de identificación de proteínas ubiquitinadas en el proteoma humano, se describe que esta lisina conservada, la K314 de la CAMKK2 es modificada por ubiquitina (Kim et al. 2011). Se ha descrito que en algunos casos sumo y ubiquitina podrían tener roles opuestos, donde la sumoila ción protege la proteína de degradación ocupando la misma lisina necesaria para la degradación por ubiquitina (Miteva et al. 2010). Podríamos hablar entonces de un *crossstalk* de ambas vías en Ckk2? Actualmente no tenemos resultados que respondan esta pregunta. Una posible explicación de la sumoila ción de la proteína Ckk2 sería que, en condiciones ricas de nutrientes la proteína se requiera a niveles muy bajos (explicando los niveles observado en los puntos 0), y cuando las condiciones en el medio cambian se requiera de la función de Ckk2, donde la sumoila ción favorezca su estabilidad y consecuente acumulación.

La acumulación de la proteína Ckk2 resulta entonces importante para el establecimiento de la respuesta a deprivación de nutrientes. Sin embargo no sabemos cuál es la función de Ckk2, si es a nivel de pared y/o citoesqueleto para permitir los cambios en la estructura de la célula en

respuesta a privación, o iniciando la señalización molecular para llevar a cabo cambios a nivel transcripcional.

5. Identificación de nuevos sustratos de la quinasa Ckk2

Quisimos evaluar si Ckk2 podría tener otros sustratos además de Cmk1; para ello realizamos un análisis de fosfopéptidos en condiciones de estrés por Ca^{2+} , situación en la que sabíamos que Ckk2 es activa. Del análisis encontramos que las proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto (Spc7, Arc1, Ppk38, Atb2, Myo 52, Act1, End3, Ppk30, etc) se encuentran representadas además de aquellas mediadoras del transporte vesicular (Fab1, Sec5, Sec72, Sif1, Sec231, Psh3, Yop1, etc) y un gran número de proteínas que regulan el ciclo celular (Nod1, Rpn2, Bub1, Pof1, Sep1, Alp7, Zfs1, etc). Esto indicaría algún tipo de regulación a nivel de ciclo celular en respuesta al estrés y de las modificaciones que a nivel del citoesqueleto se requieran, donde probablemente la quinasa Ckk2 estuviera implicada, pues está descrito que quinasas de esta familia están implicadas en la remodelación del citoesqueleto en mamíferos (Saneyoshi et al. 2008), además de promover cambios morfológicos inducidos por estímulos externos (Ciani & Salinas 2008).

105

Identificamos aproximadamente 100 proteínas que se derivan de la actividad de Ckk2 en respuesta a Ca^{2+} , es decir que se encontraron fosforiladas en la cepa *wild type* y no en la cepa $\Delta ckk2$. De estas proteínas encontramos que Ckk2 es capaz de fosforilar *in vitro* a la fosfatasa Pzh1, la quinasa Gad8, la proteína reguladora de microtúbulos Tip1, la proteína organizadora del anillo contráctil y promotora de la división celular Mid2; la proteína implicada en la formación del septo, Sif1; la quinasa NDR implicada en la constricción del anillo de actomiosina, Sid2; y las proteínas implicadas en la polaridad de la célula Sts5 y Shk1.

Ckk2 y Pzh1

La fosfatasa Pzh1 es una serina treonina fosfatasa, que presenta un dominio denominado *calcineurin like motif*, además muestra homología con las fosfatasas PP1A y PP2C de 68 %y 42% respectivamente y es 72% idéntica a sus homólogas PPZ1 y PPZ2 en *Saccharomyces cerevisiae*, que son necesarias para el mantenimiento de la integridad celular (Balcells et al.

1997). La sensibilidad del mutante $\Delta pzh1$ por el ion K^+ a diferencia de sus homólogos en *S. cerevisiae* parecen indicar que las funciones entre estas fosfatasa no son exactamente las mismas. Pzh1 está implicada en la regulación de la homeostasis iónica, sin embargo a día de hoy no se ha determinado un rol específico de la fosfatasa Pzh1 en *S. pombe* (Balcells et al. 1999). Nuestros resultados del análisis de viabilidad muestran que el mutante $\Delta pzh1$ es resistente a calcio; fenotipo que presenta el mutante $\Delta cck2$, por tanto es presumible pensar que Pzh1 medie la respuesta de Cck2 en respuesta a Ca^{2+} además de Cmk1, y/o la respuesta a otro tipo de estrés.

Cck2 y Gad8

Gad8 es una S/T quinasa perteneciente a la familia de las AGC quinasa, el único mediador hasta ahora descrito del complejo TORC2, siendo fosforilado/activado por la quinasa Tor1 en las S527 y S546 (Matsuo et al. 2003; Hálová et al. 2013). TORC2 regula el crecimiento bajo condiciones de estrés y la respuesta a privación de nitrógeno (Kawai et al. 2001; Weisman & Choder 2001). Gad8 es regulada además por la quinasa Ksg1. Ksg1 es una PDK quinasa que fosforila Gad8 en la T387 del bucle de activación cuando es sometida a condiciones de privación de nitrógeno. Gad8 fosforila a su vez a Tor1 en la T1972, produciendo un descenso en la actividad de Tor1, permitiendo la diferenciación. Además Gad8 y la vía de TORC2 son necesarios para la distribución de la proteína Ght5, un transportador de glucosa, hacia la membrana plasmática como respuesta a condiciones de privación de glucosa (Saitoh et al. 2014). En un análisis de delección de quinasa (Bimbo et al. 2005) se encontró que el crecimiento del mutante $\Delta gad8$ se ve afectado por tiabendazol, y latrunculina (al igual que el mutante $\Delta cck2$); además este mutante muestra un crecimiento bipolar en un 50% de sus células (Koyano et al. 2010) al igual que el mutante $\Delta cck2$. Este trabajo sugeriría que Cck2 y Gad8 probablemente actúen como reguladores negativos de NETO (*New End Take Off*). En conjunto estos estudios sugieren alguna relación entre la quinasa Cck2 y Gad8. Además en el trabajo de Hálová et al. 2013, encuentran que la proteína Gad8 se halla fuertemente fosforilada en condiciones de privación de nitrógeno y que debe presentar otros sitios de fosforilación diferentes a los ya descritos que regulen la actividad Gad8 como podría ser la T385 que hemos encontrado.

Ckk2 y Tip1

Tip1 es una proteína necesaria para guiar el crecimiento de los microtúbulos hacia la zona en los extremos de las células para que estos puedan depositar la proteína marcadora Tea1 (Brunner & Nurse 2000). Tip1, Tea2 y Mal3 (promotor general del crecimiento de los microtúbulos) (Busch et al 2004), son tres proteínas que regulan la dinámica de los microtúbulos y la polaridad celular transportando los factores de polaridad hacia el extremo de la célula (Akhmanova & Steinmetz 2008). Tea4 une Tea1 y Formina 3, que promueve el crecimiento polarizado y la polimerización de actina (Feierbach et al. 2004). Se ha descrito una función de la fosfatasa calcineurina en la regulación del crecimiento polarizado dependiente de las proteínas TIP. Donde se señala que una perturbación en el ADN activaría a Cds1, la proteína sensora de daño al ADN, que activa a calcineurina quien una vez activa, de-fosforila a Tip1 en la S82 (Kume et al. 2011). La de-fosforilación de Tip1 es esencial para el retraso en NETO, acompañado de una reducción en la dinámica de los microtúbulos y una acumulación anormal de Tea1. NETO, es el momento en que las células abandonan el crecimiento monopolar para empezar el crecimiento en el nuevo extremo creado por el septo. Para que NETO tenga lugar es necesario que la replicación se haya finalizado con éxito y que se alcance el tamaño celular adecuado. A pesar de conocer muchas moléculas necesarias para NETO las vías de señalización que la gobiernan aún se desconocen. Nosotros hemos encontrado que la proteína Tip1 se encuentra fosforilada en condiciones de estrés por Ca^{2+} y que la fosforilación depende de Ckk2 *in vitro*. En el trabajo de Koyano et al. 2010 se sugirió que Ckk2 (Ppk34) estaría implicada en la regulación negativa de NETO pues presenta un número elevado de células bipolares. La fosforilación de Tip1 en la S82 es importante para el establecimiento de NETO, nosotros observamos que Ckk2 fosforila Tip1 y dado que Ckk2 es un posible regulador negativo de NETO, podríamos pensar que la fosforilación de la Tip1 es una fosforilación inhibidora sobre Tip1 y su actividad promotora de NETO.

Ckk2 Y Mid2

En *S. pombe*, como parte final de la citocinesis, se inicia la septación al final de la anafase. Una vez que la pared celular está terminada y después que las membranas celulares se cierran, la digestión del septo primario permite la separación entre las dos células. Mid2 es una proteína

organizadora de septinas, que se localiza en el sitio de división celular, siendo necesaria para la eficiente separación célula-célula durante la citocinesis. Además Mid2 es necesaria para mantener la estabilidad e integridad de las septinas durante el cierre del anillo contráctil (Berlin et al. 2003). Mid 2 y las septinas constituyen una vía, probablemente paralela a muchas otras, que se encarga de asegurar que la citocinesis, la septación y la separación célula-célula concluyan satisfactoriamente (Wu et al. 2010). Así mismo septinas, Mid2 y *Exocyst* (complejo proteico encargado del transporte vesicular) son necesarios para la correcta localización de las enzimas responsables de la hidrolisis del septo durante la citocinesis (Berlin et al. 2003; Martín-Cuadrado et al. 2005). El mutante $\Delta mid2$ tiene un problema en la separación célula-célula alcanzando un índice de septación de 66% en condiciones de crecimiento exponencial (Berlin et al. 2003). Al igual que los mutantes de las septinas, que presentan un defecto en la citocinesis, se han descrito otros mutantes como calcineurina (*ppb1*) (Yoshida et al. 1994), el factor de transcripción *sep1*, la MAPK *Pmk1*, la fosfatasa de MAPK *Pmp1*; curiosamente algunos se encuentran entre los sustratos derivados de la actividad de *Ckk2*. La sobreexpresión de Mid2 favorece la persistencia de la organización del anillo, y previene la mitosis; entonces la desestabilización del anillo y consecuente citocinesis se produce por un descenso en la actividad de Mid2 (Tasto et al. 2003). Nosotros encontramos que la proteína Mid2 es fosforilada por la CAMKK *Ckk2*, esta fosforilación podría constituir algún tipo de regulación de la actividad de Mid2 por parte de *Ckk2*. La actividad de *Ckk2* permitiría la estabilidad de las septinas y del anillo contráctil, inhibiendo de manera indirecta la entrada en mitosis. Por tanto en ausencia de *Ckk2*, Mid2 no se encuentra activa para regular la actividad de las septinas y se produciría un retraso en la citocinesis como el que observamos en el mutante $\Delta ckk2$ en condiciones de privación de glucosa y nitrógeno.

Ckk2 y Sif1

En un cribado para identificar proteínas que interaccionan con *Sad1*, una proteína del huso acromático, se describe a *sif1*, (*Sad1- interacting factor*), una proteína necesaria para la adecuada formación del septo (Miki et al. 2004) y también se ha implicado en el transporte celular (Chen et al. 2014). Además se ha descrito que el mutante $\Delta sif1$ es muy sensible a calcofluor. *Sif1* es una proteína unida a la membrana y se acumula cerca del

sitio de septación; además la sobreexpresión de Sif1 provoca una prematura entrada en mitosis y formación del septo, mostrando unas células 22% más pequeñas que las células *wild type*, es presumible pensar que Sif1 participe en el control del ciclo celular (Miki et al. 2004). Sif1 es fosforilada por Ckk2 *in vitro*, por lo que Ckk2 podría regular la función de Sif1. En cualquier caso, es cada vez más indicativo la posible función de Ckk2 en el proceso de citocinesis.

Ckk2 y Sid2

Sid2 es una quinasa NDR que forma parte de las AGC quinastas, y componente de SIN (*Septation Initiation Network*), que determina la sincronización de la constricción del anillo contráctil (Balasubramanian et al. 1998; Sparks et al. 1999). La vía de SIN activa la constricción del anillo de actomiosina y la septación después de la segregación cromosómica, siendo Sid2 la última quinasa de la vía. Sid2 forma un complejo con la proteína Mob1 que es esencial para su localización y actividad, la unión Sid2-Mob1 es necesaria pero no suficiente para activar Sid2, por tanto otros mecanismos regularían la actividad de Sid2 (Hou et al. 2004). La fosforilación en las S402 y T578 son importantes en la regulación de la actividad de Sid2, puesto que la mutación de ambos residuos reduce la actividad de la quinasa en 40% (Hou et al. 2004). La quinasa Plo1 regula la transcripción durante la fase G1-M, regulando la expresión de Sid2 y otros genes importantes para la citocinesis (Anderson et al. 2002). Sid2 tiene múltiples sustratos (Chen et al. 2008; Grallert et al. 2015; Gupta et al. 2014; Ray et al. 2010), y además el complejo Sid2-Mob1 fosforila a Cdc11 un componente *upstream* de Sid2 estableciendo una retroalimentación positiva de SIN (Feoktistova et al. 2012). Ckk2 fosforila a Sid2 *in vitro*, no se conoce si la quinasa Sid2 presenta otro tipo de regulación diferente de la descrita (revisado en Hergovich et al. 2006), también desconocemos el probable efecto de la fosforilación de Sid2 por Ckk2.

Ckk2 y Sts5 (Orb4)

Sts5 es una proteína esencial para la polaridad de la célula, y el crecimiento polarizado durante la interfase (Toda et al. 1996). El mutante *sts5-7* fue aislado debido a su sensibilidad al inhibidor de quinastas estaurosporina (Tamaoki et al. 1986; Toda et al. 1991), presenta una forma esférica, debido a la pérdida de la polaridad de la actina, características

compartidas con la fosfatasa Ppe1, este fenotipo es suprimido por una mutación en la CAMKK Ssp1. Se ha propuesto que el crecimiento polarizado y la localización cortical de la actina están regulados por dos mecanismos opuestos, uno la vía de Ssp1 que estimula la relocalización de la actina, y la otra que incluye a Sts5 y Ppe1 encargadas de fijar la localización de actina y el crecimiento polarizado (Matsusaka et al. 1995). Cuando la célula termina la replicación del DNA y alcanza el tamaño adecuado, debido al crecimiento hasta ese momento monopolar, los parches de actina se relocalizan hacia el nuevo extremo de la célula, entonces la actina se encuentran en ambos extremos de la célula y se inicia el crecimiento bipolar. Sts5 se encargaría entonces de fijar los parches de actina hasta recibir alguna señal para que estos puedan ser relocalizados en el otro extremo de la célula por Ssp1. Ckk2 fosforila a Sts5 *in vitro*, podría Ckk2 promover la fijación de los parches de actina en el extremo ya existente de la célula a través de la fosforilación de Sts5, regulando de esta manera negativamente NETO, así como se ha sugerido previamente (Koyano et al. 2010). Por otra parte, el mutante *sts5* es sensible a ciclosporina una droga inhibidora de la fosfatasa calcineurina sugiriendo que estos genes compartan alguna función (Yoshida et al. 1994), reforzando el hecho que calcineurina y Ckk2 funcionen en la misma vía.

Ckk2 y Shk1 (Orb2/Pak1)

Shk1 es el efector de la vía de la GtPasa Ras1-Cdc42, responsable del mantenimiento de la polaridad celular así como la respuesta de apareamiento (Marcus et al. 1995; Ottilie et al. 1995; Chang et al. 1994; Gilbreth et al. 1996). El mutante termosensible de Shk1 (*orb2-34*) muestra un crecimiento monopolar, igual que el mutante $\Delta tea1$ sugiriendo que Tea1 podría ser una diana de Shk1, y demostrándose que ambas proteínas participan en la polaridad de la célula (Kim et al. 2003). Por otra parte Shk1 ha sido implicada en la citocinesis (Ottilie et al. 1995; Kim et al. 2003). Se localiza en los extremos de la célula y en el sitio de división celular (Qyang et al. 2002) donde fosforila a la cadena ligera de la miosina Rlc1 inhibiendo la constricción del anillo de actomiosina y con ello la formación del septo, e inhibiendo la progresión de la mitosis, hasta que la segregación del material genético haya finalizado (Loo & Balasubramanian 2008). La función de Shk1 está regulada por Skb1 (Gilbreth et al. 1998; Gilbreth et al. 1996) Skb5 (Yang et al. 1999) y Scd2 (Chang et al. 1999), y regulada negativamente por la proteína Skb15 (Kim et al. 2001). La defosforilación de Shk1 por la fosfatasa

Clip1 promovería su relocalización y/o inactivación permitiendo la progresión de la citocinesis. Ckk2 fosforila a Shk1 *in vitro* esta fosforilación no ha sido previamente descrita, podría tratarse de algún tipo de regulación que regula la entrada en mitosis?

Futuros experimentos se tendrán que realizar para poder comprobar *in vivo* la regulación de estos nuevos substratos por parte de Ckk2, y así poder caracterizar mejor esta nueva CAMKK en *S. pombe*.

CONCLUSIONES

1. Ckk2 es una quinasa de unión a calmodulina y su actividad es dependiente del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.
2. Ckk2 es la quinasa responsable de fosforilar *in vivo* a la quinasa Cmk1 en la T192 del bucle de activación, estableciéndose la cascada de las CaMKs en *Schizosaccharomyces pombe*.
3. Ckk2 es esencial para la respuesta a agentes que modifican el citoesqueleto de tubulina y actina, como el tiabendazol y la latrunculina A, respectivamente.
4. La ausencia de Ckk2 confiere resistencia frente a agentes que afectan la pared celular como el calcofluor.
5. La ausencia de Ckk2 aumenta el índice de septación influyendo sobre el ciclo celular en condiciones de estrés nutricional.
6. La privación de nutrientes aumenta la transcripción de *ckk2*, y se refleja en un aumento a nivel proteico.
7. Ckk2 es sumoilada en respuesta a privación de nutrientes.
8. El inhibidor de la fosfatasa calcineurina, FK506, compromete la viabilidad celular del mutante Δckk2 .
9. Se han identificado proteínas fosforiladas *in vivo* dependientes de Ckk2 a través del análisis de fosfopéptidos. De las proteínas identificadas en la organización y regulación del citoesqueleto (Alp7, Spc7, Arc1, Ppk38, Atb2, Myo52, Act1, End3, Ppk30, etc), el transporte vesicular (Fab1, Sec5, Sec72, Sif1, Sec231, Psh3, Yop1, etc) y la respuesta nutricional a través de la vía TOR (Gad8, Oca2).
10. La quinasa Ckk2 fosforila directamente a las proteínas Tip1, Mid2, Sid2, Pzh1, Gad8, Sif1, Sts5 y Shk1 a través de un ensayo quinasa *in vitro* y en respuesta a Ca^{2+} .
11. A partir de sustratos descritos de las CAMKKs, hemos definido un consenso de fosforilación para las CAMKK: $\Phi\text{LXTXCG}[\text{T/S}]\text{PXY}$. Este

consenso de fosforilación se encuentra en el bucle de activación general de las serina/treonina quinasas localizado entre el subdominio VII y VIII de la región catalítica.

12. Algunos de los sustratos de Ckk2 identificados (Kin1, Sck2, Sid2, Shk1, Oca2, Pck2, Sck1, Gad8, Plo1 y Ppk1) presentan el consenso de fosforilación de Ckk2

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, Y.-J. et al., 2012. AMP-activated protein kinase: implications on ischemic diseases. *BMB reports*, 45(9), pp.489–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010169>.
- Akhmanova, A. & Steinmetz, M.O., 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(4), pp.309–322.
- Aleman, V. et al., 2002. Cmk2, a novel serine/threonine kinase in fission yeast. *FEBS Letters*, 524(1-3), pp.79–86.
- Alfa, C. et al., 1993. *Experiments with fission yeast: A laboratory course manual*, Plainview, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Anderson, K. a et al., 1998. Components of a Calmodulin-dependent Protein Kinase Cascade fore controlled at the level of CaMKIV rather than. *Biochemistry*, 273(48), pp.31880–31889.
- Anderson, K.A. et al., 2012. Deletion of CaMKK2 from the liver lowers blood glucose and improves whole-body glucose tolerance in the mouse. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(2), pp.281–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3275166&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 21, 2015].
- Anderson, M. et al., 2002. plo1+ regulates gene transcription at the M-G1 interval during the fission yeast mitotic cell cycle. *EMBO Journal*, 21(21), pp.5745–5755.
- Balasubramanian, M.K. et al., 1998. Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics*, 149(3), pp.1265–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1460233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2015].
- Balcells, L. et al., 1997. Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 250(2), pp.476–483.
- Balcells, L. et al., 1999. The Schizosaccharomyces pombe Pzh1 protein phosphatase regulates Na⁺ ion influx in a Trk1-independent fashion.

European Journal of Biochemistry, 260(1), pp.31–37.

Beauclair, G. et al., 2015. Sequence analysis JASSA : a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs. *Bioinformatics*, pp.1–9.

Berlin, A., Paoletti, A. & Chang, F., 2003. Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *Journal of Cell Biology*, 160(7), pp.1083–1092.

Bilsland, E. et al., 2004. Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Molecular Microbiology*, 53(6), pp.1743–1756.

Bimbo, a et al., 2005. Systematic deletion analysis of fission yeast protein kinases. *Eukaryotic*, 4(4), pp.799–813. Available at: <http://ec.asm.org/cgi/content/abstract/4/4/799>.

Bracho-Valdés, I. et al., 2011. MTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life*, 63(10), pp.880–898.

120

Brunner, D. & Nurse, P., 2000. CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*, 102(5), pp.695–704.

Busch, K.E. et al., 2004. Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting Tip1p on microtubules. *Developmental Cell*, 6(6), pp.831–843.

Bush, A. et al., 1974. The Wall Structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology*, 81, pp.199–206. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/81/1/mic-81-1-199.pdf?expires=1445865462&id=id&accname=sgid026174&checksum=96A10B11D3FF2987567B29A120C5B8DD>.

Cadou, A. et al., 2013. The Kin1 kinase and the calcineurin phosphatase cooperate to link actin ring assembly and septum synthesis in fission yeast. *Biology of the Cell*, 105(3), pp.129–148.

Carbona, S. & Goff, X., 2006. Spatial regulation of cytokinesis by the Kin1 and Pom1 kinases in fission yeast. *Current Genetics*, 50(6), pp.377–391.

- La Carbona, S. et al., 2004. The protein kinase kin1 is required for cellular symmetry in fission yeast. *Biology of the Cell*, 96(2), pp.169–179. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050371>.
- Case, R.M. et al., 2007. Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium*, 42(4-5), pp.345–350.
- Chang, E. et al., 1999. Direct Binding and In Vivo Regulation of the Fission Yeast p21-Activated Kinase Shk1 by the SH3 Domain Protein Scd2. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), pp.8066–8074. Available at: <http://mcb.asm.org/content/19/12/8066.long> [Accessed November 2, 2015].
- Chang, E.C. et al., 1994. Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell*, 79(1), pp.131–141. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867494904065> [Accessed November 2, 2015].
- Chang, F. & Martin, S.G., 2009. Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(1), p.a001347. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2742080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chen, C.-T. et al., 2008. The SIN kinase Sid2 regulates cytoplasmic retention of the *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1. *Current biology : CB*, 18(20), pp.1594–9. Available at: <http://www.cell.com/article/S0960982208012414/fulltext> [Accessed November 1, 2015].
- Chen, J.-S. et al., 2014. Identification of New Players in Cell Division, DNA Damage Response, and Morphogenesis Through Construction of *Schizosaccharomyces pombe* Deletion Strains. *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, 5(March), pp.361–370. Available at: <http://g3journal.org/cgi/doi/10.1534/g3.114.015701>.
- Cheng, H. et al., 2002. Role of the Rab GTP-binding protein Ypt3 in the fission yeast exocytic pathway and its connection to calcineurin function. *Molecular biology of the cell*, 13(8), pp.2963–76. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=117955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 17, 2015].

- Ciani, L. & Salinas, P.C., 2008. From Neuronal Activity to the Actin Cytoskeleton: A Role for CaMKs and α -PIX in Spine Morphogenesis. *Neuron*, 57(1), pp.3–4.
- Cisneros-Barroso, E. et al., 2014. Negative feedback regulation of calcineurin-dependent Prz1 transcription factor by the CaMKK-CaMK1 axis in fission yeast. *Nucleic Acids Research*, 42(15), pp.9573–9587. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gku684>.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), pp.1047–1058.
- Cohen, A., Kupiec, M. & Weisman, R., 2014. Glucose activates TORC2-Gad8 protein via positive regulation of the cAMP/cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA) pathway and negative regulation of the Pmk1 protein-mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 289(31), pp.21727–21737.
- 122
- Daga, R.R., Bolaños, P. & Moreno, S., 2003. Regulated mRNA Stability of the Cdk Inhibitor Rum1 Links Nutrient Status to Cell Cycle Progression. *Current Biology*, 13(23), pp.2015–2024.
- Davie, E., Forte, G.M.A. & Petersen, J., 2015. Nitrogen Regulates AMPK to Control TORC1 Signaling. *Current Biology*, 25(4), pp.445–454. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982214016376>.
- Deng, L. et al., 2014. Dueling kinases regulate cell size at division through the SAD kinase Cdr2. *Current Biology*, 24(4), pp.428–433. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.009>.
- Dodd, A.N., Kudla, J. & Sanders, D., 2010. The language of calcium signaling. *Annual review of plant biology*, 61, pp.593–620.
- Drewes, G. & Nurse, P., 2003. The protein kinase kin1, the fission yeast orthologue of mammalian MARK/PAR-1, localises to new cell ends after mitosis and is important for bipolar growth. *FEBS Letters*, 554(1-2), pp.45–49.
- Feierbach, B., Verde, F. & Chang, F., 2004. Regulation of a formin complex by

the microtubule plus end protein tea1p. *Journal of Cell Biology*, 165(5), pp.697–707.

Feoktistova, a. et al., 2012. The fission yeast septation initiation network (SIN) kinase, Sid2, is required for SIN asymmetry and regulates the SIN scaffold, Cdc11. *Molecular Biology of the Cell*, 23(9), pp.1636–1645. Available at: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-09-0792>.

Freitag, S.I., Wong, J. & Young, P.G., 2014. Genetic and physical interaction of Ssp1 CaMKK and Rad24 14-3-3 during low pH and osmotic stress in fission yeast. *Open biology*, 4, p.130127. Available at: <http://www.readcube.com/articles/10.1098/rsob.130127>.

Fujita, M. et al., 2002. Genetic interaction between calcineurin and type 2 myosin and their involvement in the regulation of cytokinesis and chloride ion homeostasis in fission yeast. *Genetics*, 161(3), pp.971–981.

Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F., 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(12), pp.947–956.

Gilbreth, M. et al., 1998. Negative regulation of mitosis in fission yeast by the shk1 interacting protein skb1 and its human homolog, Skb1Hs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), pp.14781–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24526&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2015].

Gilbreth, M. et al., 1996. The highly conserved skb1 gene encodes a protein that interacts with Shk1, a fission yeast Ste20/PAK homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), pp.13802–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19432&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2015].

Gómez-Hierro, A. et al., 2015. Ssp1 CaMKK: a sensor of actin polarization that controls mitotic commitment through Srk1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE*. (en prensa)

Grallert, A. et al., 2015. The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1.

Nature Cell Biology, 14(7), pp.738–745. Available at: <http://www.nature.com/ncb/journal/v14/n7/full/ncb2514.html> \n <http://www.nature.com/ncb/journal/v14/n7/pdf/ncb2514.pdf>.

Green, M.F., Anderson, K. a. & Means, A.R., 2011. Characterization of the CaMKK β -AMPK signaling complex. *Cellular Signalling*, 23(12), pp.2005–2012.

Grun, C. et al., 2004. The structure of cell wall -glucan from fission yeast. *Glycobiology*, 15(3), pp.245–257. Available at: <http://www.glycob.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/glycob/cwi002>.

Gupta, D.R. et al., 2011. Complex Formation, Phosphorylation, and Localization of Protein Kinase A of *Schizosaccharomyces pombe* upon Glucose Starvation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(8), pp.1456–1465.

Gupta, S., Govindaraghavan, M. & McCollum, D., 2014. Cross Talk between NDR Kinase Pathways Coordinates Cytokinesis with Cell Separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 13(8), pp.1104–1112. Available at: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00129-14>.

124

Hálová, L. et al., 2013. Phosphorylation of the TOR ATP binding domain by AGC kinase constitutes a novel mode of TOR inhibition. *Journal of Cell Biology*, 203(4), pp.595–604.

Hanks, S.K., Quinn, a M. & Hunter, T., 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4861), pp.42–52.

Hanyu, Y. et al., 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), pp.539–554.

Hara, K. et al., 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110(2), pp.177–189.

Hergovich, A. et al., 2006. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(4), pp.253–264. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1891>.

- Hirayama, S. et al., 2003. Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), pp.18078–18084.
- Ho, J.C.Y. et al., 2001. SUMO modification of Rad22, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the recombination protein Rad52. *Nucleic acids research*, 29(20), pp.4179–4186.
- Hou, M.-C., Guertin, D. a & McCollum, D., 2004. Initiation of cytokinesis is controlled through multiple modes of regulation of the Sid2p-Mob1p kinase complex. *Molecular and cellular biology*, 24(8), pp.3262–76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=381652&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hurley, R.L., 2005. The Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 280(32), pp.29060–29066. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M503824200>.
- Ishiguro, J., 1998. Genetic control of fission yeast cell wall synthesis: the genes involved in wall biogenesis and their interactions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes & genetic systems*, 73(4), pp.181–191.
- Jacinto, E. et al., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology*, 6(11), pp.1122–1128.
- Jacinto, E. & Lorberg, A., 2008. TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *The Biochemical journal*, 410(1), pp.19–37.
- Karacosta, L.G. et al., 2012. A Regulatory Feedback Loop Between Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2 (CaMKK2) and the Androgen Receptor in Prostate Cancer Progression. *Journal of Biological Chemistry*, 287(29), pp.24832–24843.
- Kawai, M. et al., 2001. Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Current genetics*, 39(3), pp.166–174. Available at:

<http://link.springer.com/10.1007/s002940100198>.

Kazyken, D. et al., 2014. The nuclear import of ribosomal proteins is regulated by mTOR. *Oncotarget*, 5(20), pp.9577–9593.

Kim, D.H. et al., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), pp.163–175.

Kim, H. et al., 2001. Genetic and Molecular Characterization of Skb15, a Highly Conserved Inhibitor of the Fission Yeast PAK, Shk1. *Molecular Cell*, 7(5), pp.1095–1101. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276501002489> [Accessed November 2, 2015].

Kim, H. et al., 2003. The kelch repeat protein, Tea1, is a potential substrate target of the p21-activated kinase, Shk1, in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*, 278(32), pp.30074–82. Available at: <http://www.jbc.org/content/278/32/30074.abstract> [Accessed November 2, 2015].

Kim, W. et al., 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular Cell*, 44(2), pp.325–340. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.025>.

Kokubo, M. et al., 2009. BDNF-mediated cerebellar granule cell development is impaired in mice null for CaMKK2 or CaMKIV. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), pp.8901–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2763571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 21, 2015].

Koyano, T. et al., 2010. Search for kinases related to transition of growth polarity in fission yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(5), pp.1129–1133.

Kume, K. et al., 2011. Calcineurin ensures a link between the DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth. *Nature cell biology*, 13(3), pp.234–242. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2166>.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> [Accessed July 9, 2014].
- Lee, J.C. & Edelman, A.M., 1994. A protein activator of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase Ia. , 269(3), pp.2158–2164. Available at: <http://www.jbc.org/content/269/3/2158.abstract>.
- Levin, D.E. & Bishop, J.M., 1990. A putative protein kinase gene (kin1+) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), pp.8272–8276.
- Lin, F., Ribar, T.J. & Means, A.R., 2011. The Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase, CaMKK2, Inhibits Preadipocyte Differentiation. *Endocrinology*, 152(10), pp.3668–3679. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3176646&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 21, 2015].
- Liu, J. et al., 2015. Transcriptional profiling analysis of individual kinase-deletion strains of fission yeast in response to nitrogen starvation. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(3), pp.1067–1083. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00438-014-0966-6>.
- Loewith, R. et al., 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*, 10(3), pp.457–468.
- Loo, T.-H. & Balasubramanian, M., 2008. *Schizosaccharomyces pombe* Pak-related protein, Pak1p/Orb2p, phosphorylates myosin regulatory light chain to inhibit cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 183(5), pp.785–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2592837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- López-Avilés, S. et al., 2005. Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Molecular Cell*, 17(1), pp.49–59.
- Lu, Y. et al., 2002. Calcineurin is implicated in the regulation of the septation

initiation network in fission yeast. *Genes to Cells*, 7(10), pp.1009–1019.

- Marcus, S. et al., 1995. Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), pp.6180–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41666&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2015].
- Martin R. McAinsh and Jon K. Pittman, 2008. Shaping the calcium signature. *New Phytologist*, 181(2008), pp.275–294.
- Martin, S.G., 2009. Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends in Cell Biology*, 19(9), pp.447–454.
- Martín-Cuadrado, A.B. et al., 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(1), pp.4867–4881.
- Matsuo, T. et al., 2003. *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO journal*, 22(12), pp.3073–83. Available at: </pmc/articles/PMC162150/?report=abstract> [Accessed November 3, 2015].
- Matsusaka, T. et al., 1995. A novel protein kinase gene *ssp1+* is required for alteration of growth polarity and actin localization in fission yeast. *The EMBO journal*, 14(14), pp.3325–3338.
- Melcher, M.L. & Thorner, J., 1996. Identification and characterization of the CLK1 gene product, a novel CaM kinase-like protein kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), pp.29958–29968.
- Menon, S. & Manning, B.D., 2008. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27 Suppl 2(S2), pp.S43–S51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.352>.
- Miki, F. et al., 2004. Two-hybrid search for proteins that interact with Sad1 and Kms1, two membrane-bound components of the spindle pole body

- in fission yeast. *Molecular Genetics and Genomics*, 270(6), pp.449–461.
- Miteva, M. et al., 2010. CHAPTER 16 SUMOYLATION AS A SIGNAL FOR POLYUBIQUITYLATION AND PROTEASOMAL DEGRADATION © 2010 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution. © 2010 Copyright Landes Bioscience. Not fo. , pp.195–214.
- Mruk, K. et al., 2014. Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *The Journal of general physiology*, pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935744>.
- Mudge, D.K. et al., 2014. Sck1 negatively regulates Gpa2-mediated glucose signaling in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 13(2), pp.202–208.
- Naqvi, N.I. et al., 1999. Evidence for F-actin-dependent and -independent mechanisms involved in assembly and stability of the medial actomyosin ring in fission yeast. *Embo J*, 18(4), pp.854–862. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10022828 \nfile:///D:/StudyFile (060402-090331)/reference/Evidence for F-actin-dependent and -independent mechanisms involved in assembly and stability of the med.
- Nicholas, R.O., Williamst, D.W. & Hunteri, P.A., 1994. Investigation of the value of IJ-glucan-specific fluorochromes for predicting the IJ-glucan content of the cell walls of zoopathogenic fungi. *Mycological Research*, 98(6), pp.694–698. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80419-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80419-X).
- Ohya, Y. et al., 1991. Two yeast genes encoding calmodulin-dependent protein kinases: Isolation, sequencing, and bacterial expressions of CMK1 and CMK2. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), pp.12784–12794.
- Osumi, M. et al., 1998. Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal genetics and biology: FG & B*,

24(1-2), pp.178–206. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742201>.

Ottlie, S. et al., 1995. Fission yeast pak1+ encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *The EMBO journal*, 14(23), pp.5908–19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2015].

Pausch, M.H. et al., 1991. Multiple Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase genes in a unicellular eukaryote. *The EMBO journal*, 10(6), pp.1511–1522.

Pearce, L.R. et al., 2007. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *The Biochemical journal*, 405(3), pp.513–522.

Pelham, R.J. & Chang, F., 2001. Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature cell biology*, 3(3), pp.235–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11231572>.

130

Perl, A., 2015. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12756>.

Qyang, Y. et al., 2002. The p21-activated kinase, Shk1, is required for proper regulation of microtubule dynamics in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology*, 44(2), pp.325–34. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2002.02882.x> [Accessed November 2, 2015].

Racioppi, L. & Means, a. R., 2012. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2: Roles in Signaling and Pathophysiology. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp.31658–31665.

Rasmussen, C. & Rasmussen, G., 1994. Inhibition of G2/M progression in *Schizosaccharomyces pombe* by a mutant calmodulin kinase II with constitutive activity. *Molecular biology of the cell*, 5(7), pp.785–95. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=301096&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 28, 2015].

Rasmussen, C.D., 2000. Cloning of a calmodulin kinase I homologue from *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), pp.685–690.

Ray, S. et al., 2010. The mitosis-to-interphase transition is coordinated by cross talk between the SIN and MOR pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of cell biology*, 190(5), pp.793–805. Available at: <http://jcb.rupress.org.sire.ub.edu/content/190/5/793> [Accessed November 1, 2015].

Ribar, T.J. et al., 2000. Cerebellar defects in Ca²⁺/calmodulin kinase IV-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(22), p.RC107. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/20/22/RC107> \npapers2://publication/uuid/B562C3C9-898A-4ED0-8C49-2F2487D7C06F.

Rupes, I., Jia, Z. & Young, P.G., 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), pp.1495–1510.

Saitoh, S. et al., 2014. Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Molecular Biology of the Cell*, 26(2), pp.373–386. Available at: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E14-11-1503>.

Saitoh, S. & Yanagida, M., 2014. Does a shift to limited glucose activate checkpoint control in fission yeast? *FEBS Letters*, 588(15), pp.2373–2378. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.047>.

Sajiki, K. et al., 2013. Metabolomic analysis of fission yeast at the onset of nitrogen starvation. *Metabolites*, 3(4), pp.1118–29. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3937841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Sánchez-Piris, M. et al., 2002. The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), pp.17722–17727.

- Saneyoshi, T. et al., 2008. Activity-Dependent Synaptogenesis: Regulation by a CaM-Kinase Kinase/CaM-Kinase I/??PIX Signaling Complex. *Neuron*, 57(1), pp.94–107.
- Shen, X. et al., 2005. Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), pp.5969–5974.
- Simanis, V., 1995. The control of septum formation and cytokinesis in fission yeast. *Seminars in cell biology*, 6(2), pp.79–87.
- Sio, S.O. et al., 2005. The role of the regulatory subunit of fission yeast calcineurin for in vivo activity and its relevance to FK506 sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), pp.12231–12238.
- Skelding, K. a., Rostas, J. a P. & Verrills, N.M., 2011. Controlling the cell cycle: The role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle*, 10(4), pp.631–639.
- Smith, D. a. et al., 2002. The *Srk1* protein kinase is a target for the *Sty1* stress-activated MAPK in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp.33411–33421.
- Soderling, T.R., 1999. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends in biochemical sciences*, 24(6), pp.232–236.
- Soderling, T.R. & Stull, J.T., 2001. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chemical reviews*, 101(8), pp.2341–2352.
- Sparks, C.A., Mopthew, M. & McCollum, D., 1999. *Sid2p*, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 146(4), pp.777–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2156147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 31, 2015].
- Su, S.S. et al., 1996. A nitrogen starvation-induced dormant G0 state in fission yeast: the establishment from uncommitted G1 state and its delay for return to proliferation. *Journal of cell science*, 109 (Pt 6, pp.1347–1357.
- Swulius, M.T. & Waxham, M.N., 2008. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein

- kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(17), pp.2637–2657.
- Szewczyk, E. et al., 2007. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, 1(6), pp.3111–3120. Available at: <http://www.nature.com/sire.ub.edu/nprot/journal/v1/n6/full/nprot.2006.405.html> [Accessed October 1, 2015].
- Takeda, T. & Yamamoto, M., 1987. Analysis and in vivo disruption of the gene coding for calmodulin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(11), pp.3580–3584.
- Tamaoki, T. et al., 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135(2), pp.397–402. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X86900082> [Accessed November 2, 2015].
- Tanaka, K. et al., 1999. Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Molecular and cellular biology*, 19(12), pp.8660–8672.
- Tasto, J.J., Morrell, J.L. & Gould, K.L., 2003. An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *Journal of Cell Biology*, 160(7), pp.1093–1103.
- Teige, M. et al., 2001. Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), pp.5625–5630.
- Toda, T. et al., 1996. The fission yeast *sts5+* gene is required for maintenance of growth polarity and functionally interacts with protein kinase C and an osmosensing MAP-kinase pathway. *Journal of cell science*, 109 (Pt 9, pp.2331–2342.
- Toda, T., Shimanuki, M. & Yanagida, M., 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 FUSS and KSS1 kinases. *Yeast*, 2, pp.60–73.

- Tokumitsu, H. et al., 2001. Differential regulatory mechanism of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase isoforms. *Biochemistry*, 40(46), pp.13925–13932.
- Tokumitsu, H. et al., 2011. Generation of autonomous activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase beta by autophosphorylation. *Biochemistry*, 50(38), pp.8193–8201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859090>.
- Tokumitsu, H., Enslin, H. & Soderling, T.R., 1995. Characterization of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry*, 270(33), pp.19320–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642608>.
- Uritani, M. et al., 2006. Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes to Cells*, 11(12), pp.1367–1379.
- Valbuena, N. & Moreno, S., 2012. AMPK phosphorylation by Ssp1 is required for proper sexual differentiation in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 125(11), pp.2655–2664.
- Wang, Y. & Dasso, M., 2009. SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *Journal of cell science*, 122(Pt 23), pp.4249–4252.
- Weisman, R., 2010. *Fission yeast TOR and rapamycin* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1874-6047\(10\)27013-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1874-6047(10)27013-0).
- Weisman, R. et al., 2007. Opposite effects of Tor1 and Tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics*, 175(3), pp.1153–1162.
- Weisman, R. & Choder, M., 2001. The Fission Yeast TOR Homolog, tor1+, Is Required for the Response to Starvation and Other Stresses via a Conserved Serine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), pp.7027–7032. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M010446200>.
- Wen, L. et al., 2013. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β phosphorylation of Sirtuin 1 in endothelium is atheroprotective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, 110, pp.E2420–7. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3696824&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

White, R.R. et al., 1998. Definition of optimal substrate recognition motifs of Ca²⁺- calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), pp.3166–3172.

Wu, J.Q. et al., 2010. Cooperation between the septins and the actomyosin ring and role of a cell-integrity pathway during cell division in fission yeast. *Genetics*, 186(3), pp.897–915.

Xhemalce, B. et al., 2007. Role of SUMO in the dynamics of telomere maintenance in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104(3), pp.893–898. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1783410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Yada, T. et al., 2001. Its8, a fission yeast homolog of Mcd4 and Pig-n, is involved in GPI anchor synthesis and shares an essential function with calcineurin in cytokinesis. *The Journal of biological chemistry*, 276(17), pp.13579–86. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297516>.

Yang, P. et al., 1999. Direct Activation of the Fission Yeast PAK Shk1 by the Novel SH3 Domain Protein, Skb5. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), pp.36052–36057. Available at:
<http://www.jbc.org/content/274/51/36052.long> [Accessed November 2, 2015].

Yoshida, T., Toda, T. & Yanagida, M., 1994. A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *Journal of cell science*, 107 (Pt 7, pp.1725–1735.

Zhang, X. et al., 2014. CaMKIV-Dependent Preservation of mTOR Expression Is Required for Autophagy during Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Acute Kidney Injury. *The Journal of Immunology*, 193(5), pp.2405–2415. Available at:

<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1302798>.

Zhao, Q. et al., 2014. GPS-SUMO: A tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), pp.325–330.

ANEXO

Tabla A. Sustratos derivados de la actividad de Ckk2 en estrés por Ca²⁺

ID	gen	Descripción
SPBC32H8.12c	act1	act1
SPAC890.02c	alp7	Microtubule protein alp7
SPCC1919.03c	amk2	AMP-activated protein kinase beta subunit Amk2
SPAC23H3.06	apl6	AP-3 complex subunit beta
SPCC1672.06c	asp1	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase
SPBC29B5.01	atf1	transcription factor, Atf-CREB family Atf1
SPCC330.11	btb1	BTB/POZ domain-containing protein 1
SPCC1322.12c	bub1	Checkpoint serine/threonine-protein kinase bub1
SPAC23H4.09	cdb4	Curved DNA-binding protein
SPBC11B10.09	cdc2	Cell division control protein 2
SPBC32H8.10	cdk9	Serine/threonine-protein kinase cdk9
SPCC1450.11c	cek1	serine/threonine protein kinase Cek1
SPAC8C9.03	cgs1	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit
SPCC417.05c	chr2	Chitin synthase regulatory factor 2
SPAC24B11.10c	chr3	Chitin synthase regulatory factor 3
SPBC1289.01c	chr4	Chitin synthase regulatory factor 4 chr4
SPAC26A3.10	cnt6	Uncharacterized protein C26A3.10
SPBC146.12	coq6	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase coq6
SPAC1296.02	cox4	Cytochrome c oxidase subunit 4, mitochondrial
SPAC17A2.09c	csx1	RNA-binding post-transcriptional regulator csx1
SPBC24E9.06	cta3	Calcium-transporting ATPase 3
SPAC3A12.11c	cwf2	Pre-mRNA-splicing factor cwc2
SPBC13E7.01	cwf22	Pre-mRNA-splicing factor cwf22
SPAC9G1.06c	cyk3	Uncharacterized protein C9G1.06c
SPBC25D12.02c	dnt1	Nucleolar protein dnt1
SPBC11G11.02c	end3	Actin cytoskeleton-regulatory complex protein end3
SPBC3E7.01	fab1	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase fab1
SPAC15A10.16	fat1	Actin-interacting protein 3 homolog
SPAC19B12.05c	fcp1	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase
SPCC1235.05c	fft2	Uncharacterized ATP-dependent helicase fft2
SPAC17A5.16	ftp105	UPF0663 protein C17A5.16
SPCC24B10.07	gad8	AGC/AKT protein kinase Gad8
SPAPB1E7.05	gde1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase gde1
SPAC31A2.16	gef2	Rho guanine nucleotide exchange factor gef2

SPBC4B4.08	ght2	hexose transmembrane transporter Ght2
SPAC4F10.20	grx1	Glutaredoxin-1
SPAC26F1.09	Gyp51	TBC domain-containing protein C26F1.09
SPAC3G6.01	hrp3	Chromodomain helicase hrp3
SPAC4F8.07c	hvk2	hexokinase 2
SPCC1259.04	iec3	Uncharacterized protein C1259.04
SPAC23G3.04	ies4	Uncharacterized protein C23G3.04
SPBC26H8.04c	iml1	Vacuolar membrane-associated protein iml1
SPCC4B3.10c	ipk1	Inositol-pentakisphosphate 2-kinase
SPBC4F6.06	kin1	Protein kinase kin1
SPBC1685.15c	klp6	Kinesin-like protein 6
SPBC15D4.01c	klp9	Kinesin-like motor protein C15D4.01c
SPAC1D4.11c	lkh1	dual specificity protein kinase Lkh1
SPBC28E12.06c	lvs1	Beige protein homolog 1
SPAC1834.08	mak1	Peroxide stress-activated histidine kinase mak1
SPBC887.10	mcs4	Response regulator mcs4
SPAC27D7.03c	mei2	Meiosis protein mei2
SPBC1921.03c	mex67	mRNA export factor mex67
SPAPYUG7.03c	mid2	RecName: Full=Septin ring organizing protein mid2
SPBC530.04	mod5	Cell polarity protein mod5
SPBC32H8.13c	mok12	Cell wall alpha-1,3-glucan synthase mok12
SPBC1826.01c	mot1	Probable helicase mot1
SPAC23C11.03	mpp10	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein
SPBP19A11.03c	mts4	19S proteasome regulatory subunit Mts4
SPBC56F2.06	mug147	Meiotically up-regulated gene 147 protein
SPBC14F5.11c	mug186	Sorting nexin-41
SPCC645.05c	myo2	Myosin type-2 heavy chain 1
SPBC3F6.04c	nop14	Probable nucleolar complex protein 14
SPAC23D3.06c	nup146	Nucleoporin nup146
SPCC285.13c	nup60	Nucleoporin nup60
SPCC1020.10	oca2	Serine/threonine-protein kinase oca2
SPAC1783.07c	pap1	AP-1-like transcription factor
SPCC188.02	par1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta 1 isoform
SPBC12D12.04c	pck2	protein kinase C (PKC)-like Pck2
SPAC32A11.03c	phx1	Uncharacterized homeobox protein C32A11.03c
SPAC1687.05	pli1	E3 SUMO-protein ligase pli1
SPAC23C11.16	plo1	Polo kinase Plo1
SPAC17C9.08	pnu1	mitochondrial endodeoxyribonuclease

SPAC57A10.05c	pof1	F-box/WD repeat-containing protein pof1
SPBC776.02c	pp1	Pescadillo homolog
SPAC110.01	ppk1	Serine/threonine-protein kinase ppk1
SPBC6B1.02	ppk30	Serine/threonine-protein kinase ppk30
SPAC16C9.07	ppk5	Serine/threonine-protein kinase ppk5
SPCC74.02c	ppn1	mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex associated protein
SPBC119.13c	prp31	Pre-mRNA-processing factor 31
SPCC188.11	prp45	Pre-mRNA-processing protein 45
SPAC8C9.14	prr1	Transcription factor prr1
SPAC31G5.15	psd3	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 3
SPCC830.07c	psi1	Protein psi1
SPBC12C2.10c	pst1	Paired amphipathic helix protein pst1
SPBC1734.16c	pst3	Paired amphipathic helix protein pst3
SPBC609.02	Ptn1	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate3-phosphatase Ptn1
SPAC1687.22c	puf3	mRNA-binding protein puf3
SPAC57A7.08	pzh1	Serine/threonine-protein phosphatase PP-Z
SPCC737.02c	qcr7	Cytochrome b-c1 complex subunit 7
SPAC3G6.06c	rad2	DNA repair protein rad2
SPAC23C4.18c	rad4	S-M checkpoint control protein rad4
SPBC1921.02	rad60	DNA repair protein rad60
SPAC26A3.09c	rga2	Probable Rho-type GTPase-activating protein 2
SPBC28E12.03	rga4	Probable Rho-type GTPase-activating protein 4
SPBC354.13	rga6	Probable Rho-GTPase-activating protein 6
SPCC645.07	rgf1	Rho1 guanine nucleotide exchange factor 1
SPAC1006.06	rgf2	Rho1 guanine nucleotide exchange factor 2
SPAC3F10.06c	rit1	initiator methionine tRNA 2'-O-ribosyl phosphate transferase (predicted)
SPBC17D11.07c	rpn2	19Sproteasome regulatory subunit Rpn2 (predicted)
SPAC13G6.07c	rps6a	40S ribosomal protein S6-A
SPBC16C6.07c	rpt1	26S protease regulatory subunit 7 homolog
SPCC1183.07	rrp5	rRNA biogenesis protein rrp5
SPBC11B10.05c	rsp1	DnaJ-related protein rsp1
SPAC16E8.09	scd1	Rho guanine nucleotide exchange factor scd1
SPAC22E12.14c	sck2	Serine/threonine-protein kinase sck2
SPBC1D7.02c	scr1	DNA-binding protein scr1
SPCC320.10	scrp72	Signal recognition particle subunit srp72
SPAC29B12.07	sec16	COPII coat assembly protein sec16
SPAC17G8.12	sec3	Uncharacterized protein C17G8.12

SPCC622.10c	sec5	Exocyst complex component sec5
SPAC30.01c	sec72	Protein transport protein sec72
SPBC4C3.12	sep1	Forkhead protein sep1
SPCC364.07	ser3	D-3 phosphoglycerate dehydrogenase Ser3
SPBC336.07	sfc3	transcription factor, TFIII CcomplexB box binding subunit Sfc3
SPAC15A10.15	sgo2	Shugoshin-2
SPBC1604.14c	shk1	Serine/threonine-protein kinase shk1/pak1
SPAC24B11.11c	sid2	Serine/threonine-protein kinase sid2
SPCC1235.06	sif1	Sad1-interacting factor 1
SPAPYUG7.02c	sin1	stress activated MAP kinase interacting protein Sin1
SPAC3H1.12c	snt2	Lid2 complex component snt2
SPAC607.03c	snu13	13 kDa ribonucleoprotein-associated protein
SPCC1281.02c	spf30	Splicing factor spf30
SPAC1F3.06c	spo15	Sporulation-specific protein 15
SPCC188.06c	srp54	Signal recognition particle 54 kDa protein homolog
SPBC1652.01	stb3	Protein STB3 homolog
SPCC16C4.09	sts5	Protein sts5
SPAC664.01c	swi6	Chromatin-associated protein swi6
SPBC4C3.06	syp1	cytoskeletal protein Syp1 (predicted)
SPBC1706.01	tea4	Tip elongation aberrant protein Tea4
SPAC343.14c	tif222	translation initiation factor eIF-2B subunit beta
SPAC3C7.12	tip1	Tip elongation protein 1
SPCC1753.04	tol1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase
SPBC1703.14c	top1	DNA topoisomerase 1
SPAC328.03	tps1	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase
SPAC6B12.09	trm10	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase
SPAC10F6.08c	Unassigned	HMG box-containing protein C10F6.08c
SPAC1142.01	Unassigned	Uncharacterized protein C1142.01
SPAC11D3.16	Unassigned	Uncharacterized protein C11D3.15
SPAC11E3.11c	Unassigned	PH and SEC7 domain-containing protein C11E3.11c
SPAC13A11.06	Unassigned	Putative aminopeptidase C13A11.05
SPAC167.07c	Unassigned	Probable E3 ubiquitin protein ligase C167.07c
SPAC1687.10	Unassigned	Increased rDNA silencing protein 4
SPAC17A5.09c	Unassigned	Uncharacterized protein C17A5.09c
SPAC17G6.11c	Unassigned	Uncharacterized beta-glucan synthesis-associated protein C17G6.11c
SPAC1952.17c	Unassigned	TBC domain-containing protein C1952.17c
SPAC1F5.05c	Unassigned	Uncharacterized protein C1F5.05c

SPAC20G4.09	Unassigned	Uncharacterized protein C20G4.08
SPAC227.16	Unassigned	Uncharacterized protein C227.15
SPAC22A12.14c	Unassigned	BSD domain-containing protein C22A12.14c
SPAC22G7.01c	Unassigned	Uncharacterized peptidase C22G7.01c
SPAC23H4.16	Unassigned	Ribosome biogenesis protein tsr1 homolog
SPAC2F7.02c	Unassigned	Uncharacterized protein C2F7.02c
SPAC31A2.13	Unassigned	Arrestin domain-containing protein C31A2.12
SPAC3A11.10c	Unassigned	Uncharacterized dipeptidase C3A11.10c
SPAC3H8.03	Unassigned	CRAL-TRIO domain-containing protein C3H8.02
SPAC4F10.09c	Unassigned	Uncharacterized protein C4F10.09c
SPAC4G9.22	Unassigned	conserved fungal protein
SPAC521.04c	Unassigned	Putative cation exchanger C521.04c
SPAC644.13c	Unassigned	Protein YIP4
SPAC644.17	Unassigned	Uncharacterized RNA-binding protein C644.16
SPAC664.03	Unassigned	SPAC664.03 RNA polymerase II-associated protein 1 homolog
SPAC824.09c	Unassigned	Uncharacterized protein C824.09c
SPAC9G1.10c	Unassigned	Probable inositol polyphosphate 5-phosphatase C9G1.10c
SPAPB2C8.01	Unassigned	Putative cell agglutination protein PB2C8.01
SPAPB8E5.07c	Unassigned	Putative ribosomal RNA-processing protein 12
SPBC11C11.10	Unassigned	Probable tRNA pseudouridine synthase 4
SPBC13E7.08	Unassigned	Uncharacterized protein C13E7.07
SPBC146.01	Unassigned	Uncharacterized protein C146.01
SPBC15D4.09c	Unassigned	Probable cystathionine gamma-synthase
SPBC1685.06	Unassigned	PDZ domain-containing protein C1685.05
SPBC17D1.06	Unassigned	Uncharacterized protein C17D1.05
SPBC19C2.11	Unassigned	Uncharacterized protein C19C2.10
SPBC20F10.08	Unassigned	Uncharacterized membrane protein C20F10.07
SPBC23G7.06c	Unassigned	conserved eukaryotic protein
SPBC25B2.11	Unassigned	Universal stress protein A family protein C25B2.10
SPBC27B12.12c	Unassigned	Putative metal ion transporter C27B12.12c
SPBC29A3.09c	Unassigned	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein C29A3.09c
SPBC2A9.04c	Unassigned	Uncharacterized RING finger protein C2A9.04c
SPBC2D10.05	Unassigned	UPF0675 protein C2D10.04
SPBC2F12.03c	Unassigned	Uncharacterized serine-rich protein C2F12.03c
SPBC3D6.13c	Unassigned	Uncharacterized protein C3D6.13c
SPBC3H7.14	Unassigned	Uncharacterized protein C3H7.13
SPBC530.11c	Unassigned	Uncharacterized transcriptional regulatory protein

SPBC56F2.08c	Unassigned	Pumilio domain-containing protein C56F2.08c
SPBPJ4664.05	Unassigned	Putative coatomer subunit alpha
SPCC1281.06c	Unassigned	Probable acyl-CoA desaturase
SPCC1322.10	Unassigned	UPF0615 protein C1322.09
SPCC162.01c	Unassigned	U4/U6.U5tri-snRNP-associated protein 3-like protein
SPCC1620.09	Unassigned	Probable succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial
SPCC191.02	Unassigned	Schizosaccharomyces specific protein
SPCC24B10.06	Unassigned	Schizosaccharomyces specific protein, predicted GPI anchor
SPCC320.08	Unassigned	transmembrane transporter (predicted)
SPCC330.03c	Unassigned	NADPH-hemoprotein reductase (predicted)
SPCC4G3.12c	Unassigned	ubiquitin-protein ligase E3 (predicted)
SPAC607.07c	Unassigned	Uncharacterized protein C607.07c
SPCC613.01	Unassigned	transmembrane transporter (predicted)
SPCC970.08	Unassigned	inositol polyphosphate kinase (predicted)
SPCPB1C11.04	Unassigned	Uncharacterized transporter PB1C11.03
SPBC21C3.01c	vps13a	Vacuolar protein sorting-associated protein 13a
SPAC13F5.04c	vts1	Vps20 associated protein Vta1 (predicted)
SPBC409.07c	wis1	Protein kinase wis1
SPAC4F10.15c	wsp1	WASp homolog
SPBC405.06	xdj1	DnaJ protein homolog xdj1
SPAC637.04	ypp1	Putative cargo-transport protein ypp1
SPAC9E9.07c	ypt2	GTP-binding protein ypt2
SPBC1718.07c	zfs1	Zinc finger protein zfs1

Tabla B. Sustratos derivados de la actividad de Ckk2 en privación de nitrógeno.

ID	Gen	Descripción
SPBP4H10.15	aco2	aconitate hydratase/mitochondrial ribosomal protein subunit L21, fusion protein
SPAC6F12.10c	ade3	phosphoribosylformylglycinamide synthase Ade3
SPCC1322.13	ade6	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase Ade6
SPBC1289.10c	adn2	transcription factor predicted
SPBC1711.08	aha1	chaperone activator Aha1 (predicted)
SPAC890.02c	alp7	centrosomal transforming acidic coiled-coil (TACC) protein ortholog Alp7
SPBC14C8.06	arc1	ARP2/3 actin-organizing complex subunit Sop2
SPBC800.05c	atb2	tubulin alpha 2, alp2
SPCC962.06c	bpb1	zinc finger splicing factor Bpb1
SPCC970.03	cbr1	cytochrome b5 reductase Cbr1 (predicted)
SPBC337.05c	cct8	chaperonin-containing T-complex theta subunit Cct8
SPBC1289.01c	chr4	1,3-beta-glucan synthase regulatory factor Chf3/Chr4
SPBP35G2.05c	cki2	serine/threonine protein kinase Cki2
SPBC17G9.08c	csx2	gtpase activator activity/cnt5
SPBC1773.15	dal52	dipeptide transmembrane transporter Dal5h2 (predicted)
SPCC1919.09	tif6	translation initiation factor eIF3f
SPAC27D7.06	etf1	electron transfer flavoprotein alpha subunit EtfA (predicted)
SPBC2D10.05	exg3	lucan 1,3-beta-glucosidase Exg3
SPBC3E7.01	fab1	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase Fab1
SPAC11E3.13c	gas5	cell wall protein Gas5, 1,3-beta-glucanosyltransferase (predicted)
SPAC31G5.14	gcv1	glycine decarboxylase T subunit (predicted)
SPCC132.04c	gdh2	NAD-dependent glutamate dehydrogenase Gdh2 (predicted)
SPAC56E4.06c	ggt2	gamma-glutamyltranspeptidase Ggt2
SPBC26H8.08c	grn1	GTPase Grn1
SPAP7G5.02c	gua1	IMP dehydrogenase Gua1
SPCC1235.09	hif2	set3 complex subunit
SPBC31F10.14c	hip3	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
SPBC11B10.02c	his3	histidinol-phosphate aminotransferase imidazole acetol phosphate transaminase His3
SPAC2E12.02	hsf1	transcription factor Hsf1
SPBC646.09c	int6	eIF3e subunit Int6

SPAC1039.09	isp5	amino acid permease Isp5
SPAC9E9.03	leu2	3-isopropylmalate dehydratase Leu2 (predicted)
SPAC1F5.06	lhs1	ER heat shock protein Lsh1 (predicted)
SPAP7G5.04c	lys1	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase
SPAPB8E5.03	mae1	malic acid transport protein Mae1
SPAC13G7.06	met16	reductase
SPCC1906.01	mpg1	Mannose-1-phosphate guanyltransferase Mpg1
SPBC11G11.03	mrt4	mRNA turnover and ribosome assembly protein Mrt4
SPBC651.06	mug166	Schizosaccharomyces specific protein
SPCC1919.10c	myo52	myosin type V
SPAC10F6.08c	nht1	Ino80 complex HMG box subunit Nht1
SPAC12B10.10	nod1	medial cortical node Gef2-related protein
SPCC24B10.19c	nts1	Clr6 histone deacetylase complex subunit Nts1
SPCC285.13c	nup60	nucleoporin Nup60
SPBP8B7.11	nxt3	ubiquitin protease cofactor Glp1 (predicted), physical interaction with rpl30, sog2
SPCC1259.09c	pdx1	pyruvate dehydrogenase protein x component, Pdx1 (predicted)
SPAC22F8.04	pet1	phosphoenolpyruvate transmembrane transporter
SPCC663.03	pmd1	leptomycin transmembrane transporter Pmd1
SPBC609.05	pob3	FACT complex subunit Pob3
SPCP1E11.02	ppk38	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk38
SPAC821.11	pro1	gamma-glutamyl phosphate reductase Pro1 (predicted)
SPBC409.20c	psh3	ER chaperone SHR3 homologue Psh3
SPAC323.02c	pup2	20S proteasome complex subunit alpha 5, Pup2 (predicted)
SPCC63.12c	pup3	20S proteasome complex subunit beta 3, Pup3 (predicted)
SPAC869.10c	put4	proline specific plasma membrane permease Put4 (predicted)
SPBC713.04c	pwp2	U3 snoRNP-associated protein Utp1 (predicted)
SPAC17H9.09c	ras1	GTPase Ras1
SPCC757.09c	rnc1	RNA-binding protein that suppresses calcineurin deletion Rnc1
SPBC28F2.12	rpb1	RNA polymerase II large subunit Rpb1
SPCC74.05	rpl2702	60S ribosomal protein L27 (predicted)
SPAC3H5.10	rpl3202	60S ribosomal protein L32 (predicted)
SPAC637.10c	rpn10	19S proteasome regulatory subunit Rpn10
SPAPB8E5.02c	rpn502	19S proteasome regulatory subunit Rpn502
SPCC24B10.09	rps1702	40S ribosomal protein S17 (predicted)

SPBC23G7.12c	rpt6	19S proteasome regulatory subunit Rpt6 (predicted)
SPBC2A9.04c	san1	sir antagonist, ubiquitin-protein ligase E3
SPCC31H12.07	sec231	COPII cargo receptor subunit Sec23a (predicted)
SPAC22E12.19	snt1	Set3 complex subunit Snt1
SPAC1039.06	Unassigned	alanine racemase (predicted)
SPAC16E8.17c	Unassigned	succinate-CoA ligase alpha subunit (predicted)
SPAC1751.03	Unassigned	translation initiation factor eIF3m
SPAC24B11.12c	Unassigned	P.type ATPase
SPAC2F3.11	Unassigned	exopolyphosphatase (predicted)
SPAC323.07c	Unassigned	MatE family transmembrane transporter (predicted)
SPAC6B12.04c	Unassigned	2-aminoadipate transaminase (predicted)
SPAC6G10.09	Unassigned	alpha glucosidase I Gls1 (predicted)
SPAC869.03c	Unassigned	urea transmembrane transporter (predicted)
SPBC1105.01	Unassigned	RNA processing protein Rrp12-like (predicted)
SPBC1271.14	Unassigned	glutamate N-acetyltransferase (predicted)
SPBC17D11.08	Unassigned	WD repeat protein, DDB1 and CUL4-associated factor 7 (predicted)
SPBC32F12.12c	Unassigned	Golgi membrane protein involved in vesicle-mediated transport (predicted)
SPBC4.02c	Unassigned	conserved fungal protein
SPBC530.11c	Unassigned	transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type (predicted)
SPBC725.01	Unassigned	aspartate aminotransferase (predicted)
SPBC83.16c	Unassigned	conserved eukaryotic protein
SPBC8E4.03	Unassigned	agmatinase 2 (predicted)
SPCC1223.14	Unassigned	chorismate synthase (predicted)
SPCC1672.09	Unassigned	triglyceride lipase-cholesterol esterase (predicted)
SPCC1919.12c	Unassigned	metallopeptidase
SPCC4B3.03c	Unassigned	mitochondrial morphology protein (predicted)
SPCC613.07	Unassigned	snoRNA biogenesis protein (predicted)
SPCC965.13	Unassigned	pyridoxal family transmembrane transporter (predicted)
SPCC1020.02	spc7	NMS complex subunit
SPCC1393.02c	spt2	non-specific DNA binding protein Spt2 (predicted)
SPBC30B4.02c	sq51	R3H and G-patch domain Sqs1(predicted)
SPBC1604.20c	tea2	kinesin-like protein
SPBC27B12.13	tom40	mitochondrial TOM complex subunit Tom40 (predicted)
SPAP8A3.12c	tpp2	tripeptidyl-peptidase II Tpp2
SPBC16G5.08	trp4	phosphoribosylanthranilate transferase Trp4 (predicted)

SPAC6G10.05c	trs120	TRAPP complex subunit Trs120 (predicted)
SPAC23H4.15	tsr1	ribosome biogenesis protein Tsr1 (predicted)
SPBC9B6.04c	tuf1	mitochondrial translation elongation factor EF-Tu Tuf1
SPAC3F10.13	ucp6	UBA domain protein Ucp6 (protein deub)
SPBC365.14c	uge1	UDP-glucose 4-epimerase Uge1
SPAPB2B4.05	vm5a	V-type ATPase V1 subunit C (predicted)
SPAC16E8.07c	vph1	V-type ATPase V0 subunit a (predicted)
SPAC9E9.13	wos2	p23 homolog, predicted co-chaperone Wos2
SPCC830.08c	yop1	ER membrane protein DP1/Yop1
SPAC13A11.05	ysp2	eptidase family M17 cytoplasmic leucyl aminopeptidase yspII (LAP yspII)

ARTÍCULOS

Negative feedback regulation of calcineurin-dependent Prz1 transcription factor by the CaMKK-CaMK1 axis in fission yeast

Eugenia Cisneros-Barroso^{1,†}, Tula Yance-Chávez^{1,†}, Ayako Kito², Reiko Sugiura², Alba Gómez-Hierro¹, David Giménez-Zaragoza¹ and Rosa Alligue^{1,*}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona 08036, Catalunya, Spain and ²Laboratory of Molecular Pharmacogenomics, School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

Received January 7, 2014; Revised July 11, 2014; Accepted July 16, 2014

ABSTRACT

Calcium signals trigger the translocation of the Prz1 transcription factor from the cytoplasm to the nucleus. The process is regulated by the calcium-activated phosphatase calcineurin, which activates Prz1 thereby maintaining active transcription during calcium signalling. When calcium signalling ceases, Prz1 is inactivated by phosphorylation and exported to the cytoplasm. In budding yeast and mammalian cells, different kinases have been reported to counter calcineurin activity and regulate nuclear export. Here, we show that the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase Cmk1 is first phosphorylated and activated by the newly identified kinase CaMKK2 homologue, Ckk2, in response to Ca²⁺. Then, active Cmk1 binds, phosphorylates and inactivates Prz1 transcription activity whilst at the same time *cmk1* expression is enhanced by Prz1 in response to Ca²⁺. Furthermore, Cdc25 phosphatase is also phosphorylated by Cmk1, inducing cell cycle arrest in response to an increase in Ca²⁺. Moreover, *cmk1* deletion shows a high tolerance to chronic exposure to Ca²⁺, due to the lack of cell cycle inhibition and elevated Prz1 activity. This work reveals that Cmk1 kinase activated by the newly identified Ckk2 counteracts calcineurin function by negatively regulating Prz1 activity which in turn is involved in activating *cmk1* gene transcription. These results are the first insights into Cmk1 and Ckk2 function in *Schizosaccharomyces pombe*.

INTRODUCTION

Calcium is a secondary messenger that is involved in the regulation of nearly every aspect of cellular life. Calcium signalling is first decoded by the EF-hand family of proteins, which is characterised by the presence of a helix-loop-helix Ca²⁺ binding domain. Calmodulin (CaM) is a small ubiquitous adaptor protein that belongs to the EF-hand family. In CaM, conformational change is driven by Ca²⁺-binding to its four EF-hands, and thereby triggering the capacity of CaM to interact with different proteins, including the Ca²⁺/CaM-dependent kinase (CaMKK) family of proteins and phosphatase calcineurin (1).

The Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase family is involved in many cellular responses that are triggered by elevated intracellular Ca²⁺ concentrations (2). The family includes CaMKI, a monomeric kinase that is activated by Ca²⁺/CaM, and also by phosphorylation. Like most other Ser/Thr protein kinases, CaMKI has an 'activation loop' phosphorylation site (T174 to T180, depending on the mammalian isoforms) (3,4). When Ca²⁺/CaM binds to CaMKI the activation loop site is exposed, enabling phosphorylation by the upstream Ca²⁺/CaMKK when it is simultaneously activated by Ca²⁺/CaM (4,5). Thus, CaMKK/CaMK signalling cascades are regulated at multiple levels by Ca²⁺/CaM (6–8).

In *Schizosaccharomyces pombe*, Cmk1 has been identified as a member of the CaM-dependent protein kinase cascade (9). The *cmk1* gene encodes a 335-amino acid protein significantly homologous to mammalian CaMK1, including a putative phosphorylation site (Thr-192) for CaMKK. Cmk1 activity is dependent on Ca²⁺ and CaM, and increases when threonine 192 is mutated to aspartic acid (Cmk1-T192D), which is consistent with the conclusion that Cmk1 activity is regulated in a manner homologous to mammalian CaMK1 (9–11). It has also been reported that the overexpression

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 934034762; Fax: +34 934021907; Email: alligue@ub.edu.

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

UK). RNA quality and concentration was determined using a Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). cDNA was synthesised with the High-Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) using random primers. Relative quantification of cDNA was carried out in duplicate on an Mx3000P qPCR (Stratagene, La Jolla, CA) using Express SYBR® GreenER™ qPCR Supermix Universal (Invitrogen, Carlsbad, CA). qPCRs were denatured at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min. The oligonucleotides used for qPCR amplification are listed in Supplementary Table S2. The *act1* gene encoding actin was used to normalise. For purposes of plotting graph, data were also normalised to wild-type without treatment values. The data shown are representative of three independent experiments.

Calcineurin-dependent Response Element (CDRE)-dependent Reporter Assay

The cells were transformed or integrated with the CDRE reporter plasmid (34) and were untreated or treated with CaCl₂. For the experiments with overexpression of Cmk1, wild-type cells carrying CDRE-reporter (34) were transformed either with pREP1-Cmk1 or empty pREP1 and were incubated in EMM without tiamine to activate the *mtt* promoter. The cells were incubated with 0.5 mM D-luciferin at 30°C and CDRE transcriptional activity was measured as described previously (34).

Fluorescence microscopy

For GFP visualisation, cells were grown to their exponential phase. A Zeiss Axiovert 200M inverted microscope with a 100X oil-immersion objective was used to visualise the cells. Images were taken with a Coolsnap HQ camera and were processed using Slidebook TM 3.0.1 software.

RESULTS

Cmk1 is regulated both at the transcriptional and post-translational level by Ca²⁺.

The Cmk1 protein was analysed in response to Ca²⁺. We found that Cmk1 protein levels increased during exposure to Ca²⁺ (Figure 1A). In addition, we observed the appearance of a slow migration band concomitant with exposure to Ca²⁺ (Figure 1A). To confirm the Ca²⁺-dependence of the slow Cmk1 migration band, growing cells were treated with Ca²⁺ and divided into two cultures, with Ca²⁺-chelator EGTA added to one of them. As Figure 1B shows, the slow migrating band was eliminated when EGTA was added to Ca²⁺-treated cells. To determine whether phosphorylation contributes to the Cmk1 slow migration band, we performed a phosphatase assay. Cmk1-HA was immunoprecipitated from Ca²⁺-treated extracts and incubated with or without λ-protein phosphatase. The Cmk1 mobility shift was then analysed. As shown in Figure 1C, phosphatase treatment greatly reduced the presence of the slow migration band, indicating that the Cmk1 protein is phosphorylated in response to Ca²⁺.

Ca²⁺-induced transcription is the principal process that has been characterised in *S. pombe*. We studied whether the expression of Cmk1 induced by Ca²⁺ is controlled at the transcriptional level. To test this possibility, we monitored *cmk1* mRNA, detecting an increase in *cmk1* mRNA levels following Ca²⁺ treatment (Figure 1D). Together, these results suggest that Ca²⁺ regulates Cmk1 expression and phosphorylation.

Phosphorylation of Cmk1 in response to osmotic stress is due to Ca²⁺ signalling.

An increase in extracellular Ca²⁺ can also provoke osmotic stress in cells; therefore, we also analysed the Cmk1 protein in response to osmotic stress by KCl. The Cmk1 protein was also phosphorylated in the presence of KCl, displaying a slow migration band as in the response to Ca²⁺ (Figure 2A). Cmk1 phosphorylation was concomitant with KCl exposure, as shown in the time course of Figure 2B.

It has been reported that high extracellular concentrations of KCl and NaCl cause an increase in intracellular Ca²⁺, as a result of the stimulation of extracellular Ca²⁺ intake (34). In order to determine whether Cmk1 phosphorylation in the presence of KCl is due to osmotic stress independently of or dependently on an increase in cytosolic Ca²⁺, we treated the cells with KCl with or without EGTA. The slow migration band did not appear when EGTA was added to the medium, confirming that phosphorylation of Cmk1 in response to KCl is a consequence of an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration rather than of osmotic stress *per se* (Figure 2C).

Cmk1 gene expression is regulated by the calcineurin-dependent Prz1 transcription factor

An examination of the *cmk1* promoter revealed the presence of a number of putative Ca²⁺-dependent response elements: CAACT/AGTTG located at 431–427, 300–296 and 273–269 bp upstream of ATG (Figure 3A), suggesting that Ca²⁺-induced expression of Cmk1 in fission yeast is the result of up-regulated transcription (19). In addition to the Ca²⁺-responsive elements, the *cmk1* promoter also contains the previously described calcineurin-dependent response element (CDRE) AGCCTC/GAGGCT motif (35). This motif is found at the 296–291 position upstream of ATG in the *cmk1* promoter (Figure 3A).

In the light of the above observations, we studied whether the increment in *cmk1* gene expression and protein levels is dependent on the Prz1 transcription factor in response to Ca²⁺. As shown in Figure 3B, the increase in *cmk1* mRNA in response to Ca²⁺ was abolished in *Dprz1* cells and the same was observed at the protein level (Figure 3C). Cmk1 was phosphorylated in *Dprz1* cells exposed to Ca²⁺, but the increase in protein levels was barely noticeable (Figure 3C).

Cmk1 negatively regulates Prz1

In budding yeast and mammalian cells, the activity of Crz1 and NFAT transcription factors, is regulated by different signalling pathways which affect kinases (14). This

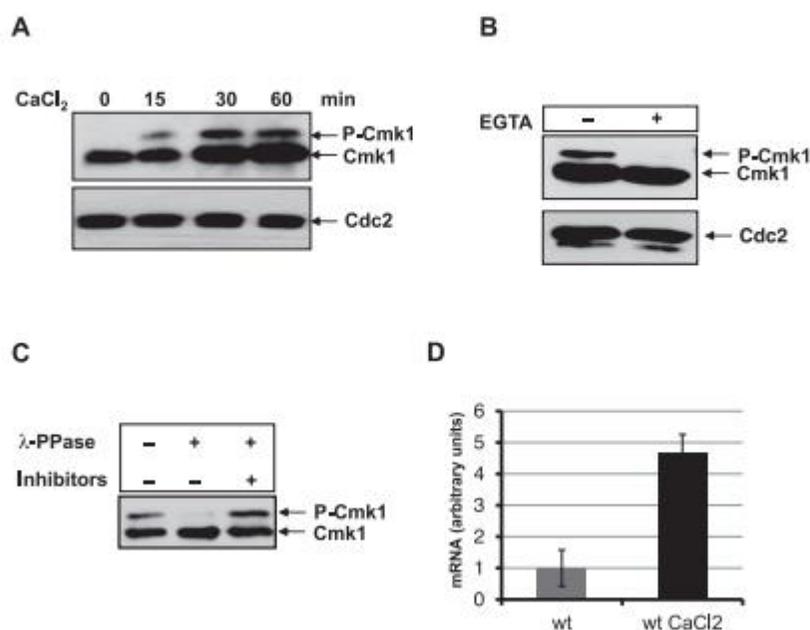


Figure 1. Increase of Cmk1 expression and phosphorylation due to Ca^{2+} . (A) Time course of cells harbouring endogenous *cmk1::HA* gene exposed to 100 mM CaCl_2 . Cmk1 protein level was analysed at the times indicated by Western blot using anti-HA antibodies (top) and Cdc2 was probed as a loading control with anti-PSTAIR antibodies (A and B, bottom). (B) *cmk1::HA* cells exposed to 100 mM CaCl_2 for 30 min were treated (+) or untreated (-) with EGTA before analysing the Cmk1 protein by Western blot using anti-HA antibodies (top). (C) Cell extracts of cells expressing Cmk1-HA in the presence of 100 mM CaCl_2 were treated before electrophoresis with λ -protein phosphatase and with phosphatase inhibitors when indicated. Cmk1 was analysed by Western blot using anti-HA antibodies. (D) Cmk1 gene expression. The mRNA of cells treated (wt CaCl_2) or untreated (wt) with 100 mM CaCl_2 was extracted and the *cmk1* mRNA level was analysed by RT-PCR using the oligonucleotides Cmk1 RT Fw and Rv.

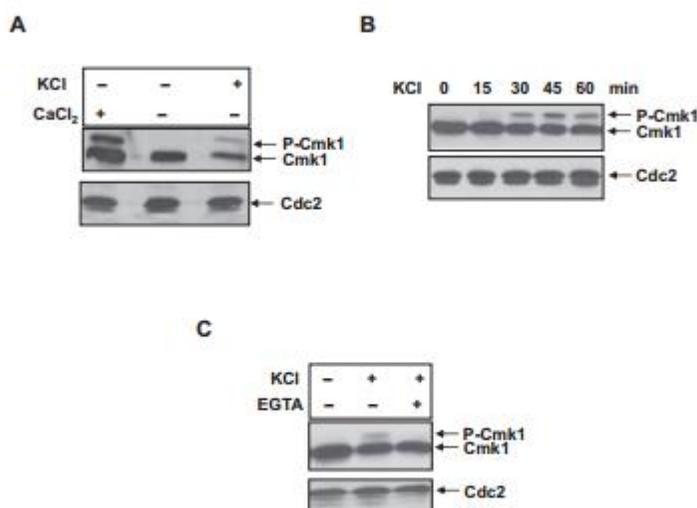


Figure 2. Phosphorylation of Cmk1 in response to osmotic stress. (A) *cmk1::HA* strain was treated with 100 mM CaCl_2 or 1M KCl when indicated and Cmk1 phosphorylation was detected by Western blot with anti-HA antibodies (top). (B) Time course of cells harbouring endogenous *cmk1::HA* gene exposed to 1M KCl. Cmk1 protein level was analysed at times indicated as in A (top). (C) The same strain *cmk1::HA* was treated with 1M KCl and 20 mM EGTA when indicated and Cmk1 was detected as in A (top). Anti-PSTAIR antibodies were used to probe Cdc2 as a loading control (bottom).

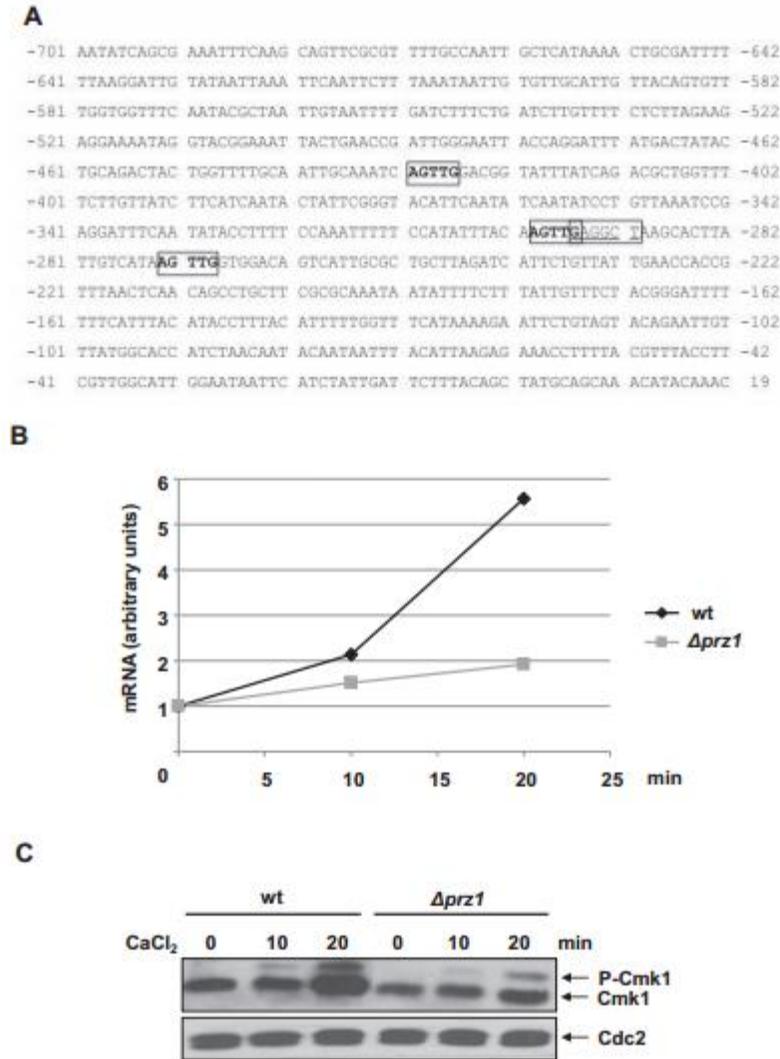


Figure 3. Transcription of *Cmk1* is regulated by Prz1 in response to Ca^{2+} . (A) Promoter analysis of the *cmk1* gene. Calcineurin-dependent response element (CDRE), AGCCTC/GAGGCT is boxed and putative Ca^{2+} -dependent response elements CAACT/AGTTG are boxed in bold. (B) *Cmk1* gene expression was analysed in wild-type (wt) and *prz1* deleted ($\Delta prz1$) cells treated with 100 mM $CaCl_2$ at different times. The mRNA of the cells was extracted and the *cmk1* mRNA level was analysed by RT-PCR using the oligonucleotides *Cmk1* RT Fw and Rv. (C) *Cmk1* protein level was analysed from the same cells as in B by Western blot with anti-HA antibodies (top). Anti-PSTAIR antibodies were used to probe Cdc2 as a loading control (bottom).

prompted us to examine whether *Cmk1* is involved in negative regulation of Prz1 by analysing the Ca^{2+} -induced CDRE transcriptional activity of Prz1 in $\Delta cmk1$ cells compared to wild-type. The reporter response of $\Delta cmk1$ cells was markedly enhanced, reflecting the increase of Prz1 transcriptional activity compared with wild-type cells (Figure 4A). In contrast, overexpression of *Cmk1* suppressed the Prz1 transcriptional activity (Figure 4B), indicating that *Cmk1* is indeed involved in the negative regulation of Prz1.

In Ca^{2+} -stimulated cells, active Prz1 accumulates in the nuclei; so we next studied whether the cellular location of Prz1 is affected by *Cmk1*. We overexpressed *Cmk1* and *Cmk1* kinase-dead (*Cmk1*-KA), which has the lysine 60 from the ATP-binding site mutated to alanine, in *GFP-prz1* cells in the presence of Ca^{2+} . We observed that Prz1 nuclear localisation was altered, displaying a cytoplasmic pattern when *Cmk1* was overexpressed, while Prz1 was maintained in the nuclei with *Cmk1*-KA expression (Figure 4C).

Cmk1 interacts with and phosphorylates Prz1

Prz1 activation and subcellular localisation are regulated by its phosphorylation state. In response to Ca^{2+} stimulation, Prz1 is dephosphorylated and activated (18). This activation can be monitored by a change in electrophoretic mobility, in addition to nuclear accumulation. We analysed the Prz1 protein in $\Delta cmk1$ cells and the mobility shift of Prz1 observed in wild-type cells is abolished in the absence of Cmk1 (Figure 5A). Moreover, we overexpressed Cmk1 and the inactive Cmk1-KA in wild-type cells. As Figure 5B shows, when Cmk1 was overexpressed, the Prz1 protein exhibited a slow electrophoretic-mobility which was absent with overexpression of Cmk1-KA, indicating that Prz1 is hyperphosphorylated when Cmk1 is overexpressed (Figure 5B).

We then analysed whether Cmk1 phosphorylates Prz1 *in vivo*. To detect Prz1 phosphorylation, we used an antibody against phospho-Akt substrates (RXXS/T) which recognises proteins containing phospho-serine/threonine preceded by arginine at the -3 position. This substrate specificity is characteristic of many Arg-directed kinases, including Cmk1 (36).

We then analysed the phosphorylation status of Prz1 by using the antibody against phospho-Akt substrates (RXXS/T). We immunoprecipitated endogenous GFP-Prz1 from wild-type cells treated or untreated with Ca^{2+} and we observed that Prz1 was phosphorylated in untreated wild-type cells and hypophosphorylated in cells treated with calcium, thereby verifying the specificity of the antibody toward the phosphorylation state of Prz1. In Ca^{2+} -treated cells, dephosphorylation is due to calcineurin as was confirmed when cells treated with Ca^{2+} were incubated beforehand with FK506, a specific inhibitor of calcineurin (Figure 5C). When the Prz1 protein was analysed in $\Delta cmk1$ cells, it was observed to present a hypophosphorylated state (Figure 5C). This result confirms that Cmk1 phosphorylates Prz1 and suggests that Cmk1 is involved in Prz1 inactivation.

We next examined the interaction between Cmk1 and Prz1 by co-immunoprecipitation. Cmk1 protein was immunoprecipitated from cells containing endogenous GFP-*prz1* and a plasmid overexpressing Cmk1 or an empty plasmid as a control. As Figure 5D shows, Prz1 was only present when associated with Cmk1.

Absence of the *prz1* gene markedly suppresses the high Ca^{2+} -resistance of *cmk1* deleted cells

The above results imply a role of Cmk1 in the control of Ca^{2+} homeostasis. Therefore, we screened the growth of wild-type and $\Delta cmk1$ cells at different concentrations of Ca^{2+} . As shown in Figure 6A, $\Delta cmk1$ cells displayed a resistant phenotype to high Ca^{2+} concentrations. This observation is consistent with its role as a negative regulator of Prz1 (Figure 6A). In contrast, overexpression of the constitutively active form of Cmk1 (Cmk1-T192D) was capable of suppressing Ca^{2+} resistance (Figure 6B). The sensitivity to Ca^{2+} acquired with Cmk1-T192D expression was associated with Cmk1 activity because overexpression of the catalytically inactive Cmk1-T192D, which has the lysine 60 from the ATP-binding domain mutated to alanine (Cmk1-T192D-K60A), rendered it insensitive to Ca^{2+} (Figure 6B).

To provide additional information about regulation between Cmk1 and Prz1, we analysed the sensitivity of double mutant $\Delta cmk1 \Delta prz1$ cells at high doses of Ca^{2+} . The Ca^{2+} resistance of $\Delta cmk1$ cells was abolished in the double $\Delta cmk1 \Delta prz1$ mutant (Figure 6C). These results suggest that the loss of Prz1 activity abolishes $\Delta cmk1$ resistance to Ca^{2+} ; accordingly, the same should be observed in the absence of the Prz1 activator, calcineurin (*ppb1*). Therefore, we examined the double mutant $\Delta ppb1 \Delta cmk1$ at high Ca^{2+} concentrations and, as expected, deletion of *ppb1* abolished the $\Delta cmk1$ Ca^{2+} resistance (Figure 6D). These results suggest that the activity of Prz1 is necessary to allow $\Delta cmk1$ cells to grow in calcium conditions.

Cmk1 induces cell-cycle arrest triggered by Cdc25 after Ca^{2+} treatment

Expression of the constitutively active form of Cmk1 (Cmk1-T192D) arrests cell cycle progression (Figure 7A) (9). We and others have previously reported that activation of members of the CaM-dependent kinase family, such as Chk1, Cds1 or Srk1, causes cell cycle arrest dependent on Cdc25 phosphorylation (37–41). We therefore studied whether the cell cycle arrest caused by the overexpression of Cmk1-T192D is dependent on Cdc25 phosphorylation. To this end, we overexpressed Cmk1-T192D in a strain carrying the *cdc25-9A* allele, which contains mutations at 9 of the consensus sites of CaM-dependent kinases (40,42–43). The growth arrest and cell elongation typical of cell cycle arrest caused by the overexpression of Cmk1-T192D were suppressed when Cmk1-T192D was overexpressed in *cdc25-9A* cells (Figure 7A and B).

Next, we examined the Cdc25 protein when Cmk1 was expressed. As can be observed in Figure 7C, overexpression of the constitutively active Cmk1-T192D caused the stabilisation and accumulation of Cdc25. In contrast, the overexpression of Cmk1-T192D did not affect *cdc25-9A* cells. This result is consistent with our previous report (43), where Cdc25 was inhibited but stabilised through phosphorylation.

We then examined the Cdc25 protein level in wild-type and $\Delta cmk1$ cells treated with Ca^{2+} . As Figure 7D shows, Cdc25 protein levels accumulated during Ca^{2+} response in wild-type cells. In contrast, the Cdc25 protein failed to increase in $\Delta cmk1$ cells during Ca^{2+} response (Figure 7D). Thus, Cdc25 accumulation caused by Ca^{2+} is dependent on Cmk1.

The new CaMKK, Ckk2, phosphorylates Cmk1 in response to Ca^{2+} stress

Here, we addressed the critical question of how Cmk1 phosphorylation is regulated in response to Ca^{2+} stress. In mammalian cells, two-step activation of CaMKI has been demonstrated; an increase in CaMKI activity after Ca^{2+} /CaM binding followed by hyperactivation through phosphorylation by CaMKK. In fission yeast, Cmk1 activity is Ca^{2+} /CaM-dependent, and mutation of the putative phosphorylation site (Thr-192) for CaMKK to aspartic acid (Cmk1-T192D) converts Cmk1 into a constitutively active form (9), indicating that Cmk1 is regulated in a similar way to mammalian CaMKI.

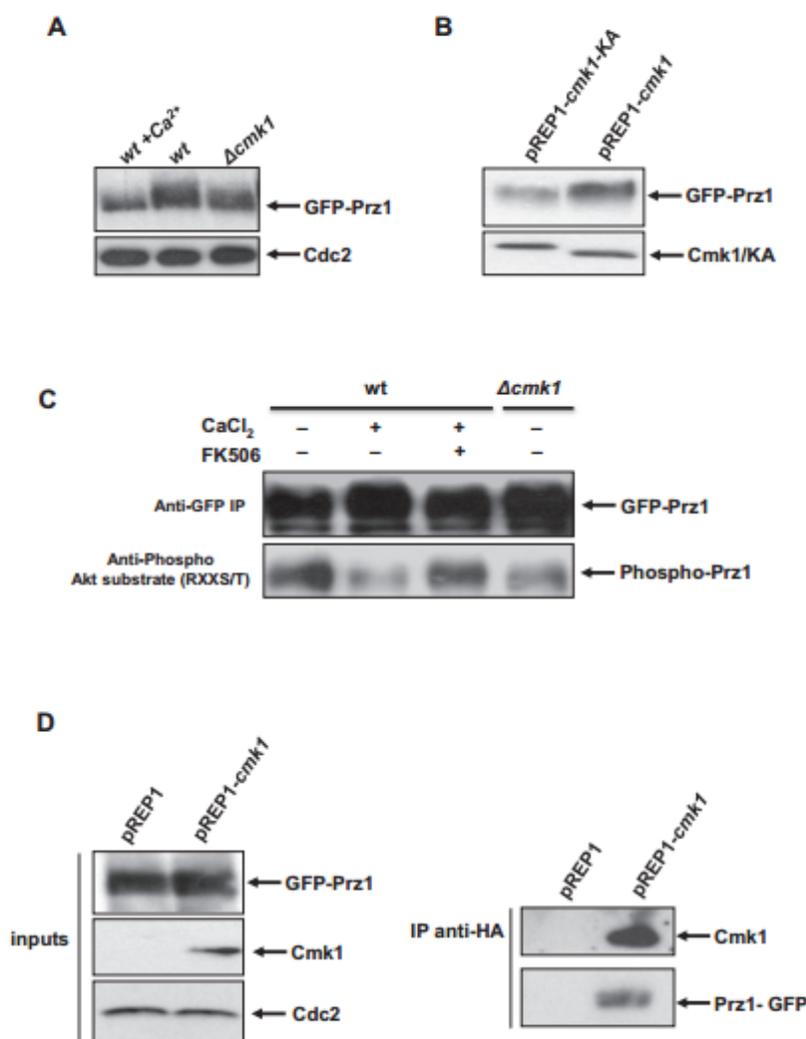


Figure 5. Cmk1 phosphorylates and binds Prz1. (A) Mobility shift of the Prz1 protein was analysed by Western blot using anti-GFP antibodies from $\Delta cmk1$ cells ($\Delta cmk1$) and wild-type cells untreated (wt) or treated with 100 mM of CaCl₂ (wt+Ca²⁺) carrying the endogenous GFP-prz1 tagged gene (top). Anti-PSTAIR antibody was used to probe Cdc2 as a loading control (bottom). (B) Cmk1 and Cmk1-KA were overexpressed in GFP-Prz1 cells harbouring pREP1-Cmk1 or pREP1-Cmk1-KA plasmids in the absence of thiamine. The Prz1 protein was analysed by Western blot using anti-GFP antibodies (top). The level of Cmk1 and Cmk1-KA overexpression was detected using the anti-HA antibodies (bottom). (C) *In vivo* Prz1 phosphorylation by Cmk1. Prz1 was immunoprecipitated using anti-GFP antibodies from $\Delta cmk1$ and wild-type cells untreated (wt) or treated with 100 mM CaCl₂ and 0.5 μ g/ml of FK506 (top). Phosphorylation of Prz1 was detected with anti-Phospho Akt substrate (RXXS/T) (bottom). (D) Cmk1 protein was immunoprecipitated using anti-HA antibody from GFP-Prz1 cells harbouring the plasmid pREP1-Cmk1 or the empty plasmid pREP1 in the absence of thiamine (right top). Binding of Prz1 was detected using anti-GFP antibodies (right bottom). Left panels indicate the input levels of Prz1 (top), Cmk1 (middle) and Cdc2 as a loading control (bottom) detected with anti-GFP, anti-HA anti-PSTAIR antibodies, respectively.

Previous studies have postulated that Ssp1 is fission yeast CaMKK (12,44). Accordingly, we studied whether Ssp1 is involved in Cmk1 activation. However, Cmk1 was still phosphorylated in *ssp1*-deleted cells exposed to Ca²⁺ (Supplementary Figure S2A) and overexpression of Ssp1 did not display the phosphorylation pattern of Cmk1 (Supplementary Figure S2B). Regarding the Ca²⁺ stress response, $\Delta ssp1$

cells were highly sensitive to Ca²⁺, in contrast to the resistance of $\Delta cmk1$ cells (Supplementary Figure S2C). Taken together, these results indicate that Ssp1 is not the kinase involved in Cmk1 regulation in the Ca²⁺ stress response.

In addition to Ssp1, we found a second sequence homologous to mammalian CaMKK: SPC1919.01, named Ppk34 for the uncharacterised putative protein kinase 34 in

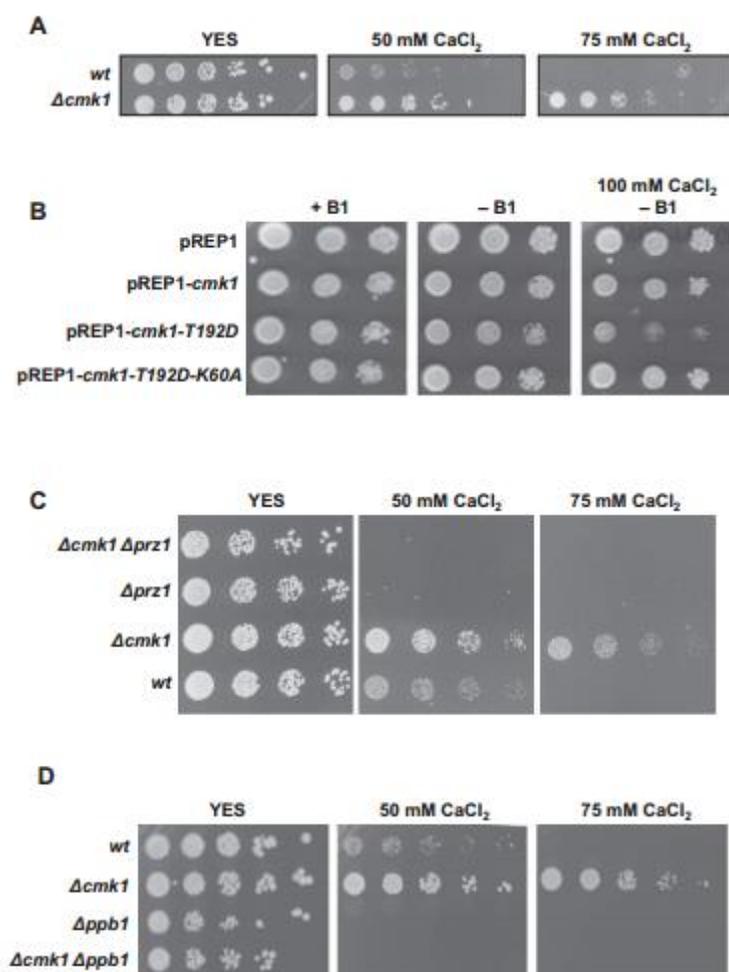


Figure 6. Suppression of Ca^{2+} resistance of *cmk1* deleted cells by elimination of calcineurin pathway. (A) Ca^{2+} sensitivity. Wild-type and $\Delta cmk1$ cells were grown in YES medium and spotted on YES plates containing different concentrations of CaCl_2 and incubated for 3 days at 30°C . (B) $\Delta cmk1$ cells containing the multicopy plasmid pREP1, empty (pREP1) or carrying different versions of *cmk1* gene (pREP1-*cmk1*, pREP1-*cmk1-T192D* and pREP1-*cmk1-T192D-K60A*) were spotted onto EMM plates with thiamine (+B1), without thiamine (-B1) and without thiamine plus CaCl_2 (-B1 + 100mM CaCl_2) and were incubated for 4 day at 30°C . (C) and (D) The indicated strains were grown in YES medium and spotted on YES plates containing different concentrations of CaCl_2 and incubated for 3 days at 30°C . Lower CaCl_2 concentrations of figures C and D are shown in Supplementary Figure S1.

a systematic deletion analysis of fission yeast kinases (45). Due to its homology to the CaMKK proteins, we have renamed it Ckk2. Ckk2 is most homologous to mammalian CaMKK2 (34%), followed by Ssp1 (32%) and CaMKK1 (28%) (Figure 8A and Table 1).

Next, we examined the effect on the sensitivity to Ca^{2+} stress of single *ckk2* or double *ckk2 cmk1*-deleted cells and we observed that $\Delta ckk2$ and $\Delta cmk1 \Delta ckk2$ cells were resistant to Ca^{2+} stress as $\Delta cmk1$ cells are (Figure 8B). This result suggests that Ckk2 is the CaMKK involved in Cmk1 regulation under high Ca^{2+} concentrations. Therefore, we examined Cmk1 phosphorylation in $\Delta ckk2$ cells under Ca^{2+} stress, and found that Cmk1 phosphorylation

was lost in $\Delta ckk2$ cells (Figure 8C), indicating that the newly identified Ckk2 kinase is responsible for Cmk1 phosphorylation in response to Ca^{2+} .

We also examined the Cdc25 protein level in $\Delta ckk2$ cells compared to wild-type and $\Delta cmk1$ cells treated with Ca^{2+} . Cdc25 protein levels in $\Delta ckk2$ cells were similar to those in $\Delta cmk1$ cells and, failed to increase during Ca^{2+} response (Figure 8D), reinforcing the claim that Ckk2 is in the same pathway as Cmk1 during Ca^{2+} signalling.

DISCUSSION

Yeast cells adapt to a wide range of growth conditions through activation of signalling pathways that detect and re-

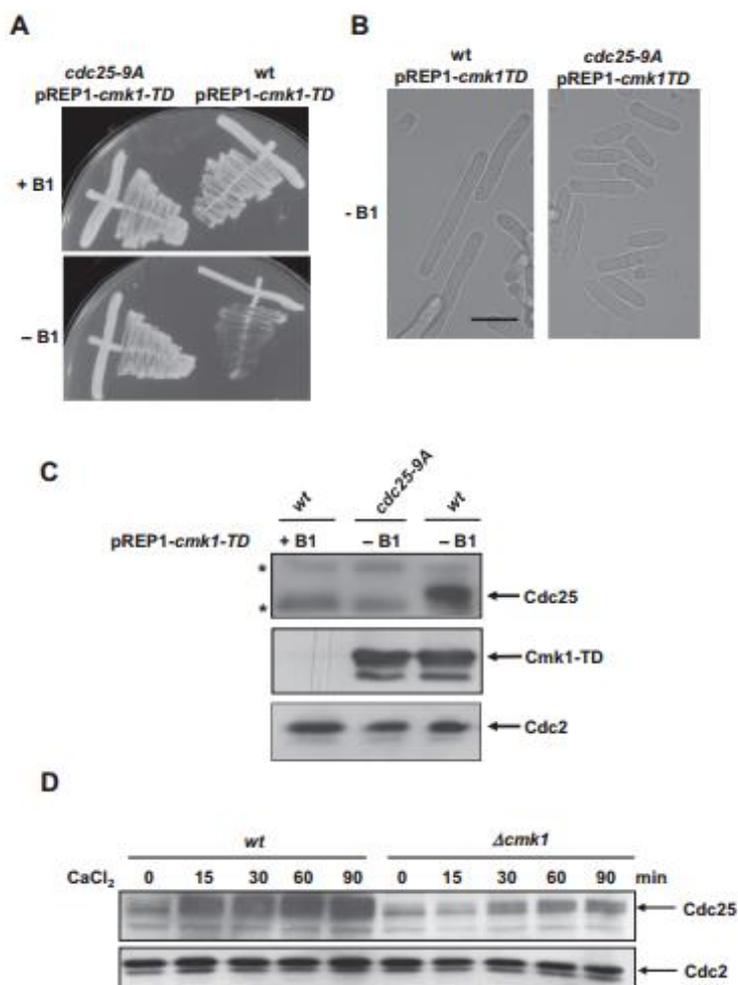


Figure 7. Overexpression of Cmk1 causes cell cycle arrest through Cdc25. (A) and (B) Wild-type (*wt*) and *cdc25-9A* cells containing the plasmid pREP1-*cmk1-TD* were grown either in the presence (+B1) or absence (-B1) of thiamine on (A) plates or (B) in liquid media. Bar, 10 μ m. (C) Western blot of extracts from wild-type and *cdc25-9A* cells expressing pREP1-*cmk1-TD* grown either in the presence (+B1) or absence (-B1) of thiamine were probed with anti-Cdc25 antibodies (top), anti-HA antibodies to detect Cmk1-TD (middle) and anti-PSTAIR antibodies to detect Cdc2 as a loading control. * indicates unspecific bands. (D) Time course of wild-type (*wt*) and Δ *cmk1* cells exposed to 100 mM CaCl₂. The Cdc25 protein level was analysed at the times indicated by Western blot using anti-Cdc25 antibodies (top) and Cdc2 was probed as a loading control with anti-PSTAIR antibodies (bottom).

Table 1. Basic local alignment search tool for the Ckk2 (GenBank ID 162312133) protein with CaMKK, CaMKK2, CaMKK1 and Ssp1

Protein	Ckk2 cover	E value	Identities	GenBank ID
CaMKK2	86%	6e -52	34%	27437015
Ssp1	63%	2e -30	32%	19075860
CaMKK1	52%	4e -14	28%	14150045

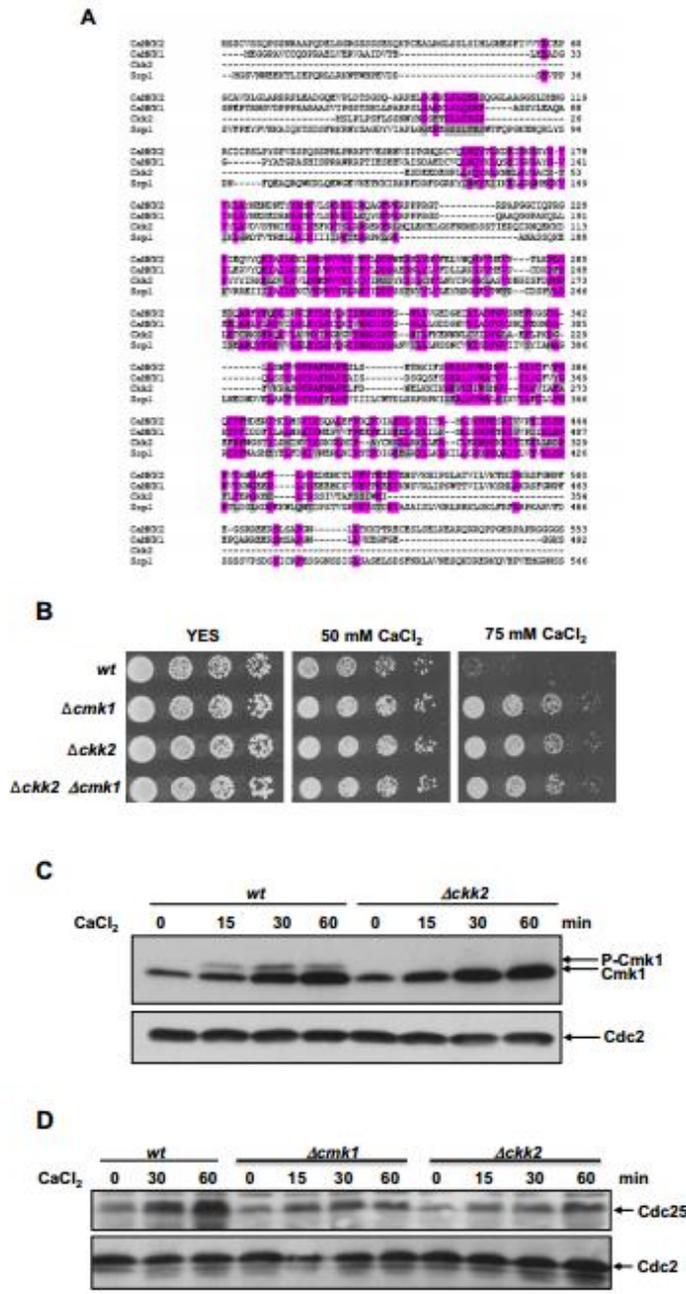


Figure 8. Cck2 a new CaMKK in fission yeast. (A) Comparison of amino acid sequences of human and *S. pombe* CaMKK. Human CaMKK2 (CaMKK2), human CaMKK1 (CaMKK1), *S. pombe cck2* (Cck2) and *S. pombe xsp1* (Ssp1). Multiple sequences were aligned with Clustal Omega. (B) Ca²⁺ sensitivity. Wild-type (wt), $\Delta cck1$, $\Delta cck2$ and $\Delta cck1 \Delta cck2$ cells were grown in YES medium and spotted on YES plates containing different concentrations of CaCl₂ and incubated for 3 days at 30°C. (C) Time course of wild-type (wt) and $\Delta cck2$ cells exposed to 100 mM CaCl₂. The Cmk1 protein and phosphorylation mobility shift were analysed at the times indicated by Western blot using anti-HA antibodies (top) and Cdc2 was probed as a loading control with anti-PSTAIR antibodies (bottom). (D) Time course of wild-type (wt), $\Delta cck1$ and $\Delta cck2$ cells exposed to 100 mM CaCl₂. The Cdc25 protein level was analysed at the times indicated by Western blot using anti-Cdc25 antibodies (top) and Cdc2 was probed as a loading control with anti-PSTAIR antibodies (bottom).

spond to changes in the environment. An increase in Ca^{2+} activates phosphatase calcineurin, promoting survival under these conditions in part by dephosphorylating the Prz1 transcription factor in fission yeast (18). Upon dephosphorylation, Prz1 translocates from the cytosol to the nucleus, where it activates gene expression. Activation of Prz1 must be reversible in order to maintain cell homeostasis. In budding yeast and mammalian cells, it has been shown that rephosphorylation of calcineurin-dependent transcription factors, Crz1 and NFAT, respectively, upon activation of gene expression is a key process in the Ca^{2+} response (46). In budding yeast, calcineurin dephosphorylates Crz1p and causes its rapid translocation from the cytosol to the nucleus. The casein kinase I isoform Hrr25, cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) and Pho85 cycling-dependent kinase act to negatively regulate Crz1 (21,25,47). After adaptation to calcium stress, Crz1 relocalises from the nucleus to the cytoplasm. The phosphorylation status of Crz1 has been shown to influence this shuttling by altering its rates of nuclear import and export (48,49). Furthermore, the regulation of Crz1 by multiple kinases in budding yeast is analogous to the regulation of the mammalian functional homolog of Crz1, NFAT. Nuclear export of NFAT responds to phosphorylation by multiple kinases (46). Moreover, in human, cardiovascular diseases such as hypertrophy (50,51), neurodegenerative diseases such as Alzheimer's (51–53) and tumour progression by inducing angiogenesis (54–56), are promoted by persistent NFAT activation. Therefore, considerable research has focused on studying the mechanisms of negative regulation of calcineurin-dependent transcription factors.

In fission yeast, a genetic screen to isolate Prz1 regulators identified Pka1 kinase; however, cAMP had no effect on the electrophoretic mobility of Prz1, and phosphorylated Prz1 was not detected by phospho-PKA substrate-specific antibodies (30).

Our central goal was to elucidate the role of Cmk1 kinase in response to Ca^{2+} . Here, we present evidence that Cmk1 is part of the feedback regulation whereby active Prz1 activates Cmk1 expression which in turns inactivates the Prz1 transcriptional function in response to an increase in cellular Ca^{2+} . The expression of Cmk1 increases both at the mRNA and protein level in response to calcium, and Prz1 is the transcription factor involved in the *cmk1* mRNA increase. In addition, several lines of evidence indicate that Cmk1 is involved in the inactivation of Prz1 in response to Ca^{2+} . First, the expression of Cmk1 prevents Prz1 nuclear localisation in response to Ca^{2+} , thereby preventing the activation of Prz1-dependent transcription. Cmk1 activity is necessary to inhibit Prz1 because expression of the catalytically inactive form of Cmk1 (Cmk1-KA) does not affect Prz1 nuclear localisation. Second, Prz1 activity is higher in *cmk1* deleted cells and lower when Cmk1 is overexpressed. Third, Cmk1 binds and phosphorylates Prz1 *in vivo*. The overexpression of Cmk1 causes a change in the electrophoretic mobility of the Prz1 protein which is not observed when the inactive Cmk1-KA is overexpressed. Furthermore, phosphorylation in the consensus site of Cmk1 kinase is detected in the inactive Prz1, whereas this phosphorylation is absent in Δcmk1 cells. Lastly and impor-

tantly, the cellular Ca^{2+} -resistance of Δcmk1 cells is suppressed by *prz1* deletion or by deletion of an upstream factor of Ca^{2+} signalling, such as calcineurin, *pbbl1*, indicating that the lack of negative regulation of Prz1 and thus, the increase in transcription of its targets involved in the calcium response, confers Ca^{2+} -resistance.

Prz1 activation tends to normalise intracellular Ca^{2+} levels through the expression of its targets. It was tempting to speculate that Cmk1 would be involved in controlling intracellular Ca^{2+} levels. Thus, we also studied whether Ca^{2+} uptake and cellular Ca^{2+} concentrations were affected by the absence of Cmk1. We have monitored a change in intracellular free Ca^{2+} concentrations with the Ca^{2+} sensor, yellow Cameleon-nano15 (57,58). Upon addition of Ca^{2+} , images of CFP and YFP emission spectra were taken and the YFP/CFP ratio was calculated. The YFP/CFP ratio increased significantly in both wild-type and Δcmk1 cells after Ca^{2+} treatment (Supplementary Figure S3), indicating that changes in intracellular Ca^{2+} levels are not sufficient to provide Ca^{2+} -resistance despite the slight decrease in Ca^{2+} levels observed in Δcmk1 cells.

In fission yeast, overexpression of Prz1 induced slow growth and small cell morphology similar to that of constitutively active calcineurin (30,59). We found that overexpression of Cmk1 counteracts the effect of Prz1 and the cells recover the wild-type phenotype (Supplementary Figure S4). This observation is interesting because previous studies were conducted on fission yeast to determine whether the overexpression of known kinases that oppose calcineurin-dependent activation, such as GSK3 homologues (Gsk3 and Gsk31), DYRK family kinases (Pom1, Ppk15 and Prp4), p38 MAPK homologues (Sty1), PKC homologues (Pck2), ERK MAPK homologues (Pmk1) and pheromone responsive MAPK (Spk1), repress the phenotype caused by overexpression of Prz1 in fission yeast; but none of them did (30). However, despite the overexpression of Cmk1 rescues the slow growth phenotype induced by overexpression of Prz1, it is not sufficient to indicate that Cmk1 acts directly over Prz1, the effect could also be due to the cell cycle regulation by Cmk1.

In fission yeast, it has previously been reported that the constitutively active form of Cmk1 blocks cell cycle progression, although the mechanism remains elusive (9). We found that in response to an increase in calcium, Cmk1 blocks the cell cycle through phosphorylation of the Cdc25 protein phosphatase.

This result contributes to generalising a function already defined for members of the CaM-dependent kinase family, such as Chk1, Srl1 and MAPK-K2, which, in response to different genotoxic or environmental stresses, blocks cell division through phosphorylation of Cdc25 (37,41,60).

We found that Ca^{2+} signalling also provokes phosphorylation of Cmk1. As indicated, Cmk1 activity depends on Ca^{2+} /CaM and full activation is reached upon phosphorylation at T192: the CaMKK consensus site (9). Therefore, the CaMKK Ssp1 was the candidate to phosphorylate Cmk1 in response to Ca^{2+} . However, Ssp1 is not the kinase that phosphorylates Cmk1 in response to Ca^{2+} . Cmk1 phosphorylation takes place in Δssp1 cells exposed to Ca^{2+} , and Δssp1 cells are not resistant to high levels of Ca^{2+} , con-

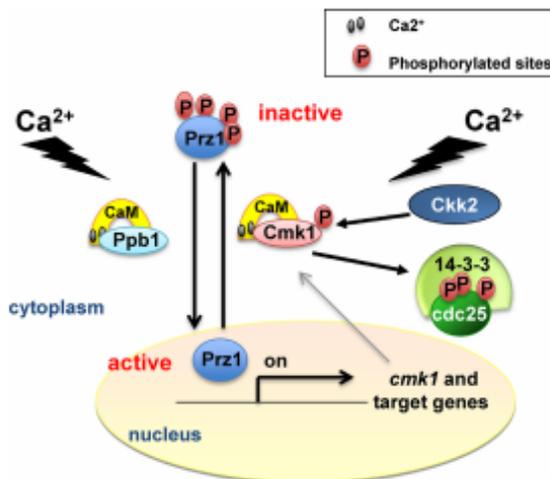


Figure 9. Model depicting the role of the Cck2-Cmk1 pathway in Ca^{2+} response. An increase in intracellular Ca^{2+} levels results in activation of Ca^{2+} /CaM-dependent proteins, including the phosphatase calcineurin (Ppb1) and the Ca^{2+} /CaM-dependent kinases Cmk1 and Cck2. Ppb1 dephosphorylates Prz1 leading to its nuclear translocation and activation of *cmk1* gene transcription. In parallel, activation of Cck2 phosphorylates and fully activates Cmk1 which phosphorylates and inactivates both; Cdc25 and Prz1, promoting their nuclear export.

sistent with having Cmk1 active. Therefore, we focused on a second gene of *S. pombe* showing homology to mammalian CaMKs: SPCC1919.01, named Ppk34 as an uncharacterised putative protein kinase 34 in a systematic deletion analysis of fission yeast kinases (45). Due to its homology to the CaMKs, we have renamed it Cck2. We found that like Δcmk1 cells, Δcck2 and $\Delta\text{cmk1} \Delta\text{cck2}$ deleted cells are resistant to high concentrations of Ca^{2+} , supporting the idea that Cck2 shares the same pathway as Cmk1. An idea which is confirmed by our observation that Cmk1 phosphorylation is abolished in Δcck2 cells exposed to Ca^{2+} . Additionally, Cck2 is also involved in Cdc25 stabilisation in response to Ca^{2+} stress corroborating the Cck2-Cmk1 axis. Further experiments will be required to assess how Cck2 is regulated.

In summary, we have identified a novel member of the CaM-dependent kinase family, the CaMKK, Cck2, which is involved in the activation of Cmk1 by phosphorylation in response to Ca^{2+} . Furthermore, we have also identified a novel physiological role for Cmk1 in regulating the calcineurin signalling pathway by phosphorylating Prz1.

Under normal growing conditions, calcineurin (Ppb1), Cmk1 and probably Cck2 are inactive (Figure 9), and under these circumstances, Prz1 remains in the cytoplasm, phosphorylated by Cmk1 and most probably by additional kinases, since the deletion of *cmk1* does not provoke the immediate translocation of Prz1 to the nucleus. In response to an increase in Ca^{2+} , the Ppb1, Cmk1 and Cck2 proteins are activated. In this scenario, active Ppb1 activates Prz1 by dephosphorylation and consequently Prz1 translocation to the nucleus to activate its target genes, one of which is *cmk1*. An increase in Ca^{2+} also activates Cmk1. Activa-

tion of Cmk1 kinase occurs in two steps, first by binding Ca^{2+} /CaM and second through phosphorylation by Cck2 (Figure 9). Active Cmk1 has two important functions during the Ca^{2+} response that maintain cell homeostasis: inhibition of cell cycle progression by phosphorylation of the Cdc25 protein (Figure 9) and inhibition of Prz1-dependent transcription, which can be toxic to the cell, through phosphorylation of Prz1 and subsequent exit from the nucleus (Figure 9). Thus, while both activation and inactivation of Prz1 is regulated by Ca^{2+} , the kinetics is different. The activation by Ppb1 is faster than the following inactivation by Cmk1.

In mammalian cells the kinase CaMKII, a member of the CaM-dependent kinases, is also activated in response to Ca^{2+} inhibiting NFAT nuclear translocation by directly phosphorylating calcineurin. CaMKII mediated phosphorylation of calcineurin has been widely reported (61–63). Specifically, studies in cardiac myocytes have indicated that an increase of Ca^{2+} activates two cytoplasmic signals with opposite effects on calcineurin activity. The increased calcineurin-mediated NFAT nuclear translocation was the dominant effect of elevated Ca^{2+} , with CaMKII acting as negative regulator. Together calcineurin and CaMKII determine NFAT nuclear translocation, hypertrophy and pro-survival signalling (62). Additionally, in the nervous system has been reported, that cytosolic Ca^{2+} signals mediate the bidirectional responses of growth cone, attraction or repulsion are induced by CaMKII and calcineurin, respectively. Interestingly, a relatively large local Ca^{2+} elevation preferentially activates CaMKII which induces attraction; while a modest local Ca^{2+} signal predominantly acts through calcineurin producing repulsion (63).

Our results also indicate that Ca^{2+} stress activates two cytosolic signalling cascades with opposite effects on Prz1 nuclear activity; the Ppb1 and the Cck2/Cmk1 cascades. It would be interesting to study whether Cmk2 kinase is also involved in Ppb1 inhibition by direct phosphorylation and to determine whether there is a balance between Cmk2 and Ppb1 depending on the cytosolic Ca^{2+} level.

Moreover, due to the functional analogy, it should be interesting to study whether the CaMKK/CaMK1 axis regulates NFAT expression in addition to CaMKII in pathologies such as Alzheimer's disease, muscular hypertrophy or cancer progression and metastasis, where hyperactivation of NFAT has been detected (53,55,64–66).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Paul Russell and Dr. Elena Hidalgo for *S. pombe* strains, suggestions and comments; Dr. Mohan K. Balasubramanian and Dr. Pilar Perez for Δppk34 strain; Dr. Takeharu Nagai and Dr. Hidetoshi Iida for the gift of the plasmid of yellow Cameleon-nano15; and Dr. Maria Calvo, Anna Bosch and Elisenda Coll for assistance with confocal microscopy.

FUNDING

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [BFU2012-31220 to R.A.]; Government of Catalonia [SRG2009-1526 to R.A.]. Funding for open access charge: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [BFU2012-31220].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Means, A.R. and Dedman, J.R. (1980) Calmodulin-dependent intracellular calcium receptor. *Nature*, **285**, 73–77.
- Tokumitsu, H., Enslin, H. and Soderling, T.R. (1995) Characterization of a Ca/calmodulin-dependent protein kinase cascade: molecular cloning and expression of calcium/calmodulin protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19320–19324.
- Skelding, K.A., Rostas, J.A.P. and Verrills, N.M. (2011) Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle*, **10**, 631–639.
- Haribabu, B., Hook, S.S., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Tomhave, E.D., Edelman, A.M., Snyderman, R. and Means, A.R. (1995) Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. *EMBO J.*, **14**, 3679–3686.
- Tokumitsu, H. and Soderling, T.R. (1996) Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5617–5622.
- Soderling, T.R. (1999) The Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 232–236.
- Wayman, G.A., Lee, Y.-S., Tokumitsu, H., Silva, A. and Soderling, T.R. (2008) Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, **59**, 914–931.
- Means, A.R. (2008) Commentary: the year in basic science: calmodulin kinase cascades. *Mol. Endocrinol.*, **22**, 2759–2765.
- Rasmussen, C.D. (2000) Cloning of a calmodulin kinase I homologue from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 685–690.
- Matsushita, M. and Nairn, A.C. (1998) Characterization of the mechanism of regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by calmodulin and by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 21473–21481.
- Bodduluri Haribabu, S.S.H., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Tomhave, E.D., Edelman, A.M., Snyderman, R. and Means, A.R. (1995) Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. *EMBO J.*, **14**, 3679–3686.
- Valbuena, N. and Moreno, S. (2012) AMPK phosphorylation by Ssp1 is required for proper sexual differentiation in fission yeast. *J. Cell Sci.*, **125**, 2655–2664.
- Yanagida, M., Imai, N., Shimanuki, M. and Sasaki, K. (2011) Nutrient limitations alter cell division control and chromosome segregation through growth-related kinases and phosphatases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **366**, 3508–3520.
- Aramburu, J., Heitman, J. and Crabtree, G.R. (2004) Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep.*, **5**, 343–348.
- Sugiura, R., Sio, S.O., Shuntoh, H. and Kuno, T. (2001) Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 278–288.
- Sugiura, R., Sio, S.O., Shuntoh, H. and Kuno, T. (2002) Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells*, **7**, 619–627.
- Cyert, M.S. (2003) Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 1143–1150.
- Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Shuntoh, H. and Kuno, T. (2003) Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast: identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18078–18084.
- Hamasaki-Katagiri, N. and Ames, J.B. (2010) Neuronal calcium sensor-1 (Nes1p) is up-regulated by calcineurin to promote Ca²⁺ tolerance in fission yeast. *J. Biol. Chem.*, **285**, 4405–4414.
- Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.-C., Yano, T., Dötsch, V., Wagner, G., Ferrara, P. and McKeon, F. (1998) Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell*, **93**, 851–861.
- Kafadar, K.A., Zhu, H., Snyder, M. and Cyert, M.S. (2003) Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev.*, **17**, 2698–2708.
- Kafadar, K.A. and Cyert, M.S. (2004) Integration of stress response: modulation of calcineurin signalling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot. Cell*, **5**, 1147–1153.
- Murphy, J.G., Sanderson, J.L., Gorski, J.A., Scott, J.D., Catterall, W.A., Sather, W.A. and Dell'Aqua, M.L. (2014) AKAP-anchored PKA maintains neuronal L-type calcium channel activity and NFAT transcriptional signalling. *Cell Rep.*, **7**, 1577–1588.
- Navedo, M.F. and Hell, J.W. (2014) AKAP5 keeps L-type channels and NFAT on their toes. *Cell Rep.*, **7**, 1341–1342.
- Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S.G., Cyert, M., Hughes, T.R. et al. (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol. Cell*, **21**, 319–330.
- Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P. and Crabtree, G.R. (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, **275**, 1930–1933.
- Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P.G. et al. (2006) A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*, **441**, 646–650.
- del Arco, P.G., Martínez-Martínez, S., Maldonado, J.L., Ortega-Pérez, I. and Redondo, J.M. (2000) A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J. Biol. Chem.*, **275**, 13872–13878.
- Chow, C.-W., Rincón, M., Cavanagh, J., Dickens, M. and Davis, R.J. (1997) Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **278**, 1638–1641.
- Koike, A., Kato, T., Sugiura, R., Ma, Y., Tabata, Y., Ohmoto, K., Sio, S.O. and Kuno, T. (2012) Genetic screening for regulators of Prz1, a transcriptional factor acting downstream of calcineurin in fission yeast. *J. Biol. Chem.*, **287**, 19294–19303.
- Forsburg, S.L. and Rhind, N. (2006) Basic methods for fission yeast. *Yeast*, **23**, 173–183.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) In: Christine Guthrie, G.R.F. (ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, Vol. 194, pp. 795–823.
- Bähler, J., Wu, J.-Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie III, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943–951.
- Deng, L., Sugiura, R., Takeuchi, M., Suzuki, M., Ebina, H., Takami, T., Koike, A., Iba, S. and Kuno, T. (2006) Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca²⁺-dependent pathways in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4790–4800.
- Stathopoulos, A.M. and Cyert, M.S. (1997) Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.*, **11**, 3432–3444.
- Pearson, R.B. and Kemp, B.E. (1991) In: Tony Hunter, B.M.S. (ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, Vol. 200, pp. 62–81.
- Lopez-Aviles, S., Grande, M., Gonzalez, M., Helgesen, A.L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J.B. and Aligue, R. (2005) Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol. Cell*, **17**, 49–59.
- Sanchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O. and Aligue, R. (2002) The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J. Biol. Chem.*, **277**, 17722–17727.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Pivnick-Worms, H. and Elledge, S.I. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, **277**, 1497–1501.

40. Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H. and Russell, P. (1999) Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cks1 and Chk1. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 833–845.
41. Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. and Russell, P. (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14–3–3 protein. *Nature*, **397**, 172–175.
42. Zeng, Y. and Piwnicka-Worms, H. (1999) DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14–3–3 binding. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7410–7419.
43. López-Avilés, S., Grande, M., González, M., Helgesen, A.-L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J.B.A. and Aliguer, R. (2005) Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol. Cell*, **17**, 49–59.
44. Hanyu, Y., Imai, K.K., Kawasaki, Y., Nakamura, T., Nakaseko, Y., Nagao, K., Kokubu, A., Ebe, M., Fujisawa, A., Hayashi, T. *et al.* (2009) Schizosaccharomyces pombe cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor. *Genes Cells*, **14**, 539–554.
45. Bimbó, A., Jia, Y., Poh, S.L., Karuturi, R.K.M., den Elzen, N., Peng, X., Zheng, L., O'Connell, M., Liu, E.T., Balasubramanian, M.K. *et al.* (2005) Systematic deletion analysis of fission yeast protein kinases. *Eukaryot. Cell*, **4**, 799–813.
46. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. and Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.*, **17**, 2205–2232.
47. Kafadar, K.A. and Cyert, M.S. (2004) Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot. cell*, **3**, 1147–1153.
48. Boustany, L.M. and Cyert, M.S. (2002) Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.*, **16**, 608–619.
49. Polizotto, R.S. and Cyert, M.S. (2001) Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J. Cell Biol.*, **154**, 951–960.
50. Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C.N. and Singh, R. (2010) Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol. Res.*, **61**, 269–280.
51. Hudry, E., Wu, H.-Y., Arbel-Ornath, M., Hashimoto, T., Matsouaka, R., Fan, Z., Spires-Jones, T.L., Betensky, R.A., Bacska, B.J. and Hyman, B.T. (2012) Inhibition of the NFAT pathway alleviates amyloid beta neurotoxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, **32**, 3176–3192.
52. Liu, S., Zhang, S., Bromley-Brits, K., Cai, F., Zhou, W., Xia, K., Mittelholtz, J. and Song, W. (2011) Transcriptional regulation of TMP21 by NFAT. *Mol. Neurodegrad.*, **6**, 21.
53. Abdul, H.M.F.J., Sama, A.M., Mathis, D.M. and Norris, C.M. (2010) NFATs and Alzheimer's disease. *Mol. Cell Pharmacol.*, **2**, 7–14.
54. Hernández, G.L., Volpert, O.V., Íñiguez, M.A., Lorenzo, E., Martínez-Martínez, S., Grau, R., Fresno, M. and Redondo, J.M. (2001) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and Cyclooxygenase 2. *J. Exp. Med.*, **193**, 607–620.
55. Mancini, M. and Toker, A. (2009) NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 810–820.
56. Pan, M.G.X.Y. and Chen, F. (2013) NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr. Mol. Med.*, **4**, 543–554.
57. Horikawa, K., Yamada, Y., Matsuda, T., Kobayashi, K., Hashimoto, M., Matsu-ura, T., Miyawaki, A., Michikawa, T., Mikoshiba, K. and Nagai, T. (2010) Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat. Methods*, **7**, 729–732.
58. Nakayama, Y., Yoshimura, K. and Iida, H. (2012) Organellar mechanosensitive channels in fission yeast regulate the hypo-osmotic shock response. *Nat. Commun.*, **3**, 1020.
59. Sio, S.O., Suehiro, T., Sugiura, R., Takeuchi, M., Mukai, H. and Kuno, T. (2005) The role of the regulatory subunit of fission yeast calcineurin in vivo activity and its relevance to FK506 sensitivity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 12231–12238.
60. Manke, I.A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M.Q., Elia, A.E.H. and Yaffe, M.B. (2005) MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell*, **17**, 37–48.
61. Martense, T.M., Martin, B.M. and Kincaid, R.L. (1989) Identification of the site on calcineurin phosphorylated by Ca²⁺/CaM-dependent kinase II: modification of the CaM-binding domain. *Biochemistry*, **28**, 9243–9247.
62. MacDonnell, S.M., Weisser-Thomas, J., Kubo, H., Hanscome, M., Liu, Q., Jaleel, N., Berretta, R., Chen, X., Brown, J.H., Sabri, A. *et al.* (2009) CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signalling in cardiac myocytes. *Circ. Res.*, **105**, 316–325.
63. Wen, Z., Guirland, C., Ming, G. and Zheng, J. (2004) A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca²⁺-dependent growth cone guidance. *Neuron*, **43**, 835–846.
64. De Windt, L.J., Lim, H.W., Taigen, T., Wencker, D., Condorelli, G., Dorn, G.W., Kitsis, R.N. and Molkentin, J.D. (2000) Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: an apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ. Res.*, **86**, 255–263.
65. Molkentin, J.D., Lu, J.-R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R. and Olson, E.N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, **93**, 215–228.
66. Wilkins, B.J. and Molkentin, J.D. (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**, 1178–1191.

RESEARCH ARTICLE

Ssp1 CaMKK: A Sensor of Actin Polarization That Controls Mitotic Commitment through *Srk1* in *Schizosaccharomyces pombe*

Alba Gómez-Hierro¹✉, Eva Lambea¹✉, David Giménez-Zaragoza¹, Sandra López-Avilés², Tula Yance-Chávez¹, Marta Montserrat¹, M. Jesús Pujol¹, Oriol Bachs¹, Rosa Aligue^{1*}

1 Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Catalunya, Spain, **2** The Biotechnology Centre of Oslo, Cell Cycle Regulation, Oslo, Norway

✉ These authors contributed equally to this work.

* alquerosa@ub.edu



CrossMark
Click for updates

Abstract

Background

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) is required for diverse cellular functions. Mammalian CaMKK activates CaMKs and also the evolutionarily-conserved AMP-activated protein kinase (AMPK). The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* CaMKK, Ssp1, is required for tolerance to limited glucose through the AMPK, Ssp2, and for the integration of cell growth and division through the SAD kinase Cdr2.

Results

Here we report that Ssp1 controls the G2/M transition by regulating the activity of the CaMK *Srk1*. We show that inhibition of Cdc25 by *Srk1* is regulated by Ssp1; and also that restoring growth polarity and actin localization of *ssp1*-deleted cells by removing the actin-monomer-binding protein, twinfilin, is sufficient to suppress the *ssp1* phenotype.

Conclusions

These findings demonstrate that entry into mitosis is mediated by a network of proteins, including the Ssp1 and *Srk1* kinases. Ssp1 connects the network of components that ensures proper polarity and cell size with the network of proteins that regulates Cdk1-cyclin B activity, in which *Srk1* plays an inhibitory role.

Introduction

Among the Ca²⁺/CaM-regulated enzymes found in eukaryotic cells, the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs) occupy positions of influence because they communicate the Ca²⁺ signal via phosphorylation to a wide range of substrates [1,2]. As one of

OPEN ACCESS

Citation: Gómez-Hierro A, Lambea E, Giménez-Zaragoza D, López-Avilés S, Yance-Chávez T, Montserrat M, et al. (2015) Ssp1 CaMKK: A Sensor of Actin Polarization That Controls Mitotic Commitment through *Srk1* in *Schizosaccharomyces pombe*. PLoS ONE 10(11): e0143037. doi:10.1371/journal.pone.0143037

Editor: Takashi Toda, Hiroshima University, JAPAN

Received: July 31, 2015

Accepted: October 29, 2015

Published: November 17, 2015

Copyright: © 2015 Gómez-Hierro et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2012-31220 to RA) and the Government of Catalonia (SRG2009-1526).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

the many serine/threonine and tyrosine kinase families, the CaMK group is distinguished by its large number of constituent kinases [3–5]. Despite its nomenclature, however, only the classic CaMK subgroups such as the CaMKII family as well as the CaMKK and CaMKI/CaMKIV families, are genuinely catalytically Ca^{2+} /CaM-dependent. Most of the kinases in the CaMK group lack the characteristic Ca^{2+} /CaM-sensitive regulatory domain. They nonetheless belong to the CaMK group, because they share significant homology in the primary structure of their kinase domains [3–5]. In the genome of *S. pombe*, five genes code for proteins that have a high similarity with mammalian CaMK sequences: Cmk1, Cmk2 and Srk1 show sequence similarity to CaMKs and; while Ckk2 and Ssp1 shows sequence similarity with CaMKKs. Among these, only the activity of Cmk1 kinase has been proven to be Ca^{2+} /CaM-dependent [6,7]. Cmk1 together with Ckk2 regulate cell growth in response to Ca^{2+} [2]. Recently, the CaMKK Ckk2 has also been shown to be required for nitrogen-stress-induced AMP kinase activation (Ssp2) [8]. Cmk2 and Srk1 are related to the mammalian CaM-kinases and also to MAPKAP (MAP kinase-activated protein) kinases because they bind to and are activated by the MAPK (mitogen-activated protein kinase) p38/Sty1 [9–13]. Ssp1 also encodes a serine/threonine kinase with high similarity to the human CaM-kinase kinase (CaMKK) (42% identity) [14], described as the upstream activating kinase of CaMK [2]. Although there is no evidence of any Ca^{2+} /CaM-dependent activity of Ssp1, it has recently been shown that Ssp1 has a conserved putative calmodulin binding domain (CBD) and a short stretch outside the kinase domain when compared to the amino acid sequences of human CaMKK1 and CaMKK2 [14]. In addition, Ssp1 shares a functional substrate with human CaMKKs, the AMP-activated protein kinase (Ssp2) [14–18]. Initially, Ssp1 kinase was reported to be required for growth polarity and actin localization at high temperature [19, 20]. Ssp1 mutants are unable to undergo the transition from monopolar to bipolar growth (new end take-off, NETO) and cells delay cell cycle progression into mitosis [19, 20]. NETO requires the completion of DNA replication and a critical cell size to be reached, indicating the existence of a signalling pathway that monitors these two requirements and regulates NETO during the cell cycle. Many of the genes involved in NETO have been identified and subsequently classified into four groups. Protein kinases constitute the largest group: Kin1 (Par-1/MARK-like), Pom1 (DYRK-like), Orb1 (PAK-like), Orb6 and Ssp1 [21, 22]. Ssp1 and Pom1 have recently been identified as part of a mechanism that controls cell growth and division, in which the SAD family kinase Cdr2 plays a key role [23]. Cdr2 promotes mitotic entry by inhibiting Wee1 kinase when the cell has reached the correct size. The activation of Cdr2 is achieved by the Ssp1 kinase through phosphorylation of a conserved threonine residue (Thr166) in the activation loop of the Cdr2 N-terminal kinase. Moreover, during cell growth, Pom1 also phosphorylates Cdr2 in the C-terminal domain, thus reducing Cdr2-T166 phosphorylation by Ssp1. Therefore, the activation of the mitotic inducer Cdr2 by Ssp1 is integrated with an inhibitory spatial gradient of Pom1 which ensures proper cell size control at mitosis.

Here, we studied whether the CaMKK Ssp1 regulates the fission yeast family of CaM-dependent kinases. We found that regulation of mitosis by Ssp1 is dependent on Srk1; we also found a link between both Ssp1 and the actin-binding protein Twf1, and the control of NETO. Srk1 and Twf1 can thus be added to the list of members of the network that controls the integration of cell growth and division.

Material and Methods

Fission yeast strains, media and techniques

The *S. pombe* strains used in this study are listed in [Table 1](#).

Table 1. *Schizosaccharomyces pombe* strains.

Strain	Genotype	Source
RA2501	<i>h- leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
MA6	<i>h- ssp1::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Matsusaka et al.1995
RA1530	<i>h- srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA1058	<i>h- srk1::kanMX6 ssp1::ura4 leu1-32</i>	This work
RA2663	<i>h- cmk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA0778	<i>h- cmk2::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA2502	<i>h- sty1::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA2726	<i>h- cmk1::kanMX6 ssp1::ura4 leu1-32</i>	This work
RA1057	<i>h- cmk2::ura4 ssp1::ura4 leu1-32</i>	This work
RA2236	<i>wee1::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
S1299	<i>h* cdc25-9A leu1-32</i>	H. Piwnica-Worms & P. San-Segundo
RA1973	<i>h- ssp1::ura4 cdc25-9A leu1-32</i>	This work
RA1949	<i>h- twf1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA2120	<i>h- ssp1::ura4 twf1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA1775	<i>h- for3::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA1776	<i>h- ssp1::ura4 for3::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA1809	<i>h- twf1:13myc::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA1970	<i>h- ssp1::ura4 alp3::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA1964	<i>h- alp1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA1965	<i>h- ssp1::ura4 alp1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA0132	<i>h- wee1-50 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA118	<i>h- srk1::kanMX6 wee1-50 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA1943	<i>h- ssp1::ura4 wee1-50 leu1-32 ura4-D18</i>	Lab stock
RA3423	<i>h- ssp1::ura4 srk1::kanMX6 wee1-50 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA3302	<i>h- srk1::kanMX6 cdr2::hphMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA3303	<i>h- ssp1::ura4 srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work
RA3304	<i>h- ssp1::ura4 srk1::kanMX6 cdr2::hphMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	This work

doi:10.1371/journal.pone.0143037.t001

General yeast techniques and manipulations were carried out as previously described [24]. Cells were grown either in YE (yeast extract) medium or Edinburgh minimal medium (EMM) with appropriate supplements. All strains were cultured at 30°C except during temperature-sensitive assays, during which strains were grown either at the permissive temperature of 25°C or at the restrictive temperature of 36°C as indicated. *S. pombe* transformations were carried out using either a lithium acetate method [25] or electroporation [26]. Gene deletion and epitope tagging were carried out as described elsewhere [27]. DNA was prepared from bacteria and isolated from agarose gels using Qiagen kits.

Immunochemical analysis and microscopy

Cells were grown from 6 h to overnight at 36°C, fixed with methanol at -20°C, mounted with Mowiol (Calbiochem), and cell imaging was performed under a Leica SP5 Confocal Microscope. For actin staining, cells were fixed with formaldehyde 60%, washed twice in PM Buffer (35 mM K-Phos pH 6.8, 0.5 mM MgSO₄), permeabilized with 1% Triton X-100, washed twice in PM Buffer, and stained with phalloidin conjugated-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Molecular probes) for 40 min in the dark. Cells were mounted and cell imaging was performed under a

Leica SP5 Confocal Microscope. Image analysis and measurements were carried out using Image J.

Immunoprecipitation and Western blotting analysis

Aliquots of 1×10^8 cells were lysed in buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM NaVO_4 , 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin). Protein immunoprecipitation was performed from cell extracts with either protein A or protein G Sepharose beads, and immunoprecipitates were washed four times in lysis buffer prior to analysis. Proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) and analyzed by Western blotting. The following primary antibodies were used: polyclonal anti-Cdc25 (1/1000), monoclonal anti-HA (12CA5, Roche, Indianapolis, IN; 1/1000); polyclonal anti-PSTAIR (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; 1/1000), and monoclonal anti-myc (9E10; 1/1000). Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Bio-Rad, Richmond, CA) were used as secondary antibodies. Membranes were developed by enhanced chemiluminescence (ECL kit, Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ).

Results

Deletion of Srk1 kinase suppresses the mitotic delay of *ssp1Δ*

To assess the interaction between Ssp1 and previously identified CaMK homologues in fission yeast, we created double mutants between *ssp1Δ* and the kinases *cmk2Δ*, *srk1Δ* and *cmk1Δ*. Their effects were analyzed at 35°C, at which the cell division of *ssp1Δ* is arrested, leading to an elongated phenotype. Only *srk1Δ* rescued the cell division arrest of *ssp1Δ* cells (Fig 1A and S1 Fig). The cell elongation phenotype of *ssp1Δ* cells was also rescued by *srk1Δ* (Fig 1B).

Srk1 operates downstream of Ssp1 activity

To evaluate whether Srk1 interferes with Ssp1 activity, the slow cell growth exhibited by overexpression of Ssp1 was analyzed in *srk1Δ* and *cmk2Δ* cells. Only *srk1Δ* cells suppressed the slow growth related with Ssp1 overexpression (Fig 2A), indicating that Srk1 is necessary for Ssp1 activity. In order to rule out the possibility that the deletion of any negative regulator of mitosis could suppress the Ssp1 slow growth phenotype, Ssp1 was also overexpressed in *wee1Δ* cells. Deletion of *wee1* did not suppress the slow growth related with Ssp1 overexpression (Fig 2B).

Srk1 was overexpressed in *ssp1Δ* cells and the cell cycle arrest caused by the overexpression of Srk1 was not abolished, indicating that Ssp1 is upstream of Srk1 (Fig 2C). The same was done with Cmk2, and as shown in Fig 2C, deletion of *ssp1* did not abolish the cell cycle arrest caused by Cmk2, showing that Cmk2 and Ssp1 are independent.

Deletion of Ssp1 increases the abundance of Cdc25 in a Srk1-dependent manner

Srk1 inhibits the G2/M transition by phosphorylation of Cdc25, which provokes Cdc25 stabilization through binding to the 14.3.3 protein Rad24 [10]. The fact that the *srk1* mutant suppressed the cell cycle delay of *ssp1Δ* suggests that Srk1 was activated and consequently, inhibited the cell cycle progression in *ssp1Δ* cells. To test the activation of Srk1 we analyzed the levels of Cdc25 protein in *ssp1Δ* and *ssp1Δ srk1Δ* cells compared to the levels in *srk1Δ* cells as negative control. Cdc25 protein levels were stable, being increased in *ssp1Δ* cells and decreased in the double mutant *ssp1Δ srk1Δ* as in *srk1Δ* cells (Fig 3A).

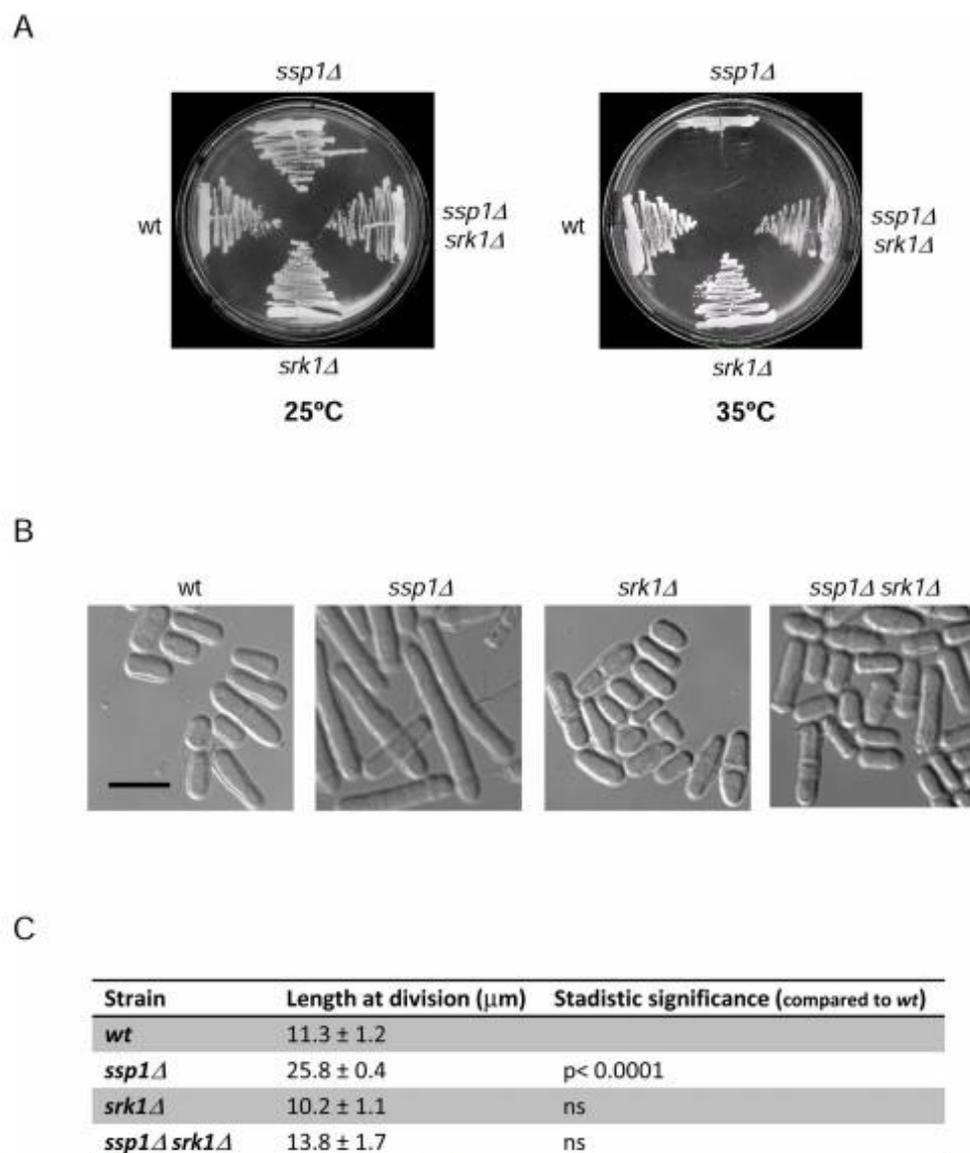


Fig 1. Srk1 deletion rescues cell cycle arrest due to the absence of Ssp1. A. Wild-type (wt), *ssp1* Δ , *srk1* Δ and *ssp1* Δ *srk1* Δ cells were grown on YES plates for 3 days at 25°C and 35°C. B. Wild-type (wt), *ssp1* Δ , *srk1* Δ and *ssp1* Δ *srk1* Δ cells were grown at 25°C in YES liquid medium to mid-log phase before being transferred to 35°C for 9 hours and visualized microscopically. Scale bar, 10 μm . C. Length of dividing septated cells of the indicated strains (mean \pm SD; $n > 50$ for each value). Statistic significance compared to wild type performed by t-test analysis of 3 values.

doi:10.1371/journal.pone.0143037.g001

To further investigate whether Srk1 delays the *ssp1* Δ cell cycle by inhibiting Cdc25, we assessed the cell cycle progression of *ssp1* Δ *cdc25-9A* double mutant cells, in which the endogenous *cdc25* gene has nine Srk1-phosphorylation sites mutated to alanine. We observed that mutation of Srk1-phosphorylation sites of Cdc25 abolished the cell cycle arrest of *ssp1* Δ (Fig

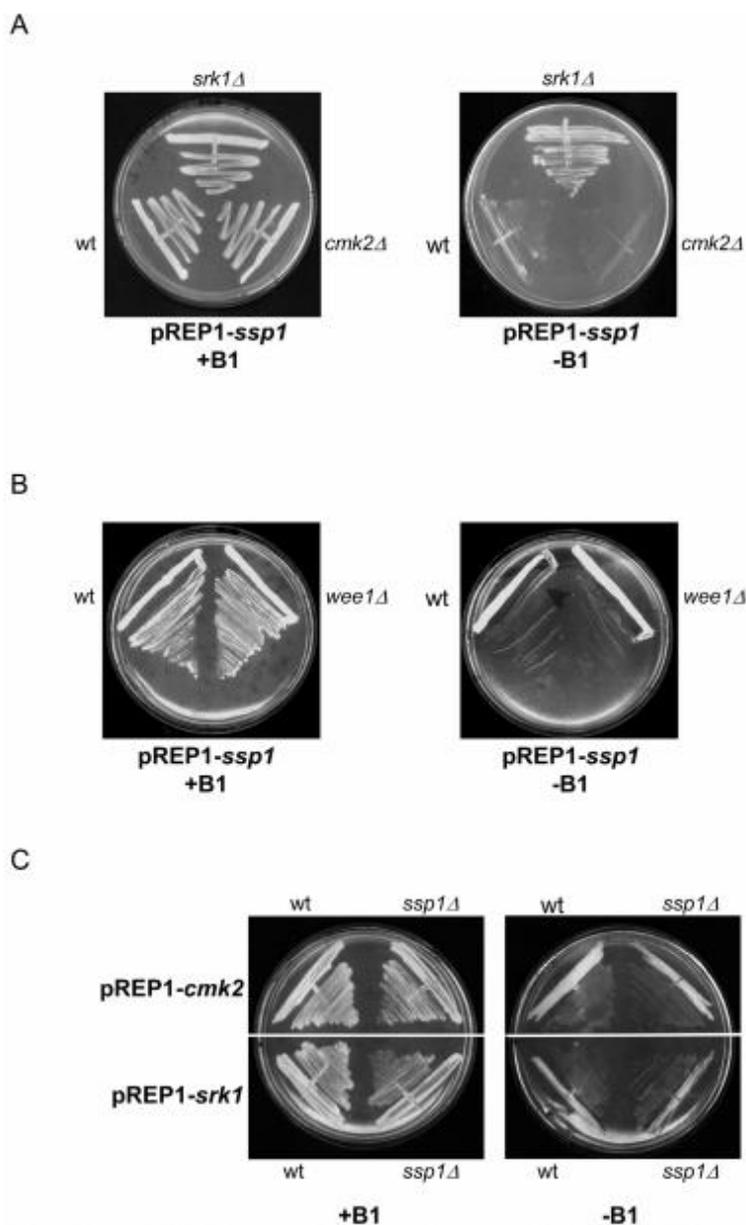


Fig 2. Ssp1 acts upstream of *Srk1*. A. Wild-type, *srk1Δ* and *cmk2Δ* cells transformed with pREP1-*ssp1* were grown in liquid culture cells, either in the absence of thiamine (-B1) or presence of thiamine (+B1) for 3 days. B. Wild-type and *wee1Δ* cells transformed with pREP1-*ssp1* were grown in liquid culture cells, either in the absence of thiamine (-B1) or presence of thiamine (+B1) for 3 days. C. Wild-type and *ssp1Δ* cells transformed with pREP1-*cmk2* and pREP1-*srk1* were grown in liquid culture cells, either in the absence of thiamine (-B1) or presence of thiamine (+B1) for 3 days.

doi:10.1371/journal.pone.0143037.g002

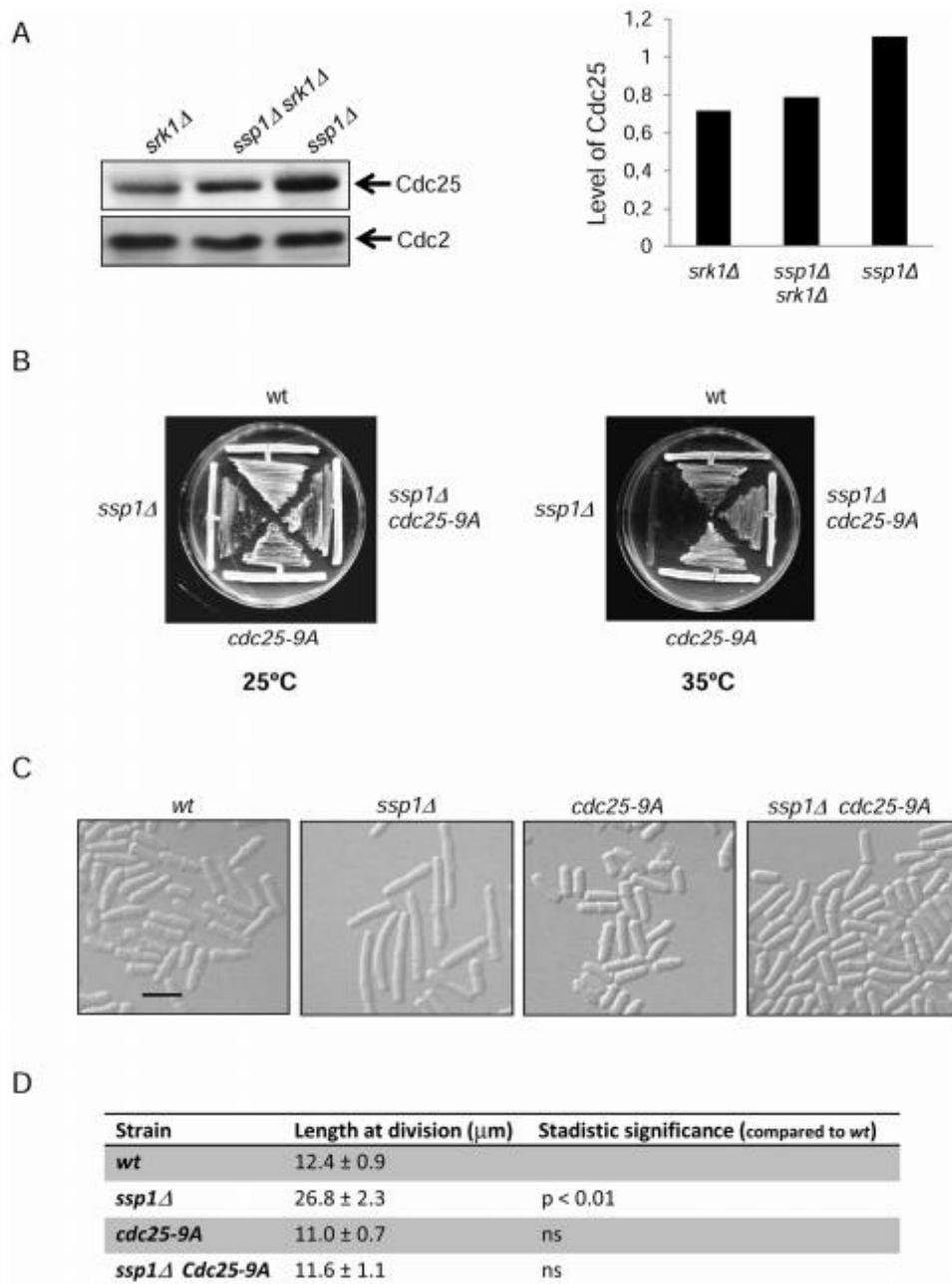


Fig 3. Srk1 is activated in *ssp1 Δ* cells, causing accumulation and phosphorylation of Cdc25. A. Cell extracts were prepared from *ssp1 Δ* , *srk1 Δ* and *ssp1 Δ srk1 Δ* cells and analyzed by Western blot to monitor the levels of Cdc25 with anti-Cdc25 (top) or Cdc2 with anti-PSTAIR antibodies as a loading control (bottom). The graph represents the quantification of the Cdc25 protein level regarding the Cdc2 load control. B. Wild-type (wt), *ssp1 Δ* , *cdc25-9A* and *ssp1 Δ cdc25-9A* cells were grown in YES media for 3 days at 25°C and 35°C. C. Wild-type (wt), *ssp1 Δ* , *cdc25-9A* and *ssp1 Δ cdc25-9A* cells were grown at 25°C in YES liquid medium to mid-log phase before being transferred to 35°C for 12 hours and visualized microscopically. Scale bar, 10 μm . D. Length of

dividing septated cells of the indicated strains (mean \pm SD; $n > 50$ for each value). Statistic significance compared to wild type performed by t-test analysis of 3 values.

doi:10.1371/journal.pone.0143037.g003

3B). The cell elongation phenotype of *ssp1Δ* cells was also rescued by *cdc25-9A* (Fig 3C and 3D). We conclude that *Srk1* inhibitory activity is required for cell division arrest in *ssp1Δ* cells.

Ssp1 is necessary to maintain cell viability in the absence of *Wee1* and *Srk1*

It was recently reported that *Ssp1* activates *Cdr2* which in turns inactivates *Wee1* kinase when cells reach mitotic size [23]. We have analyzed the cell growth of the double mutant *ssp1Δ cdr2Δ* at 35°C; as expected, cell growth was arrested as in *ssp1Δ* cells (Fig 4A). Moreover when *srk1* was deleted from the *ssp1Δ cdr2Δ* cells, cell growth was restored (Fig 4A).

We next analyzed whether the absence of *wee1* kinase rescued cell growth arrest in *ssp1Δ* cells. As Fig 4B shows, cell growth is not rescued by the loss of *wee1* (*wee1-50* mutant). We also examined the double mutant *wee1-150 srk1Δ*; it was interesting to observe that cells growth better than *wee1-50* or *srk1Δ* single mutants (Fig 4B). When *ssp1* was deleted in the double mutant *wee1-150 srk1Δ* cell growth was arrested (Fig 4B).

Bipolar growth defects of *ssp1Δ* cells are independent of *Srk1*

Ssp1 is required for the efficient initiation of a second site of polarized growth at the NETO [19, 20]. We analyzed whether *Srk1* is involved in this *Ssp1* function by examining the actin localization in the double mutant *ssp1Δ srk1Δ* cells. As shown in Fig 5, actin patches were accumulated in one cell tip in *ssp1Δ srk1Δ* cells as in the single mutant *ssp1Δ* (Fig 5A and 5B). Thus, the monopolar growth of *ssp1Δ* cells is not controlled by *Srk1* activity.

Deletion of twinfilin (*twf1*) rescues *ssp1Δ* bipolar growth defects

ssp1Δ cells show the monopolar localization of actin patches and therefore monopolar growth. It is also known that activation of actin mobilization is sufficient for reestablishing bipolar growth in *ssp1Δ* cells [19]. Twinfilin (*Twf1*) is an actin-monomer-binding protein that inhibits nucleotide exchange on actin monomers and prevents assembly of the monomers into filaments [28]. Therefore, we investigated whether the *Twf1* protein is involved in *Ssp1*-actin dynamic regulation. We analyzed the actin localization of *twf1Δ* and the double mutant *ssp1Δ twf1Δ* cells and found that deletion of *twf1* suppressed the monopolar localization of the actin patches in *ssp1Δ* cells, thus activating NETO (Figs 6A and 5B).

We next analyzed whether *twf1Δ* rescued the *ssp1Δ* growth defect at 35°C and indeed, deletion of *twf1* suppressed *ssp1Δ* lethality at 35°C (Fig 6B).

Analysis of the cell length also indicated that *twf1Δ* suppressed the cell cycle delay of *ssp1Δ* cells manifested as an elongated phenotype (Fig 6C).

To study whether *Ssp1* regulates *Twf1* directly, the interaction between *Ssp1* and *Twf1* was analyzed. Cells co-expressing *Ssp1* or *Ssp1*-KA (catalytically inactive *Ssp1*) and *Twf1* tagged with different epitopes (*Ssp1/Ssp1*-KA-HA and *Twf1*-myc respectively) were pulled down from exponentially growing yeast cell extracts. *Ssp1/Ssp1*-KA was immunoprecipitated with anti-HA-beads and the presence of *Srk1*-myc was examined by Western blot. As Fig 6D shows, *Twf1* was pulled down together with *Ssp1* and also with the catalytically inactive *Ssp1*-KA.

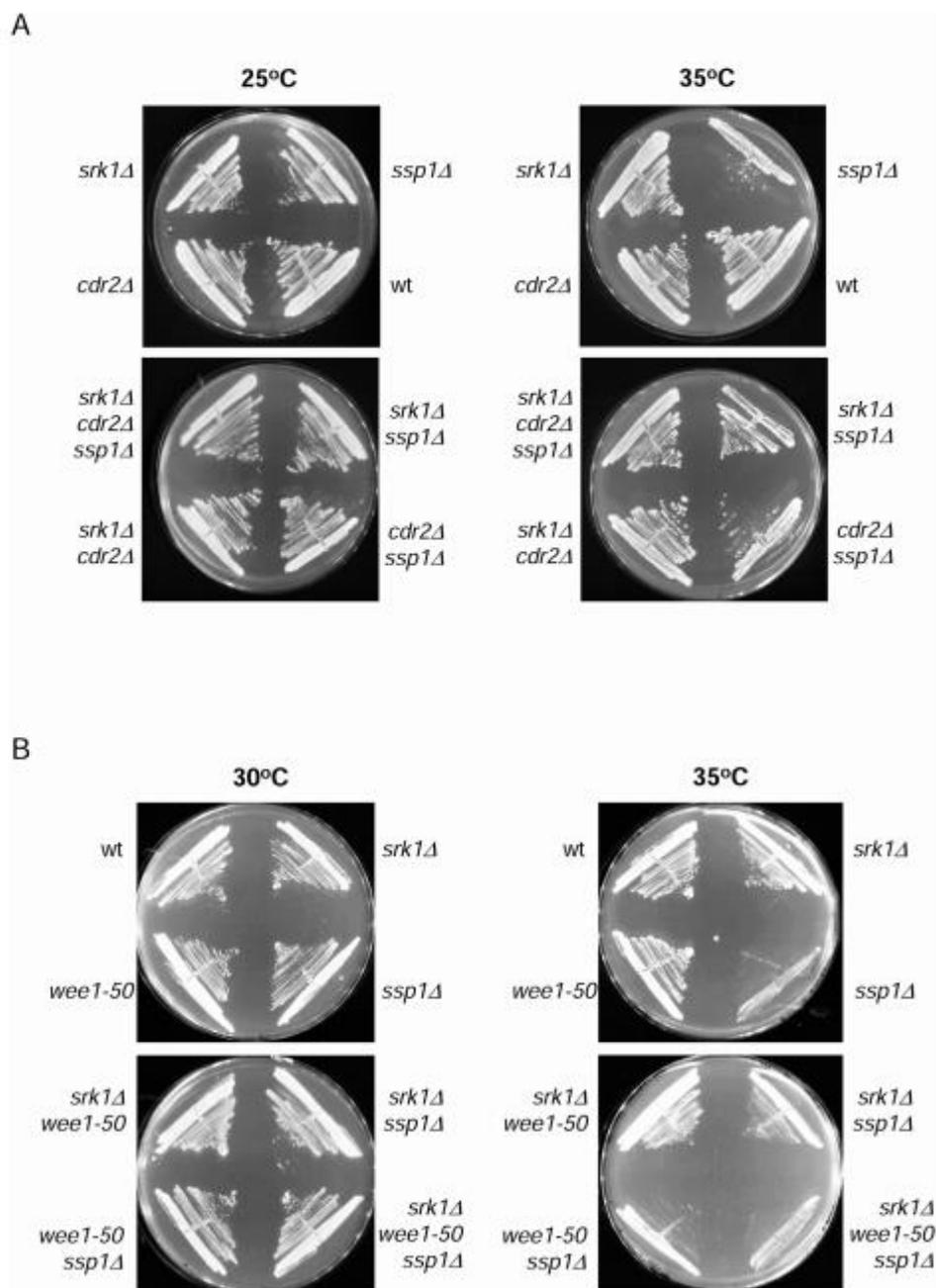
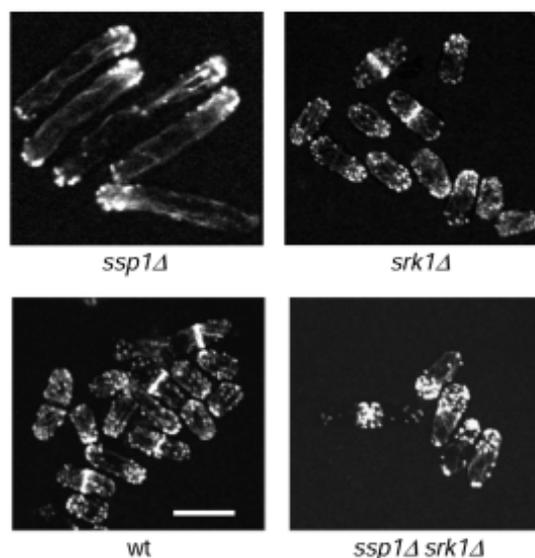


Fig 4. The rescue of the slow growth of *ssp1* deletion by *srk1Δ* is abolished by the absence of *wee1*. A. Wild-type (*wt*), *ssp1Δ*, *srk1Δ*, *cdr2Δ* and the double mutants *ssp1Δ srk1Δ*, *ssp1Δ cdr2Δ*, *srk1Δ cdr2Δ* and the triple mutant *ssp1Δ srk1Δ cdr2Δ* cells were grown in YES plates for 3 days at 25°C and 35°C. B. Wild-type (*wt*), *ssp1Δ*, *srk1Δ*, *wee1-50* and the double and triple mutants *ssp1Δ wee1-50*, *srk1Δ wee1-50*, *ssp1Δ srk1Δ*, and *ssp1Δ srk1Δ wee1-50* cells were grown in YES plates for 3 days at 30°C and 35°C.

doi:10.1371/journal.pone.0143037.g004

A



B

Strain	Monopolar cells (%)	Bipolar cells (%)	Septated cells (%)
wt	43.7 ± 1.5	36.7 ± 0.6	21.3 ± 1.5
<i>ssp1Δ</i>	62.3 ± 1.1 ***	26.6 ± 6.1 *	07.0 ± 1.0 ***
<i>srk1Δ</i>	38.3 ± 2.1 *	45.0 ± 1.0 **	18.7 ± 3.8 ns
<i>twf1Δ</i>	42.7 ± 2.5 ns	35.3 ± 2.5 ns	21.7 ± 2.1 ns
<i>ssp1Δ srk1Δ</i>	66.7 ± 2.5 ***	18.7 ± 1.5 ***	17.0 ± 1.0 *
<i>ssp1Δ twf1Δ</i>	38.6 ± 1.2 *	38.3 ± 4.2 ns	22.7 ± 3.7 ns

Fig 5. Monopolar actin distribution in double *srk1 ssp1*-deleted cells. A. Localization of actin in wild-type, *ssp1Δ*, *srk1Δ* and *ssp1Δ srk1Δ* cells grown at 35°C for 12 hours and visualized microscopically, single focal planes. Scale bar, 10 μm. B. Frequency of growth polarity after 9 hours at 35°C. Next to the frequency is shown the statistic significance compared to wild-type by T-test of 3 values of each strain. The p value of the symbols is p > 0.05 (ns), p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***) and p < 0.0001 (****).

doi:10.1371/journal.pone.0143037.g005

Discussion

Srk1 activity in G2/M transition is dependent on *Ssp1*

The activation of Cdk1-cyclin B and the subsequent triggering of mitosis is controlled by the phosphorylation status of the Cdk1 catalytic subunit. Cdk1 phosphorylated by Wee1 blocks mitosis activation until Cdc25 phosphatases remove the phosphate to drive division. Moreover, entry into mitosis is mediated by a network of proteins that regulate the activation of the Cdk1 complex. Within this network, several components act to swing the balance to a mitotic commitment by ensuring the complete activation of Cdk1. Here, we report that the CaMKK *Ssp1* is one of the players that ensures activation of Cdk1 by negatively controlling *Srk1* and thereby

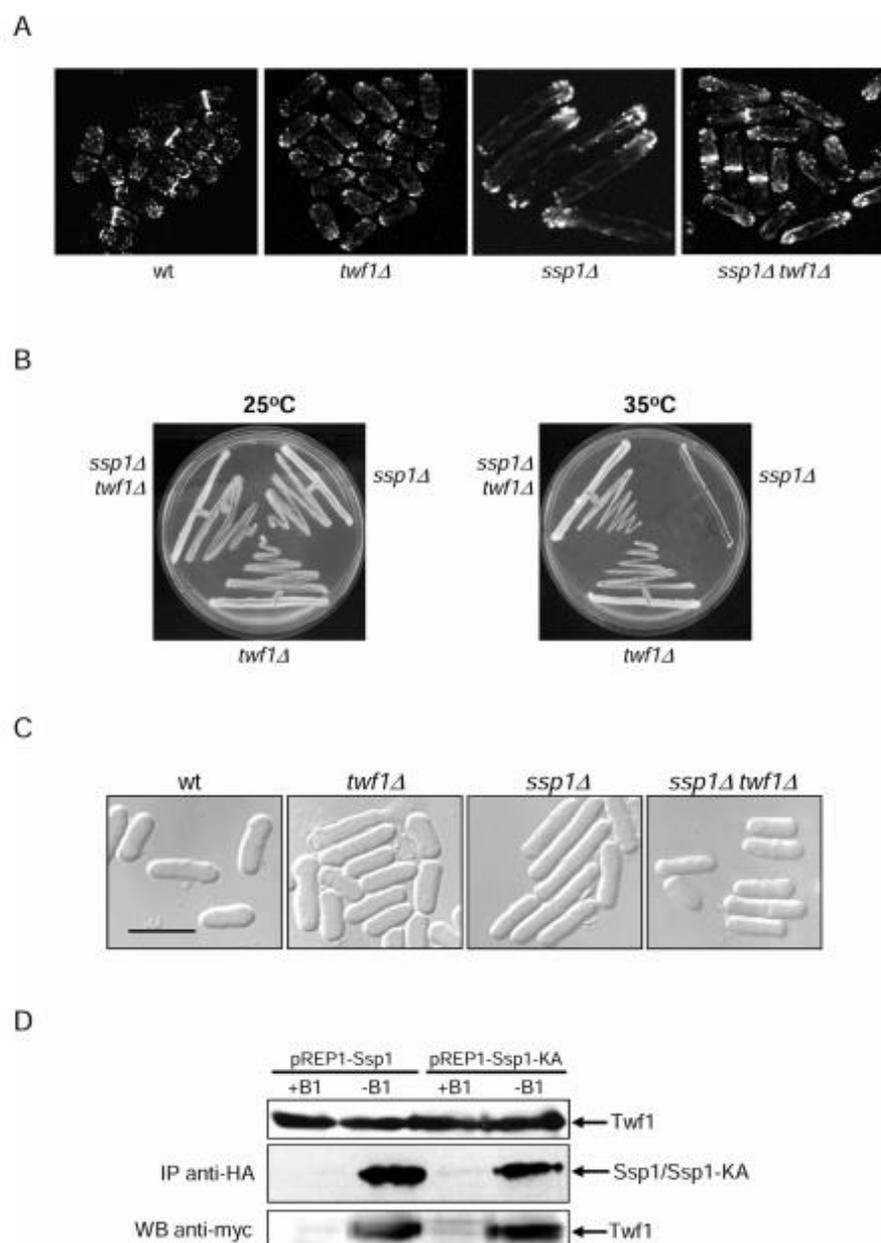


Fig 6. Absence of twinfilin restores bipolar actin localization and cell division of *ssp1*-deleted cells. A. Localization of actin in wild-type, *ssp1Δ*, *twf1Δ* and *ssp1Δ twf1Δ* cells grown at 35°C for 12 hours and visualized microscopically, single focal planes. Scale bar, 10 μm. B. Wild-type (*wt*), *ssp1Δ*, *twf1Δ* and *ssp1Δ twf1Δ* cells were grown on YES plates for 3 days at 25°C and 35°C. C. Wild-type (*wt*), *ssp1Δ*, *srk1Δ* and *ssp1Δ srk1Δ* cells were grown at 25°C in YES liquid medium to mid-log phase before being transferred to 35°C for 9 hours and visualized microscopically. Scale bar, 10 μm. D. Ssp1 interacts with Twf1. Twf1-9myc cells were transformed with pREP1-*ssp1* and pREP1-*ssp1*-KA and grown in the presence (+B1) or absence (-B1) of thiamine. Ssp1-HA was immunoprecipitated from cells extracts and analyzed by Western blot for the presence of Ssp1 and Twf1 with anti-HA and anti-myc antibodies, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0143037.g006

allowing Cdc25 activation. Deletion of *ssp1* arrests the cell cycle in the G2/M transition. This cell cycle arrest appears to stem from Srk1 activation. This is supported by our results showing that deletion of *srk1* rescues cell cycle progression of the arrested *ssp1Δ* cells.

The activation of Srk1 provokes Cdc25 phosphorylation; Cdc25 activity is consequently inhibited and the Cdc25 protein stabilized [10, 11]. The stabilization of Cdc25 ensures its rapid incorporation and the activation of Cdk1 after the arrest [10]. We showed that the Cdc25 protein is stabilized, and thus protein levels increased, in *ssp1*-depleted cells, and decreased when *srk1* was removed from these cells. This indicates that the maintenance of Cdc25 protein is dependent on Srk1 kinase. Further evidence that cell cycle arrest in *ssp1*-deleted cells is due to Cdc25 inhibition dependent on Srk1 activity was provided by the finding that mutation of Srk1-dependent phosphorylation sites in Cdc25 was sufficient to rescue the cell cycle arrest of *ssp1Δ* cells.

Furthermore, we also analyzed the overexpression of Ssp1 in the *srk1* mutant. Ssp1 overexpression caused slow growth and an abnormal phenotype, cells showed a pear or round shape, due to the actin misallocation by Ssp1 [19]. The slow growth and abnormal phenotype resulting from Ssp1 overexpression was rescued by deleting *srk1*. This observation does not correlate with the role of Ssp1 in the cell cycle by regulating negatively Srk1. Accordingly, overexpression of Ssp1 in *srk1* deleted cells should be the same as overexpression in wild type cells; but that was not the case. However this observation indicates that Srk1 is necessary for the Ssp1 morphological function regarding the cytoskeleton.

Mitotic commitment is integrated with cell size control. The key to this integration is the SAD family kinase Cdr2, which organizes cortical nodes in the center of the cell and promotes mitotic entry through the inhibition of Wee1 [29, 30]. It was recently reported that Ssp1 activates Cdr2 through the phosphorylation of a conserved threonine residue (T166) in the activation loop. The level of Cdr2-threonine 166 phosphorylation increased along the cell cycle and was reduced in a Pom1-dependent manner, before the cells reached mitotic size [23, 31]. Interestingly, while the double *cdr2-T166A ssp1Δ* mutant cells showed the same phenotype as *ssp1Δ* cells, the double mutant *cdr2Δ ssp1Δ* showed an enhanced phenotype. Cells were longer than in the *cdr2-T166A ssp1Δ* mutant [23], indicating that the Ssp1-Cdr2 axis must exert additional cell cycle control. This observation correlates with our results which indicates that Srk1 activity is connected with the Ssp1-Cdr2 axis and cell size control, as deletion of *srk1* rescues cell growth of the double mutant *cdr2Δ ssp1Δ*. Therefore, Ssp1 kinase causes the onset of mitosis via activation of Cdr2 and Cdc25, by controlling Srk1 activity. Moreover, if Ssp1 inhibits Wee1 through Cdr2, we may expect that *wee1* deletion would rescue *ssp1Δ* cell cycle arrest; but that was not the case. Even when cell cycle was accelerated due to the loss of both the *wee1* and *srk1* genes, deletion of *ssp1* blocked cell cycle progression. This observation points the role of Wee1 in cell morphology together with Ssp1.

Ssp1 operates as a sensor of actin flowthrough

Ssp1 has also been identified as being necessary for the initiation of growth at the new cell end (NETO) following division and stress-induced reorganization of the actin cytoskeleton in fission yeast [19, 20]. The *ssp1*-deleted cells exhibited a monopolar actin distribution. Although our data revealed that deletion of *srk1* rescues the cell cycle arrest of *ssp1Δ* cells, it did not reestablish bipolar growth; indicating that Srk1 is not involved in Ssp1-actin allocation during cell division. It was reported that NETO could be induced in *ssp1Δ* cells by exposure to KCl or latrunculin A pulse treatment; both of which induce a transient redistribution of actin monomers [20]. The experiments with this, we identified twinfilin as the actin-monomer-binding protein involved in the bipolar-growth function of Ssp1. Surprisingly, restoring the actin monomer stream was sufficient to rescue cell cycle arrest of *ssp1Δ*. We tested additional actin

regulatory proteins such as formin (*For3*, *Aip1* and *Aip3*) [32–34] to examine whether the absence of any actin-nucleator or actin-binding protein would rescue cell cycle arrest of *ssp1Δ*, but found that the deletion of *For3*, *Aip1* or *Aip3* had no effect (S2 Fig).

Twinfilin is present in eukaryotes from yeasts to mammals. Despite its sequence homology with ADF/cofilin, twinfilin binds to monomeric actin and does not promote actin-filament depolymerization [35]. Twinfilin is an abundant protein that localizes in cortical actin patches in wild-type yeast cells and this localization is dependent on a direct interaction with capping proteins [36]. Twinfilin also interacts with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (IP_{4,5}P₂) and its actin monomer-sequestering activity is inhibited by IP_{4,5}P₂ [36]. However, the mechanistic role of twinfilin in actin disassembly is unclear [37]. Mutations of twinfilin, in budding yeast and *Drosophila*, result in an enlargement of cortical actin patches and defects in actin-dependent developmental processes, respectively [38]. Furthermore, deletion of twinfilin from budding yeast is synthetically lethal with certain cofilin and profilin mutations; this indicates its role in the regulation of actin dynamics *in vivo* [38].

Interestingly, in mammalian cells, twinfilin has been identified as a target of the microRNA-30c (miR-30c) [39, 40] and RunX2 transcription factor [41]. In breast cancer cells, twinfilin promotes epithelial to mesenchymal transition and together with miR-30c regulates invasion and chemoresistance [39, 40]. In addition, twinfilin regulates the expression of interleukin 11 (IL-11) at both the mRNA and protein levels; although the detailed mechanisms has yet to be elucidated [39]. It has been proposed, that twinfilin regulates IL-11 through sequestering the actin monomers pool; as a consequence, a reduced actin monomer pool could release actin-bound specific transcription factors, thereby activating its nuclear translocation [39].

Moreover, twinfilin was found to be upregulated in genome-wide mRNA expression changes in prostate cancer cells in response to Runx2 [41]. Runx2 is an osteoblast master transcription factor that is aberrantly expressed in prostate cancer cells and promotes their metastatic phenotype. The major functions reported for the genes up-regulated by Runx2 belonged to cancer progression. These genes encode transcriptional regulators, signaling molecules, peptidases involved in tumor metastasis and actin cytoskeleton dynamics, where twinfilin was included [41].

In fission yeast, nothing is known about the expression or dynamics of *Twf1* in cell cycle progression. It is possible that *Twf1* regulates the cellular localization of specific transcription factors associated with the actin cytoskeleton. Therefore, *Twf1*, by sequestering actin monomers, may help to release the transcription factors and allow their nuclear translocation; in a way similar to that proposed in mammalian cells. However, neither do we know the mechanism by which *Ssp1* influences *Twf1*. Our results show that *Twf1* and *Ssp1* coprecipitate, this association could be located at the membrane. Since, *Ssp1* localizes at the plasma membrane under stress conditions [20, 42] and *Twf1* binds IP_{4,5}P which inhibits its monomer-sequestering activity [36]. Further studies will be necessary to reveal the specific mechanism of *Twf1* regulation and its role in cell cycle control.

Overall, our data suggest that *Ssp1* is part of a complex of proteins that control cell cycle progression, such as *Srk1* and *Cdr2*, as well as proteins that regulate actin polarization, such as *Twf1*. It is thus proposed that *Ssp1* is a sensor of actin flow to regulate cell cycle progression.

Supporting Information

S1 Fig. Interaction between *Ssp1* and the CaMKs, *Cmk2* and *Cmk1* kinases. Wild type (wt), *cmk1Δ*, *cmk2Δ*, *ssp1Δ*, *cmk1Δ ssp1Δ*, *cmk2Δ ssp1Δ* and *sty1Δ* cells were grown in YES medium and spotted on YES plates and incubated for 3 days at 25°C and 35°C. (TIF)

S2 Fig. Interaction of the Ssp1 with actin regulatory proteins. (A) *ssp1Δ*, *for3Δ* and *ssp1Δ for3Δ* cells were grown on YES plates for 3 days at 25°C and 35°C. (B) *ssp1Δ*, *aip1Δ* and *ssp1Δ aip1Δ* cells were grown on YES plates for 3 days at 25°C and 35°C. (C) *ssp1Δ*, *aip3Δ* and *ssp1Δ aip3Δ* cells were grown on YES plates for 3 days at 25°C and 35°C. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Takashi Toda and Dr. Paul Young for the *S. pombe* strains, and Dr. Maria Calvo, Anna Bosch and Elisenda Coll for assistance with confocal microscopy.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RA. Performed the experiments: AGH EL DGZ SLA TYC. Analyzed the data: AGH OB RA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJP MM. Wrote the paper: RA.

References

1. Hook SS, Means AR. Ca²⁺/CaM-dependent kinases: From activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001; 41:471–505. PMID: [11264466](#)
2. Soderling TR, Stull JT. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem. Rev.* 2001; 101:2341–52. PMID: [11749376](#)
3. Ohmae S, Takemoto-Kimura S, Okamura M, Adachi-Morishima A, Nonaka M, Fuse T, et al. Molecular identification and characterization of a family of kinases with homology to Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases IV. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:20427–39. PMID: [16684769](#)
4. Caenepeel S, Charydczak G, Sudarsanam S, Hunter T, Manning G. The mouse kinome: Discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci United States Am* 2004; 101:11707–11712.
5. Manning G, Whyte D B, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 2004; 298:1912–1934.
6. Rasmussen C D. Cloning of a calmodulin kinase I homologue from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:685–90. PMID: [10617667](#)
7. Cisneros-Barroso E, Yance-Chávez T, Kito A, Suglira R, Gómez-Hierro A, Giménez-Zaragoza D, et al. Negative feedback regulation of calcineurin-dependent Prz1 transcription factor by the CaMKK-CaMK1 axis in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42:9573–9587. doi: [10.1093/nar/gku684](#) PMID: [25081204](#)
8. Davie E, Forte G M A, Petersen J. Nitrogen Regulates AMPK to Control TORC1 Signaling. *Curr. Biol.* 2015; 25:445–454. doi: [10.1016/j.cub.2014.12.034](#) PMID: [25639242](#)
9. Alemany V, Sanchez-piris M, Bachs O, Alligue R. Cmk2, a novel serine/threonine kinase in fission yeast. *FEBS Lett.* 2002; 524:79–86. PMID: [12135745](#)
10. López-Avilés S, Grande M, González M, Helgesen A-L, Alemany V, Sanchez-Piris M, et al. Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol. Cell* 2005; 17:49–59. PMID: [15629716](#)
11. López-Avilés S, Lambea E, Moldón A, Grande M, Fajardo A, Rodríguez-Gabriel M A, et al. Activation of Srk1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Mol. Biol. Cell* 2008; 19:1670–1679. doi: [10.1091/mbc.E07-07-0639](#) PMID: [18272791](#)
12. Sánchez-Piris M, Posas F, Alemany V, Winge I, Hidalgo E, Bachs O, et al. The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:17722–17727. PMID: [11886858](#)
13. Smith D A, Toone W M, Chen D, Bahler J, Jones N, Morgan B, et al. The Srk1 protein kinase is a target for the Sty1 stress-activated MAPK in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:33411–33421. PMID: [12080074](#)
14. Hanyu Y, Imai K K, Kawasaki Y, Nakamura T, Nakaseko Y, Nagao K, et al. *Schizosaccharomyces pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23,

- a PP2A-related phosphatase inhibitor. *Genes Cells* 2009; 14: 539–54. doi: [10.1111/j.1365-2443.2009.01290.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01290.x) PMID: [19371378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19371378/)
15. Valbuena N, Moreno S. AMPK phosphorylation by Ssp1 is required for proper sexual differentiation in fission yeast. *J. Cell Sci.* 2012; 125: 2655–2664. doi: [10.1242/jcs.098533](https://doi.org/10.1242/jcs.098533) PMID: [22375066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22375066/)
 16. Hurley R L, Anderson K A, Franzone J M, Kemp B E, Means A R, Witters L A. The Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 29060–29066. PMID: [15980064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980064/)
 17. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong S-P, Momcilovic M, Johnstone S R, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2005; 2: 21–33. PMID: [16054096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054096/)
 18. Hawley S A, Pan D A, Mustard K J, Ross L, Bain J, Edelman A M, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2005; 2: 9–19. PMID: [16054095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054095/)
 19. Matsusaka T, Hirata D, Yanagida M, Toda T. A novel protein kinase gene *ssp1+* is required for alteration of growth polarity and actin localization in fission yeast. *EMBO J.* 1995; 14: 3325–3338. PMID: [7628434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7628434/)
 20. Rupeš I, Jia Z, Young P G. Ssp1 Promotes Actin Depolymerization and Is Involved in Stress Response and New End Take-Off Control in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* 1999; 10: 1495–1510. PMID: [10233158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10233158/)
 21. Martin S G, Chang F. New end take off. regulating cell polarity the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle* 2005; 4: 1046–1049. PMID: [15970692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15970692/)
 22. Koyano T, Kume K, Konishi M, Toda T, Hirata D. Search for Kinases Related to Transition of Growth Polarity in Fission Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010; 74: 1129–1133. PMID: [20501954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20501954/)
 23. Deng L, Baldissard S, Kettenbach A N, Gerber S A, Moseley J B. Dueling Kinases Regulate Cell Size at Division through the SAD Kinase Cdr2. *Curr. Biol.* 2014; 24: 428–433. doi: [10.1016/j.cub.2014.01.009](https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.009) PMID: [24508166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24508166/)
 24. Moreno S, Klar A, Nurse P. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *Methods in Enzymology* 1991; 194: 795–823.
 25. Norbury C, Moreno S. Cell Cycle Control. *Methods in Enzymology* 1997; 283:44–53.
 26. Prentice H L. High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 621. PMID: [1741305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1741305/)
 27. Bähler J, Wu J-Q, Longtine M S, Shah N G, Mckenzie A III, Steever A, et al. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 1998; 14: 943–951. PMID: [9717240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9717240/)
 28. Palmgren S, Vartiainen M, Lappalainen P. Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 881–886. PMID: [11870207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870207/)
 29. Deng L, Moseley J B. Compartmentalized nodes control mitotic entry signaling in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 2013; 24: 1872–1881. doi: [10.1091/mbc.E13-02-0104](https://doi.org/10.1091/mbc.E13-02-0104) PMID: [23615447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23615447/)
 30. Morrell J L, Nichols C B, Gould K L. The GIN4 family kinase, Cdr2p, acts independently of septins in fission yeast. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 5293–5302. PMID: [15454577](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15454577/)
 31. Kettenbach A N, Deng L, Wu Y, Baldissard S, Adamo M E, Gerber S A, Moseley J B. Quantitative phosphoproteomics reveals pathways for coordination of cell growth and division by the fission yeast DYRK kinase Pom1. *Mol. Cell. Proteomics* 2015; 14: 1275–1287. doi: [10.1074/mcp.M114.045245](https://doi.org/10.1074/mcp.M114.045245) PMID: [25720772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25720772/)
 32. Felerbach B, Chang F. Roles of the fission yeast for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr. Biol.* 2001; 11: 1656–1665. PMID: [11696322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11696322/)
 33. Martin S G, Chang F. Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr. Biol.* 2006; 16: 1161–70. PMID: [16782006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16782006/)
 34. Martin S G, Rinco S A, Basu R, Pe P, Chang F. Regulation of the Formin for3p by *cdc42p* and *bud6p*. *Mol. Biol. Cell* 2007; 18: 4155–4167. PMID: [17699595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17699595/)
 35. Palmgren S, Vartiainen M, Lappalainen P. Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers. *J. Cell Science* 2002; 115: 881–886. PMID: [11870207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870207/)
 36. Palmgren S, Ojal P J, Wear M A, JCooper J A, Lappalainen P. Interactions with PIP₂, ADP-actin monomers and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin. *J. Cell Biology* 2001; 155: 251–260.
 37. Ydenberg C A, Johnston A, Weinstein J, Bellavance D, Jansen S, Goode B L. Combinatorial genetic analysis of a network of actin disassembly-promoting factors. *Cytoskeleton* 2015; 72: 349–361. doi: [10.1002/cm.21231](https://doi.org/10.1002/cm.21231) PMID: [26147656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26147656/)

38. Falck S, Paavilainen V O, Wear M A, Grossmann J G, Cooper J A, Lappalainen P. Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *EMBO J.* 2004; 23:3010–3019. PMID: [15282541](#)
39. Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, Huang S, Prat A, Yee K, et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumor chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nature Communications* 2012; 4: 1393–1407.
40. Bockhorn J, Yee K, Chang Y, Prat A, Huo D, Nwachukwu C, et al. MicroRNA-30c targets cytoskeleton genes involved in breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; 137: 373–382. doi: [10.1007/s10549-012-2346-4](#) PMID: [23224145](#)
41. Baniwal S K, Khalid O, Gabet Y, Shah R R, Purcell D J, Mav D, et al. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. *Molecular Cancer* 2010; 9: 258–275. doi: [10.1186/1476-4598-9-258](#) PMID: [20863401](#)
42. Freitag S I, Wong J, Young P. Genetic and physical interaction of Ssp1 CaMKK and Rad24 14-3-3 during low pH and osmotic stress in fission yeast. *Open Biol.* 2014; 4: 130127. doi: [10.1098/rsob.130127](#) PMID: [24451546](#)

