

Grupo de investigación de fisiología de levaduras

José Cansado, Teresa Soto, Jerónima Vicente, Marisa Madrid, Alejandro Franco, Laura Sánchez-Mir, Rafael Jiménez, Beatriz Vázquez, Verónica Hernández, y Mariano Gacto

Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia

jcansado@um.es



Foto de grupo. Grupo de fisiología de levaduras de la Universidad de Murcia. De izquierda a derecha: José Cansado, Mariano Gacto, Alejandro Franco, Teresa Soto, Jerónima Vicente, Rafael Jiménez, Laura Sánchez-Mir, Beatriz Vázquez, Verónica Hernández y Marisa Madrid.

Un gran reto de la biología actual es conocer cómo las células detectan cambios en el medio que las rodea, y su señalización intracelular hasta desencadenar la consiguiente respuesta adaptativa. Numerosos estudios han destacado la importancia de las rutas mediadas por MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos, MAPK) en la respuesta de las células eucariotas frente a estímulos ambientales. Estas rutas están evolutivamente muy conservadas y transmiten señales extracelulares hasta el núcleo para inducir cambios significativos en los patrones de expresión génica, incrementando los niveles de factores encargados de proteger las células frente al agente estresante. El módulo clásico de MAPK consta de tres proteínas quinasas que se regulan por medio de una cascada secuencial de fosforilaciones. Una vez activadas, las MAP quinasas fosforilan diversos sustratos a nivel citoplasmático y se traslocan al núcleo, activando factores de transcripción específicos. La levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* constituye un excelente modelo para el estudio de los circuitos moleculares que promueven la activación de las MAP quinasas, debido en

parte a que se encuentra evolutivamente más próxima a organismos superiores que al resto de levaduras.

PMK1, LA MAP QUINASA DE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR EN *S. POMBE*

Nuestro grupo ha centrado sus esfuerzos en el estudio de los mecanismos que regulan la activación y función de la ruta de MAPK de integridad celular, homóloga a la ruta ERK de mamíferos, cuya actividad es fundamental en *S. pombe* para regular la construcción de la pared celular, la citocinesis, la morfogénesis, la fusión de vacuolas, y la homeostasis iónica (Pérez y Cansado, 2010). El elemento central de esta ruta es la MAPK Pmk1, cuya ausencia provoca alteraciones morfológicas, multiseptación (Figura 1), y sensibilidad osmótica. Varios laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que Pmk1 interacciona *in vivo* con Mkh1 (MAPKKK) y Pek1 (MAPKK) formando un complejo ternario que media la activación de Pmk1 por fosforilación en dos residuos conservados de treonina y tirosina en posiciones 186 y 188, respectivamente, del motivo de

activación -TEY- (Madrid *et al.*, 2006). Aunque se creía que Pmk1 se activaba únicamente en respuesta a temperaturas elevadas, también lo hace durante la fase G1-S del ciclo celular, el estrés osmótico, el ayuno de glucosa, daño a la pared celular, el estrés oxidativo, y las fuerzas gravitatorias (Madrid *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2007; Madrid *et al.*, 2007; Barba *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2013). En células en crecimiento Pmk1 muestra localización núcleo/citoplasmática, así como en el huso mitótico y septo durante la separación celular. Contrariamente a las ERKs en mamíferos, la localización de Pmk1 no se modifica en respuesta a estrés, lo que sugiere que tanto la formas activa e inactiva de la MAPK pueden entrar en el núcleo (Madrid *et al.*, 2006). Aunque la localización nuclear de Pmk1 no es determinante para el control de sus funciones biológicas salvo en situaciones de daño en la pared celular, si lo es para regular negativamente su estado de fosforilación por medio de fosfatasa específicas que localizan preferentemente en este compartimento celular (Sánchez-Mir *et al.*, 2012). Ello sugiere que el control espacial de la actividad de Pmk1 determina en gran medida su función biológica.

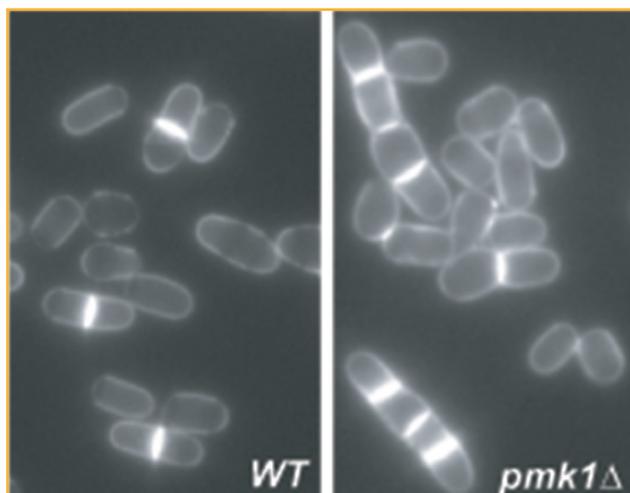


Figura 1. Fenotipo multiseptado característico del mutante *pmk1Δ* de *Schizosaccharomyces pombe*. WT= cepa silvestre. Microscopía de fluorescencia; tinción con blanco de Calcofúor.

UNA INTRINCADA RED DE SEÑALIZACIÓN REGULA LA ACTIVIDAD DE PMK1

La GTPasa Rho2 actúa aguas arriba del ortólogo de la proteína quinasa C Pck2 que, a su vez, activa el módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 en respuesta a distintos estímulos ambientales (Figura 2; Barba *et al.*, 2008). Recientemente hemos descrito que las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) Rga2, Rga4 y Rga8, modulan negativamente la actividad de Pmk1 al actuar como reguladores negativos de Rho2 (Villar-Tajadura *et al.*, 2008; Cansado *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2010). El hecho de que dichas GAPs muestren actividad sobre otras GTPasas además de Rho2 plantea una

interesante cuestión relacionada con el control espacio-temporal de su actividad biológica. Nuestro laboratorio había demostrado la existencia de rutas alternativas para la activación de Pmk1 independiente del control de Rho2 y/o Pck2 en respuesta a determinados tipos de estrés (Barba *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2012). Recientemente hemos confirmado que Rho1, una GTPasa esencial, y Pck1, un segundo ortólogo a PKC, regulan la ruta de Pmk1 de forma aditiva y/o alternativa a Rho2 y Pck2 (Viana *et al.*, 2013; Sánchez-Mir *et al.*, 2014; Figura 2). Estas observaciones definen un complejo entramado de elementos que actúan aguas arriba de la ruta de integridad celular en *S. pombe* en comparación con rutas equivalentes en otros eucariotas simples. Actualmente se desconoce la identidad de los sensores implicados en la detección y activación de la ruta de integridad celular.

La desfosforilación de Pmk1 durante el ciclo celular no perturbado es ejercida fundamentalmente por la fosfatasa de especificidad dual Pmp1. Sin embargo, la serín/treonín-fosfatasa Ptc1 y las tirosín-fosfatasa Pyp1 y Pyp2, cuya expresión es dependiente de la MAPK de respuesta a estrés Sty1, interaccionan y desfosforilan la forma activa de Pmk1 en respuesta a estrés (Madrid *et al.*, 2007). Además, la proteína ribosomal Cpc2, ortólogo a RACK1 (Receptor of Activated protein C Kinase) en células supe-

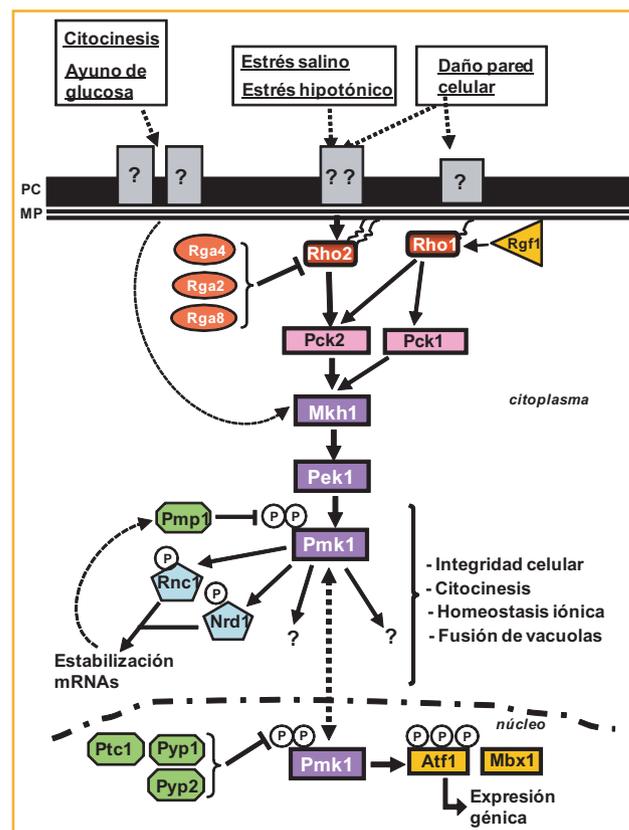


Figura 2. Regulación y principales componentes de la ruta de integridad celular en *S. pombe*.

riores, regula de forma negativa la actividad de la ruta de integridad celular al favorecer la traducción de Pyp1 y Pyp2 (Núñez *et al.*, 2009, 2010). Estas evidencias revelan la existencia de «crosstalk» entre las MAP quinasas Sty1 y Pmk1. Respecto a las dianas de Pmk1, Atf1 es un factor transcripcional clave en la respuesta a estrés de *S. pombe*, cuya actividad es regulada por Sty1 y también por Pmk1 en respuesta a daños en la pared celular. Sin embargo la relevancia biológica de Pmk1 como regulador de la respuesta a estrés via Atf1 es limitada (Sánchez-Mir *et al.*, 2012). Rnc1 y Nrd1 son dos proteínas que estabilizan m-RNAs con actividad dependiente de fosforilación mediada por Pmk1. La identificación de los m-RNAs que se unen a dichas proteínas permitirá profundizar nuestro conocimiento sobre el papel de Pmk1 en la regulación de distintos procesos celulares.

PUBLICACIONES

- Barba G, Soto T, Madrid M, Núñez A, Vicente J, Gacto M y Cansado J.** (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* 20: 748-757.
- Cansado J, Soto T, Gacto M y Pérez P.** (2010). Rga4, a Rho-GAP from fission yeast: Finding specificity within promiscuity. *Commun Integr Biol* 3:436-439.
- Madrid M, Soto T, Khong HK, Franco A, Vicente J, Pérez P, Gacto M y Cansado J.** (2006). Stress-induced response, localization and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 281: 2033-2043.
- Madrid M, Núñez A, Soto T, Vicente J, Gacto M y Cansado J.** (2007). Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1 by protein phosphatases. *Mol Biol Cell* 18: 4405-4419.
- Madrid M, Fernández-Zapata J, Sánchez-Mir L, Soto T, Franco A, Vicente-Soler J, Gacto M y Cansado J.** (2013). Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. *BMC Microbiology* 13: 34. doi: 10.1186/1471-2180-13-34.
- Núñez A, Franco A, Madrid M, Soto T, Vicente J, Gacto M y Cansado J.** (2009). Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast. *Mol Biol Cell* 20: 3996-4009.
- Núñez A, Franco A, Soto T, Vicente J, Gacto M y Cansado J.** (2010). Fission yeast receptor of activated C kinase (RACK1) ortholog Cpc2 regulates mitotic commitment through Wee1 kinase. *J Biol Chem*. 285:41366-41373.
- Pérez P y Cansado J.** (2010) Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci* 11:680-692.
- Sánchez-Mir L, Franco A, Madrid M, Vicente-Soler J, Villar-Tajadura MA, Soto T, Pérez P, Gacto M y Cansado J.** (2012). Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast. *J Biol Chem* 287: 26038-26051.
- Sánchez-Mir L, Soto T, Franco A, Madrid M, Viana RA, Vicente J, Gacto M, Pérez P y Cansado J.** (2014). Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS One*. 9:e88020. doi: 10.1371/journal.pone.0088020.
- Soto T, Núñez A, Madrid M, Vicente J, Gacto M y Cansado J.** (2007). Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 153: 1519-1529.
- Soto T, Villar-Tajadura MA, Madrid M, Vicente J, Gacto M, Pérez P y Cansado J.** (2010). Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 285:11516-11525.
- Viana RA, Pinar M, Soto T, Coll PM, Cansado J y Pérez P.** (2013). Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics* 195: 421-432.
- Villar-Tajadura A, Coll PM, Madrid M, Cansado J, Santos B y Pérez P.** (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol Microbiol* 70: 867-881.



Alicante 5 y 6 de septiembre de 2014

<http://ddm2014.blogspot.com.es/>