

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y
Genética Instituto de Biología
Funcional y Genómica (CSIC/USAL)



La $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1 es esencial en el control de la polaridad celular y la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe*

Mariona Ramos Vecino
Salamanca, 2014

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica
(USAL / CSIC)



**La $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1 es esencial en el control de
la polaridad celular y la citocinesis de
*Schizosaccharomyces pombe***

Mariona Ramos Vecino

Salamanca, 2014

**Dr. LUIS ROMÁN FERNÁNDEZ LAGO, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR
EN FUNCIONES DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

CERTIFICA

Que la memoria titulada “La $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1 es esencial en el control de la polaridad celular y la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe*”, presentada por la licenciada Mariona Ramos Vecino para optar al grado de Doctora en Bioquímica, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. Juan Carlos Ribas Elcorobarrutia y Juan Carlos García Cortés, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2014.

Fdo. Dr. Luis Román Fernández Lago

EL Dr. JUAN CARLOS RIBAS ELCOROBARRUTIA, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) Y EL Dr. JUAN CARLOS GARCÍA CORTÉS CONTRATO POSTDOCTORAL (CSIC)

CERTIFICAN

Que la licenciada Mariona Ramos Vecino ha realizado el trabajo titulado “La $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1 es esencial en el control de la polaridad celular y la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe*” bajo su dirección, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firman el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2014.

Fdo. Dr. Juan Carlos Ribas Elcorobarrutia

Fdo. Juan Carlos García Cortés

**LA Dra. HENAR VALDIVIESO MONTERO, PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CERTIFICA

Que la memoria titulada “La $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1 es esencial en el control de la polaridad celular y la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe*”, presentada por la licenciada Mariona Ramos Vecino para optar al grado de Doctora en Bioquímica, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. Juan Carlos Ribas Elcorobarrutia y Juan Carlos García Cortés, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2014.

Fdo. Dra. Henar Valdivieso

**Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica
(USAL / CSIC)**



**La $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1 es esencial en el
control de la polaridad celular y la citocinesis de
*Schizosaccharomyces pombe***



**Memoria presentada por Mariona Ramos Vecino para
optar al Grado de Doctor en Microbiología**

Salamanca, 2014

Abreviaturas



αα aminoácidos

αGS α(1,3)glucán sintasa

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

ATP Adenosina 5'-trifosfato (de "Adenosine-5'-triphosphate")

BFP Proteína azul fluorescente (de "Blue fluorescent protein")

βGS β(1,3)glucán sintasa

BfA Brefeldina A

BSA Seroalbúmina bovina (de "Bovine serum albumin")

CAR Anillo contráctil de actomiosina (de "Contractile actomyosin ring")

CDKs Ciclinas mitóticas (de "Cyclin dependent kinases")

CFP Proteína cian fluorescente (de "Cyan fluorescent protein")

Chx Cicloheximida

CW Calcoflúor white

DMSO Dimetil Sulfóxido

D.O. Densidad óptica

EDTA Ácido etilén diamino tetracético (de "Ethylenediaminetetraacetic acid")

EGFP Variante de la proteína verde fluorescente (de "Enhanced green fluorescent protein")

G Geneticina

GAP Proteína activadora de GTPasa (de "GTPase activating protein")

GDI Inhibidor de la disociación de GDP (de "GDP dissociation inhibitor")

GDP Guanosina 5'-difosfato (de "Guanosine 5'-diphosphate")

GEF Intercambiador de nucleótidos de guanina (de "Guanine nucleotide exchange factor")

GFP Proteína verde fluorescente (de "Green fluorescent protein")

GS glucán sintasas

GPI Guanosil fosfatidil inositol (de "Glycosyl phosphatidyl inositol")

GS Glucán sintasa

GTP Guanosina 5'-trifosfato (de "Guanosine 5'-triphosphate")

h Horas

HRP Peroxidasa de rábano (de "Horseradish peroxidase")

iMTOCs centros organizadores de MTs de interfase (de "interphase microtubule organizing center")

kb Kilobase

kDa KiloDalton

LatA Latrunculina A

LB Medio Luria-Bertani para *Escherichia coli*

L-βG β(1,3)glucano lineal (de "Linear β(1,3)glucan")

M Molar

MAPK Proteína quinasa activada por mitógenos (de "Mitogene-Activated Protein Kinase")

MBC Metil 2-benzimidazol carbamato (Carbendazima)

MCS Sitio de clonación múltiple (de "Multiple cloning site")

MET Microscopía Electrónica de Transmisión

MIN Minutos

MM Medio Mínimo para *Schizosaccharomyces pombe*

MT Microtúbulo

MTOC Centro organizador de microtúbulos (de "MicroTubule Organizing Center")

NETO Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo (de "New End Take Off")

OETO Comienzo del crecimiento por el polo celular viejo (de "Old End Take Off")

ORF Fase de lectura abierta (de "Open Reading Frame")

PAA microtubules post-anafásicos (de "Post-Anaphase Array")

PB Pares de Bases

PBS Tampón fosfato salino (de "Phosphate-Buffered Saline")

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (de "Polymerase Chain Reaction")

PI Fosfato

Pir-CWPs Repeticiones internas de proteínas de la pared celular (de “**P**rotein **i**nternal **r**epeats - **C**ell **w**all **p**roteins”)

PMSF Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo (de “**P**henyl**m**ethyl**s**ulfonyl **f**luoride”)

PVDF Fluoruro de polivinilideno (de “**P**oly**v**inylidene **f**luoride”)

RE Retículo Endoplásmico

RFP Proteína roja fluorescente (de “**R**ed **F**luorescent **P**rotein”)

rpm Revoluciones por minuto

S Sorbitol

SIN Ruta de activación de la septación (de “**S**eptation **i**nitation **n**etwork”)

SDS Dodecil sulfato sódico (de “**S**odium **D**odecyl **S**ulfate”)

SPA Medio de esporulación para *Schizosacharomyces pombe* (de “**S**porulation **A**gar”)

SPB Cuerpo polar del huso (de “**S**pindle **P**ole **B**ody”)

T Tiamina

TAE Tampón Tris-acetato + EDTA

TB Medio Terrific Broth para *E. coli*

TBST Tampón Tris-Salino y Tween 20 (de “**T**ris-**b**uffered **s**aline and **T**ween”)

TEM Microscopía electrónica de transmisión (de “**T**ransmission **E**lectron **M**icroscopy”)

Tris Tris-(hidroximetilamino)-metano

U.A. Unidades arbitrarias

UDP Uridina 5'-difosfato (de “**U**ridine 5'-**d**iphosphate”)

YES Medio complejo para *S. pombe* con suplementos (de “**Y**east **E**xtract with **S**upplements”)

YFP Proteína amarilla fluorescente (de “**Y**ellow **F**luorescent **P**rotein”)

WT Tipo silvestre (de “**W**ild **t**ype”)

Índice



1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>: UN MODELO EUCARIOTA PARA EL ESTUDIO DE LA MORFOGÉNESIS Y LA DIVISIÓN CELULAR.....	27
2. MORFOGÉNESIS Y CONTROL DE LA POLARIDAD DEL CRECIMIENTO EN <i>S. pombe</i>.....	29
2.1. Citoesqueleto de microtúbulos	29
2.2. Polarización celular	30
2.2.1. Complejo Tea1-Tea4 en el establecimiento de la polaridad	30
2.2.2. Complejo +TIP en el establecimiento de la polaridad	31
2.2.3. Activación del crecimiento por el complejo del polarisoma	32
2.3. El citoesqueleto de actina en <i>S. pombe</i>	32
2.3.1. Los parches de actina	33
2.3.2. Cables de actina	33
2.4. Miosinas	34
2.5. Dominios lipídicos ricos en esteroides	35
3. EL EXOCISTO	35
4. LA PARED CELULAR.....	36
4.1. Composición de la pared celular de <i>S. pombe</i>	36
4.1.1. β -glucano	36
$\beta(1,3)$ glucano lineal (L- β G)	
$\beta(1,3)$ glucano ramificado	
$\beta(1,6)$ glucano	
4.1.2. α -glucano	38
4.1.3. Galactomanano	38
4.2. Arquitectura de la pared celular	39
5. BIOSÍNTESIS DE LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR Y SU REGULACIÓN	40
5.1. Biosíntesis del $\beta(1,3)$glucano	40
5.1.1. Subunidad catalítica de la β GS	41
5.1.1.1. Bgs1/Cps1	43
5.1.1.2. Bgs2	44
5.1.1.3. Bgs3	45
5.1.1.4. Bgs4	45
5.1.2. Subunidad reguladora de la β GS	46
5.2. Biosíntesis del $\beta(1,6)$glucano	46
5.3. Biosíntesis del α-glucano	47
5.4. Biosíntesis del galactomanano	48

6. GTPasas DE LA FAMILIA Rho.....	48
6.1. Rho GTPasas de <i>S. pombe</i>	49
6.1.1. Rho1	49
6.1.2. Rho2	50
6.1.3. Cdc42	51
6.1.4. Otras proteínas Rho	52
7. LA CITOCINESIS EN <i>S. pombe</i>.....	52
7.1. Selección del sitio de división	53
7.2. Ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina (CAR)	53
7.3. Contracción del CAR: La ruta SIN	55
7.4. Formación del septo de división	56
7.5. Separación celular	57

OBJETIVOS _____ **59**

RESULTADOS _____ **63**

1. CAPÍTULO 1. LA RELACIÓN DE Bgs1 CON EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y SU COLABORACIÓN CON LAS PROTEÍNAS DEL POLARISOMA Tea1 Y Tea4 ES ESENCIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE LA POLARIDAD CELULAR.	65
1.1. OBTENCIÓN DE UNA ESTIRPE DE REPRESIÓN DE <i>bgs1</i>⁺ UNIFORME Y ESTABLE.	65
1.1.1. Análisis del fenotipo de represión de la cepa 81X- <i>bgs1</i> ⁺	65
1.1.2. La represión de <i>bgs1</i> ⁺ afecta de manera diferente a la localización de las GS Bgs3, Bgs4 y Ags1	67
1.2. Bgs1 COLABORA CON Tea1 Y Tea4 EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD CELULAR.	68
1.2.1. La ausencia conjunta de Bgs1 y las proteínas del polarisoma Tea1 y Tea4 produce una pérdida completa de la polaridad durante el crecimiento.	68
1.2.2. La inhibición del transporte de Tea1 y Tea4 a los polos de crecimiento induce una pérdida de la polaridad en ausencia de Bgs1.	72
1.2.3. La proteína quinasa C Pck1, independientemente de la ruta de integridad, produce la pérdida de la polaridad en ausencia de Bgs1.	72
1.3. Bgs1 COLABORA CON Tea1 Y Tea4, Y NO CON EL RESTO DE LAS PROTEÍNAS DEL POLARISOMA, EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD CELULAR.	73
1.4. EL TRANSPORTE DE Bgs1 A LOS POLOS DE CRECIMIENTO DEPENDE PARCIALMENTE DE LA CORRECTA NUCLEACIÓN DE LOS CABLES de F-ACTINA POR LA FORMINA For3	75
1.4.1. En ausencia de For3 disminuye la cantidad de Bgs1 en los polos de crecimiento	75
1.5. LA AUSENCIA DE Bgs1 PRODUCE UNA DESLOCALIZACIÓN DE Mod5	78
1.6. LA REPRESIÓN DE <i>bgs1</i>⁺ PRODUCE LA DESLOCALIZACIÓN DE LOS PARCHES DE ACTINA Y DE SUS PROTEÍNAS ASOCIADAS	78
1.7. LA REPRESIÓN DE <i>bgs1</i>⁺ PRODUCE LA DESPOLARIZACIÓN DE LOS DOMINIOS LIPÍDICOS RICOS EN ESTEROLES	81
1.8. EL PAPEL DE Bgs1 EN EL CONTROL DE LA POLARIDAD CELULAR PODRÍA DEBERSE A SU FUNCIÓN Y NO A SU PRESENCIA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	82

1.9. MUTANTES CON DEFECTOS EN LA LOCALIZACIÓN DE LOS PARCHES DE ACTINA PIERDEN LA POLARIDAD EN AUSENCIA DE Tea1 o Tea4.	84
1.9.1. Defectos en la nucleación de los parches de actina inducen la pérdida de polaridad celular en ausencia de Tea1 o Tea4.	85
1.9.2. La deslocalización de los parches de actina con Latrunculina B induce la pérdida de polaridad en ausencia de Tea1 o Tea4.	85
2. CAPÍTULO 2. EL CITOSQUELETO DE F-ACTINA Y SU PAPEL EN LA EXOCITOSIS Y ENDOCITOSIS DE LAS GLUCÁN SINTASAS	89
2.1. EL CITOESQUELETO DE ACTINA ES NECESARIO PARA LA ENDOCITOSIS Y LA EXOCITOSIS POLARIZADA DE LAS GLUCÁN SINTASAS.	91
2.2. LA EXOCITOSIS DE LAS GLUCÁN SINTASAS DEPENDE DE SU SÍNTESIS DE NOVO Y DEL EXOCISTO.	96
2.3. LA EXOCITOSIS DE LA GLUCÁN SINTASA Bgs1 ESTÁ DIRIGIDA HACIA LA LOCALIZACIÓN DE LOS DOMINIOS RICOS EN ESTEROLES, QUE A SU VEZ DEPENDEN DE LOS PARCHES DE ACTINA.	98
2.4. LA F-ACTINA ES NECESARIA PARA EL MANTENIMIENTO ESTABLE DE LAS GLUCÁN SINTASAS Y LOS LIPID RAFTS EN LAS ZONAS DE CRECIMIENTO POLARIZADO.	101
2.5. UNA ALTERACIÓN DE LOS LIPID RAFTS NO PRODUCE DEFECTOS EN LA LOCALIZACIÓN DE Bgs1 Y LOS PARCHES DE ACTINA.	104
3. CAPÍTULO 3. EL ANILLO CONTRÁCTIL DE ACTOMIOSINA NO ES NECESARIO PARA EL AVANCE DEL SURCO DE DIVISIÓN, PERO ACTÚA COMO GUÍA PARA LA CORRECTA PROGRESIÓN DE LA CITOCINESIS	109
3.1. EL PROCESO DE CITOCINESIS ES CAPAZ DE COMPLETARSE EN AUSENCIA DEL ANILLO DE F-ACTINA.	111
3.2. LA AUSENCIA DEL ANILLO DE F-ACTINA NO VA ACOMPAÑADA DE UNA DESAPARICIÓN COMPLETA DE LAS PROTEÍNAS DEL CAR, LO QUE ORIGINA SEPTOS CON UNA APARIENCIA NORMAL.	113
3.3. EL CAR NO ES NECESARIO PARA EL AVANCE Y CIERRE DEL SEPTO DE DIVISIÓN.	114
3.4. LOS RUDIMENTOS DEL SEPTO NO PROGRESAN EN PRESENCIA DE LATA, AUNQUE LAS GS PERMANECEN ACTIVAS, DANDO LUGAR A DEPOSICIONES LATERALES DE PARED EN LA ZONA MEDIA.	120
3.5. LAS PROTEÍNAS DEL SEPTO APARECEN SECUENCIALMENTE DESPUÉS DEL COMIENZO DE LA SÍNTESIS DEL SEPTO.	122
3.6. LAS PROTEÍNAS DEL CAR PRESENTAN UNA ALTA ESTABILIDAD CON LATA PERO SIEMPRE MUCHO MAS BAJA EN LOS RUDIMENTOS DE SEPTO QUE EN LOS SEPTOS QUE AVANZAN.	124
3.7. CON LA EXCEPCIÓN DE LOS RUDIMENTOS DE SEPTO, TODOS LOS SEPTOS SON CAPACES DE PROGRESAR EN PRESENCIA DE LATA.	126
3.8. CDC42 ES NECESARIO PARA EL AVANCE DE LOS SEPTOS EN AUSENCIA DE CAR	129
3.9. EL AVANCE DE LOS SEPTOS EN AUSENCIA DE CAR ESTÁ REGULADO NEGATIVAMENTE POR EL CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS.	131
4. CAPÍTULO 4. EL INICIO DE LA SEPTACIÓN SE PRODUCE DURANTE ANAFASE TEMPRANA.....	134
4.1. LA SÍNTESIS DEL SEPTO Y LA CONTRACCIÓN DEL CAR SE INICIAN EN ANAFASE TEMPRANA.	137
4.2. LAS PROTEÍNAS DEL CAR APARECEN SECUENCIALMENTE ANTES DEL COMIENZO DE LA SÍNTESIS DEL SEPTO	141
4.3. LA RUTA SIN NO ES NECESARIA DURANTE LA CITOCINESIS PARA LA APARICIÓN DE LAS GS, Bgs1, Bgs3, Bgs4 y Ags1, EN LA ZONA MEDIA DE LA CÉLULA PERO ES ESENCIAL PARA SU CONCENTRACIÓN EN ANILLO O EN LA ESTRUCTURA DEL SEPTO	144

DISCUSIÓN	147
1. PAPEL DE LA $\beta(1,3)$GLUCÁN SINTASA Bgs1 EN EL ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DEL CRECIMIENTO POLARIZADO.....	149
La colaboración de Bgs1 con las proteínas del polarisoma Tea1 y Tea4 es esencial para el mantenimiento de la polaridad celular	149
La actividad β GS de Bgs1 y no su localización es importante para el mantenimiento de la polaridad.	152
¿Cómo regula Bgs1 la localización de los parches de F-actina en los sitios de crecimiento polarizado?	153
2. PAPEL DE LA F-ACTINA EN EL TRANSPORTE y LOCALIZACIÓN DE Bgs1 Y OTRAS GLUCÁN SINTASAS.	154
3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA $\beta(1,3)$-GLUCÁN SINTASA Bgs1 DURANTE LA CITOCINESIS EN AUSENCIA DE CAR	155
El CAR no es necesario para el avance y cierre de los septos	156
El CAR funciona como guía para el correcto avance del septo durante citocinesis	158
El avance del septo requiere la formación de dos estructuras funcionalmente distintas	158
En ausencia de F-actina los MTs actúan como inhibidores para disminuir la velocidad de avance del septo	159
4. LA SÍNTESIS DEL SEPTO Y LA CONTRACCIÓN DEL CAR SE INICIAN EN ANAFASE TEMPRANA	160
CONCLUSIONES	167
MATERIALES Y MÉTODOS	169
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	171
2. MEDIOS DE CULTIVO	179
2.1. Medios de cultivo de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	179
2.2. Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	180
3. CONSTRUCCIÓN DE ESTIRPES de <i>S. pombe</i>	180
3.1. Cepa de represión de <i>bgs1⁺</i> (81X- <i>bgs1⁺</i>)	180
3.2. Cepas de las fusiones GFP o RFP a cada una de las glucán sintasas Bgs1, Bgs3, Bgs4 y Ags1 (XFP-12Ala- <i>bgs⁺</i> ; <i>ags1⁺</i> -12Ala-XFP)	181
3.3. Cepas con la versión no funcional de <i>bgs1⁺</i>	182
3.4. Obtención de esporas <i>GFP-mod5⁺ bgs1D</i>	182
3.5. Otras cepas utilizadas	182
4. CONDICIONES Y ESTIMACIÓN DE CRECIMIENTO	183
4.1. <i>S. pombe</i>	183
4.2. <i>E. coli</i>	184
5. MÉTODOS GENÉTICOS	184
5.1. Conjugación	184
5.2. Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: análisis de tétradas	185
5.3. Aislamiento de ascosporas al azar	185

6. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	185
6.1. Vectores utilizados	185
6.1.1. Vectores de <i>E. coli</i>	185
6.1.2. Vectores de <i>S. Pombe</i>	186
6.2. Plásmidos utilizados en este trabajo	187
6.3. Obtención de ADN plasmídico	189
6.4. Tratamientos enzimáticos del ADN	189
6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	189
6.6. Electroforesis de los fragmentos de ADN en geles de agarosa	190
6.7. Secuenciación de ADN	190
6.8. Mutagénesis dirigida <i>in vitro</i>	191
6.9. Transformación de bacterias y levaduras	191
6.9.1. Transformación de <i>E. coli</i>	191
6.9.2. Transformación de <i>S. pombe</i>	191
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	192
7.1. Obtención de extractos celulares totales	192
7.2. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	192
7.3. Inmunodetección de proteínas	193
8. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA Y TINCIONES	193
8.1. Microscopía de contraste de fases	193
8.2. Microscopía de fluorescencia	194
8.2.1. Tinción de la pared celular (Calcoflúor White)	194
8.2.2. Tinción de núcleos (Hoechst)	194
8.2.3. Tinción de dominios de lípidos ricos en esteroides (Filipina)	194
8.2.4. Fluorescencia directa con proteínas fluorescentes (GFP, variantes y RFP)	195
8.3. Microscopía de células en crecimiento en tiempo real (“time-lapse”)	195
8.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	196
9. RECURSOS BIOINFORMÁTICOS	197

Introducción



1. *Schizosaccharomyces pombe*: UN MODELO EUCARIOTA PARA EL ESTUDIO DE LA MORFOGÉNESIS Y LA DIVISIÓN CELULAR

La palabra morfogénesis proviene de los términos griegos “*morphê*” (forma) y “*genesis*” (creación), lo que significa creación de la forma, que en Biología consiste en el proceso mediante el cual se determina la forma final de una célula, órgano u organismo. Dicho proceso se activa en respuesta a una información posicional dentro de la célula y a una sucesión de estímulos externos a la misma, y da lugar a una serie de patrones de crecimiento organizados que implican el establecimiento correcto de las zonas de crecimiento en la superficie celular y el envío polarizado de los componentes esenciales para el crecimiento a dichas zonas. En el caso de los hongos, las células crecen incorporando nuevo material tanto en su membrana plasmática como en su pared celular. Esta última estructura constituye el exoesqueleto de la célula y le otorga resistencia mecánica y osmótica. Su integridad es, por tanto, vital para la célula fúngica ¹. El nombre taxonómico genérico *Schizosaccharomyces* determina que se trata de una levadura que se divide mediante un proceso de fisión transversal (*Schizo*). El género al que pertenece está clasificado taxonómicamente dentro del phylum Ascomycota (ascomicetos u hongos con ascas). Las cepas de *S. pombe* utilizadas hoy en día en los laboratorios proceden de una estirpe homotática h^{90} (llamada así porque en las condiciones de conjugación y esporulación adecuadas, el 90% de sus células forma ascas), de la que a su vez se aislaron dos estirpes heterotáticas estables (mantienen el mismo sexo en todas las generaciones), con los dos tipos sexuales opuestos h^+ y h^- ². Estas estirpes presentan un ciclo de vida haplobióntico, y sus células poseen una morfología cilíndrica, con un diámetro entre 3-4 μm y una longitud entre 7 y 15 μm dependiendo del estadio del ciclo celular en el que se encuentren, crecen apicalmente y se dividen por fisión en la zona central (Fig. 1). En medios de crecimiento pobres o carentes de nitrógeno, células de tipo sexual opuesto conjugan y fusionan sus núcleos originando un cigoto diploide que, tras la meiosis, da lugar a cuatro esporas haploides (Fig. 1). La posterior degradación de la pared celular del asca permite la liberación de las esporas y su germinación, reiniciando así el ciclo mitótico ³.

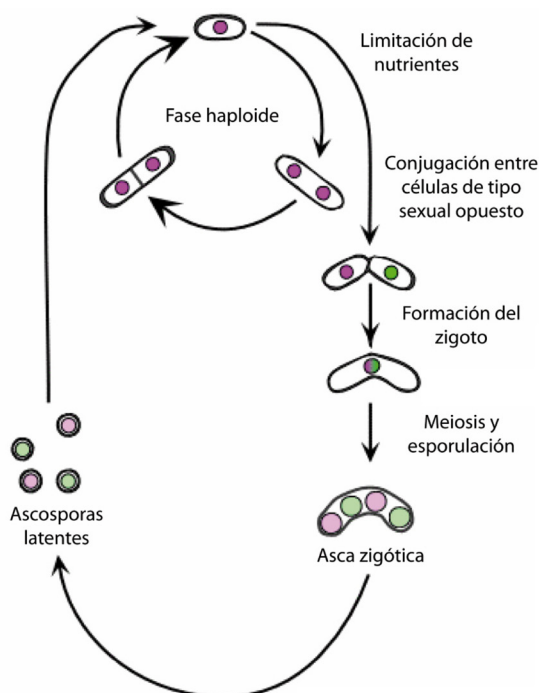


Figura 1. Ciclo de vida de *S. pombe*. Las células de *S. pombe* tienen morfología cilíndrica, crecen de manera apical y se dividen por fisión. Su ciclo de vida sigue una fase predominantemente haploide. Cuando escasean los nutrientes en el medio, dos células de tipo sexual opuesto entran en contacto, conjugan y forman un cigoto diploide en el que inmediatamente se produce la meiosis, dando lugar a un asca con cuatro ascosporas haploides. Cuando las condiciones del medio vuelven a ser adecuadas, estas esporas germinan dando lugar a células que comienzan un nuevo ciclo haploide. Si los cigotos se transfieren a un medio rico antes de que tenga lugar la meiosis, éstos originan células vegetativas que llevan a cabo un ciclo de vida diploide. Estas células se dividen de forma estable hasta agotar los nutrientes, momento en el que se induce la meiosis y la formación de cuatro esporas haploides.

Debido a que la levadura de fisión es un microorganismo no patógeno, susceptible de ser analizado tanto por métodos genéticos clásicos como moleculares y genómicos, se ha convertido en un excelente organismo modelo para el estudio de múltiples procesos celulares como la transcripción, la traducción, la estructura de cromosomas, la recombinación, la conjugación, la meiosis, la mitosis y el ciclo celular ⁴. Además, como las células tienen una forma cilíndrica muy uniforme, es un modelo excelente para el estudio de la morfogénesis ⁵⁻⁸.

S. pombe crece mediante el crecimiento polarizado de uno o de los dos extremos de la célula dependiendo del momento del ciclo celular en que se encuentre. El proceso de citocinesis tienen lugar durante la fase G1 (preparación de la maquinaria necesaria para la duplicación del ADN) y la fase S (duplicación de la información genética) que coincide con la última etapa de separación celular. Una vez separadas, las células hijas comienzan a crecer únicamente por el polo heredado de la madre, en un proceso que se conoce como OETO (de “Old end take off”). Este crecimiento monopolar se mantiene hasta después del inicio de la fase G2, momento en que las células han alcanzado un tamaño mínimo, y se activa el crecimiento por el otro polo. Este proceso de cambio de crecimiento monopolar hacia un crecimiento bipolar se denomina NETO (de “New end take off”) ⁹. A continuación, el crecimiento por los polos se detiene y comienza la mitosis (M), a lo largo de la cual se ensambla un anillo contráctil de actomiosina (CAR, de “Contractil actomiosin ring”). Tras la mitosis los núcleos se separan y se produce la contracción del CAR coordinada con la adición de nuevas membranas y la síntesis de material de pared celular que conducirá a la formación del septo de división. Una vez sintetizado el septo por completo, se produce la separación celular para dar lugar a dos células hijas idénticas ^{6,10,11} (Fig. 2).

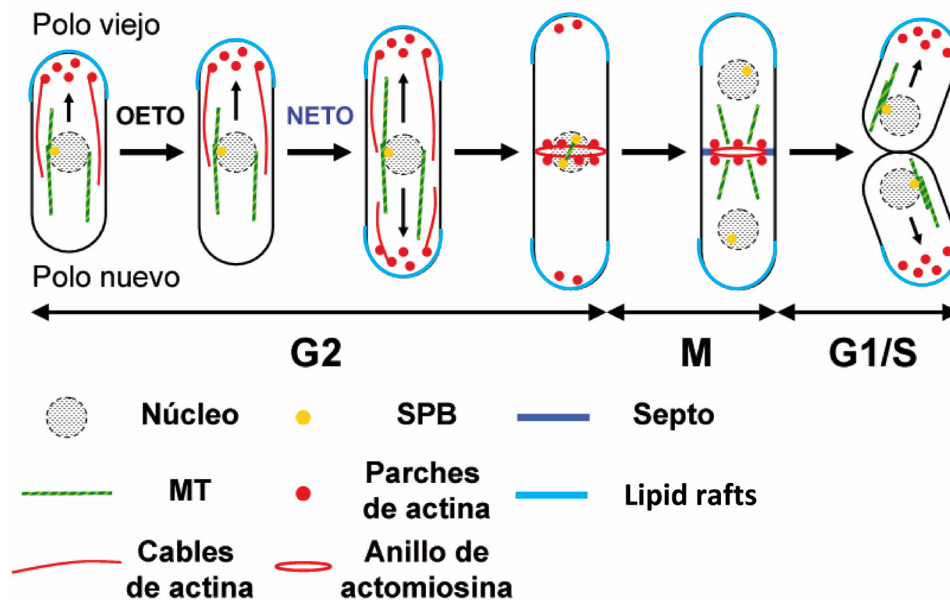


Figura 2. Ciclo morfo y celular de *S. pombe* durante el crecimiento vegetativo. Una vez completada la separación celular, tiene lugar la fase de crecimiento G2 en la que las células comienzan a crecer por el polo viejo (OETO), donde se concentran la mayoría de los parches de actina y los dominios lipídicos ricos en esteroides. Cuando las células alcanzan el tamaño adecuado, se produce la transición al crecimiento bipolar o NETO. Durante esta fase los parches de actina y los “lipid rafts” se reorganizan de manera homogénea en ambos polos. Los microtúbulos se organizan como haces dinámicos a lo largo de la interfase. Una vez que las células han alcanzado un tamaño determinado se inicia la mitosis o fase M, momento en el que el citoesqueleto de actina se ensambla en un anillo contráctil en la región central de la célula, los “lipid rafts” se localizan en la zona media y los microtúbulos forman el huso mitótico necesario para la segregación cromosómica. Al final de mitosis se despolimeriza el huso mitótico y se forman los microtúbulos post-anafásicos (de “Post anaphase array”) y la célula continúa con las fases G1/S donde se completa la contracción del anillo, además de la formación y disolución del septo de separación.

2. MORFOGÉNESIS y CONTROL de la POLARIDAD del crecimiento en *S. pombe*

El crecimiento polarizado se define como el tipo de crecimiento que ocurre en regiones confinadas y específicas de la célula, y es lo que determina la morfología celular. En *S. pombe*, el crecimiento por dos zonas de dimensiones definidas y posicionadas en lados opuestos de la célula es lo que origina la forma cilíndrica típica. El establecimiento y mantenimiento del crecimiento polarizado son esenciales para la morfogénesis celular y requieren la regulación espacio-temporal de ciertos procesos celulares: 1) marcaje del sitio de crecimiento en respuesta a señales internas o externas a la célula; 2) reconocimiento del sitio de crecimiento y señalización hacia los citoesqueletos de microtúbulos (MTs) y actina para establecer un eje orientado hacia el sitio de crecimiento; y 3) polarización del citoesqueleto para activar la secreción y la distribución asimétrica de los componentes implicados en el crecimiento polarizado.

2.1. Citoesqueleto de microtúbulos.

El citoesqueleto de MTs contribuye a la localización correcta de los sitios de crecimiento mediante el transporte hacia los extremos celulares de un conjunto de factores de polaridad y el manteniendo del núcleo en el centro de la célula que da lugar al posicionamiento del sitio de división¹¹⁻¹³.

Los MTs son estructuras cilíndricas huecas formadas por la asociación no covalente de monómeros de tubulina (α y β) que se disponen longitudinalmente para formar protofilamentos, que a su vez dan lugar a la estructura polarizada que constituye el filamento de MT. En estos filamentos se puede diferenciar un extremo positivo y dinámico que constituye el sitio de crecimiento, y un extremo negativo y estático que se asocia a la envoltura nuclear orientado hacia el centro organizador de MTs (MTOC, de “**M**icrotubule **o**rganizing **c**enter”) ¹⁴⁻¹⁷. Los MTs se caracterizan por presentar una inestabilidad dinámica con fases alternas de contracción y crecimiento causadas por el desensamblaje (catástrofe) o polimerización de la tubulina respectivamente ^{13,18}.

Durante el ciclo vegetativo, la organización de los MTs varía en función de las distintas etapas del ciclo celular (**Fig. 3**). En interfase, los MTs forman de 2 a 6 haces alineados a lo largo del eje longitudinal de la célula ^{14,19}. Estos haces están dispuestos de forma antiparalela, solapando sus extremos negativos en los centros organizadores de MTs de interfase (iMTOCs, de “**I**nterphase **m**icrotubule **o**rganizing **c**enter”), localizados en el centro de la célula ^{17,19,20}. Esta organización asegura que en cada haz de MTs los extremos positivos crezcan hasta alcanzar ambos polos para posteriormente despolimerizarse rápidamente ⁵.

En la mitosis temprana, desaparecen los MTs citoplasmáticos y aparecen dos nuevas formas de organización, los MTs intranucleares que originan el huso mitótico, y los MTs astrales, en la cara citoplasmática del cuerpo polar del huso (SPB, de “**S**pine **p**ole **b**ody”). En la transición de anafase B a telofase, donde se ha descrito que comienza la contracción del CAR y la síntesis del septo, se desensambla el huso mitótico, y los MTs originan el “*Post-Anaphase Array*” o PAA. Al concluir la septación, esta estructura se desorganiza, formándose de nuevo los MTs citoplasmáticos. Los MTs astrales se han relacionado con el alineamiento del huso mitótico con respecto al eje celular, pero no con su elongación ²¹⁻²³, mientras que el PAA lleva a cabo sus funciones durante la citocinesis, estabilizando el CAR y manteniendo alejados a los núcleos de la zona de división ^{24,25} (**Fig. 3**).

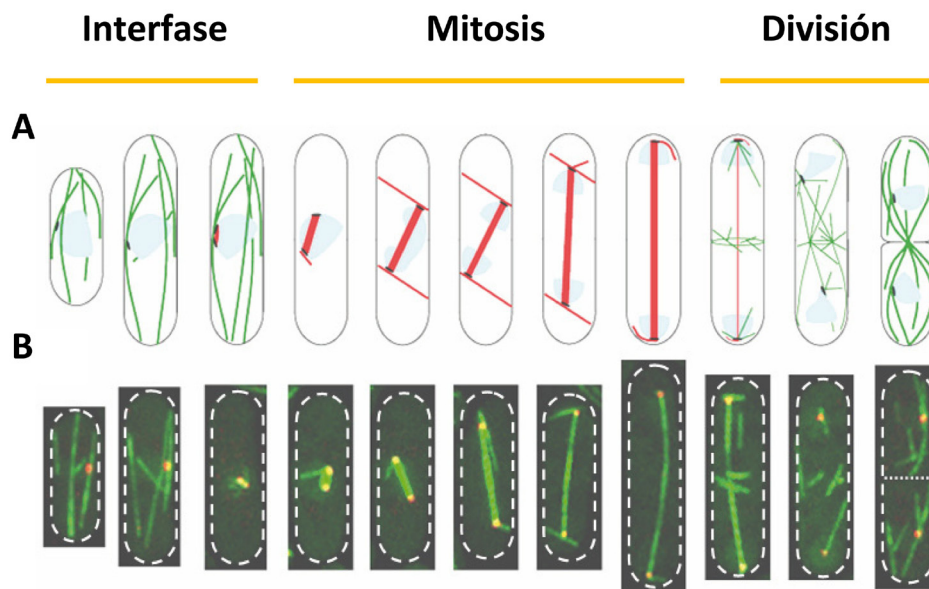


Figura 3. Organización de los microtúbulos en *S. pombe*. (A) Ilustración de la distribución de los microtúbulos (MT, en verde) durante distintas fases del ciclo celular de *S. pombe*. Se representan también los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, en rojo) y la envuelta nuclear (azul). Los extremos (-) generalmente están dirigidos hacia el centro de la célula y los extremos (+) hacia los polos. Durante la mitosis se forman el cuerpo polar del huso (SPB) y los microtúbulos astrales. Durante la división celular los centros organizadores de microtúbulos situados en la zona de división van a nuclear los microtúbulos denominados PAA (Post Anaphase Array) que favorecen la separación celular. (B) Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a A. Modificado de ¹⁴.

2.2. Polarización celular

2.2.1. Complejo Tea1-Tea4 en el establecimiento de la polaridad

El marcador de polaridad Tea1, con similitud a las proteínas Kelch de *Drosophila* y Ezrina de mamíferos, fue la primera proteína identificada como componente de la maquinaria de polarización celular encargada de determinar los sitios de crecimiento ²⁶. Tea1 se acumula en los extremos positivos de los MTs donde interacciona con el extremo C-terminal de la proteína Tea4 para dar lugar a un complejo ²⁷. Una vez que los MTs contactan con los polos de crecimiento Tea1 y Tea4 se anclan a la membrana plasmática, donde actúan como marcadores de las regiones de crecimiento activo (Fig. 4).

Los mutantes carentes de Tea1 o de Tea4 presentan defectos morfológicos similares, células curvadas o con forma de "T" que crecen de forma monopolar, lo que indica una función de estas proteínas en el posicionamiento correcto de los sitios de crecimiento y en el proceso de NETO. Además, el mutante doble *tea1Δ tea4Δ* presenta los mismos defectos que los mutantes simples, lo que sugiere que ambas proteínas funcionan en la misma ruta ^{10,13,27}. Tea1 es necesaria para la localización de Tea4 en los polos. A su vez, Tea4 juega un papel en el anclaje del complejo Tea1-Tea4 en el polo de crecimiento, ya que se ha visto que en células carentes de Tea4, Tea1 se acumula de forma asimétrica en los polos de la célula ^{10,28}. Entre las proteínas responsables del anclaje de Tea1-Tea4 a la corteza celular se encuentran Mod5 y Tea3. Mod5 es una proteína que se asocia a la membrana mediante la prenilación de su extremo C-terminal y es necesaria para el anclaje de Tea1 en ambos polos. En su ausencia, la mayor parte de Tea1 permanece retenida en los MTs, aunque las células presentan un patrón de crecimiento similar a un silvestre ²⁹. Por otra parte, en ausencia de Tea1, Mod5 se extiende por toda la membrana en lugar de permanecer confinada en los polos. Por tanto Tea1 y Mod5 forman un complejo y dependen el uno

2.2.3. Activación del crecimiento por el complejo del polarisoma

La localización del complejo Tea1-Tea4 en los polos de la célula es esencial para marcar los sitios de la célula donde a continuación tendrá lugar la activación del crecimiento. De hecho, una de las funciones principales del complejo Tea1-Tea4 es servir de punto de anclaje para que las proteínas implicadas en la activación del crecimiento se localicen exclusivamente en los polos de crecimiento. Una vez en los polos, Tea1 y Tea4 se anclan a Mod5, e interactúan con otros componentes adicionales para formar un gran complejo proteico que incluye a las proteínas For3, Bud6 y Cdc42, y que ha sido denominado “polarisoma”^{10,37} (**Fig. 4**).

Tea4 se une directamente a For3 sirviendo como puente de unión entre esta última y Tea1. For3 es la formina responsable de la formación de los cables de actina en los sitios de crecimiento durante interfase^{27,38}. Al igual que otras forminas, For3 posee un mecanismo de autoinhibición a través de la interacción entre sus dominios DID y DAD³⁹. Las células que carecen de For3 son viables a pesar de no presentar cables de actina detectables, lo que sugiere que la polaridad puede ser debida a una función redundante con la maquinaria de secreción polarizada⁴⁰.

Bud6 es una proteína reguladora de la actina, que durante el crecimiento vegetativo refuerza el reclutamiento y activación de For3 en los polos de crecimiento. En ausencia de Bud6, For3 se deslocaliza parcialmente, presentando las células defectos en los cables de actina^{13,39}. Esta proteína se localiza en ambos polos de la célula en interfase y en la región del septo durante la citocinesis, y su mantenimiento en los polos es dependiente de actina. Tea1 interactúa físicamente con Bud6 y la localización de Bud6 depende de Tea1 pero no a la viceversa⁴¹.

Cdc42 es una GTPasa esencial que controla el crecimiento polarizado^{42,43} mediante la regulación de For3 y los cables de actina y mediante la regulación del exocisto^{40,44}. Cdc42, junto con Bud6 y Pob1, impiden la autoinhibición de For3, permitiendo su correcta localización y activación en los polos de crecimiento^{38,39,45,46}.

Otra proteína importante cuya localización depende del complejo Tea1-Tea4 es la quinasa Pom1⁴⁷(**Fig. 4**). Esta quinasa regula la fosforilación y localización de Rga4, una GAP (de “GTPase-activating protein”) de la GTPasa Cdc42, excluyéndola de las zonas de crecimiento y evitando la inactivación de Cdc42 en estas regiones. De esta manera, Cdc42 se mantiene activa en los polos de crecimiento y mantiene a su vez la actividad de la formina For3^{39,45,48}.

2.3. El citoesqueleto de actina en *S. pombe*

Una vez establecidos los polos de crecimiento, el citoesqueleto de actina dirige la secreción polarizada de componentes de la membrana, precursores y enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular hacia las regiones por donde la célula debe crecer. Ensayos de regeneración de protoplastos en presencia de dosis altas de citocalasina D, una droga que inhibe la polimerización de los filamentos de actina, muestran una inhibición de la síntesis de material de pared celular nuevo y por lo tanto un bloqueo del crecimiento de la célula⁴⁹.

A lo largo del ciclo celular la actina se organiza en tres estructuras distintas y bien definidas:

los parches de actina, los cables de actina y el CAR. Esta última estructura se describirá en detalle en el apartado 6 dedicado al proceso de la citocinesis ⁵⁰ (Fig. 5).

2.3.1. Los parches de actina.

Los parches de actina marcan los lugares donde se produce el crecimiento activo de la célula. Se ensamblan en los polos de crecimiento en interfase, y en la zona media de las células durante la citocinesis ⁵¹⁻⁵³. Los parches se han asociado con los procesos de endocitosis, donde son necesarios para contrarrestar la elevada presión de turgencia interna de las células ⁵⁴ y facilitar que los materiales extracelulares o aquellos unidos a la membrana plasmática se transporten al interior celular. Es previsible por tanto que los parches sean importantes para el reciclado de proteínas y lípidos en las zonas de crecimiento activo ⁵³. Los parches de actina se ensamblan por el complejo Arp2/3 que es estimulado por tres factores promotores de nucleación Pan1, Wsp1 de la familia WASP y la miosina de Clase I Myo1, ésta última estimulada por la verprolina Vrp1 ^{55,56}.

2.3.2. Cables de actina.

Los cables de actina contribuyen al crecimiento polarizado funcionando como vías a través de las cuales las miosinas de Clase V, Myo51 y Myo52, pueden transportar vesículas de secreción ⁵⁷, y participan en el movimiento de los parches de actina ^{58,59}.

Durante interfase los cables de actina se extienden a lo largo del eje longitudinal de las células, orientados de tal manera que la polimerización ocurre por el extremo más cercano a los polos ⁶⁰. Durante la mitosis, los cables se reorientan polimerizándose en la zona media de la célula y permitiendo así el transporte de los materiales necesarios para la formación del anillo contráctil y el septo ⁶⁰. La nucleación de estos cables depende de las forminas For3 y Cdc12 que es además esencial para la formación del anillo de actomiosina necesario para la división celular ^{61,62}.

El ensamblaje de los cables de actina necesita de la participación de la formina For3 ^{38,60,63}. Además se han descrito otras proteínas de unión a filamentos de actina que se unen a los cables como la tropomiosina Cdc8, que estabiliza los filamentos de actina o la profilina ⁵⁸.

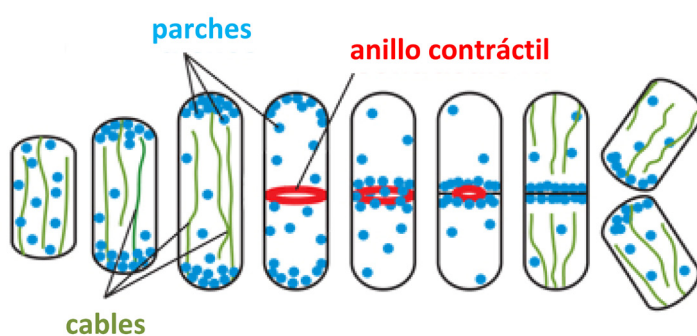


Figura 4. Distribución del citoesqueleto de actina en *S. pombe*. Detalle de la organización de las diferentes estructuras que componen el citoesqueleto de actina durante el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Figura adaptada de ²⁵⁶.

2.4. Miosinas

Las miosinas engloban a una superfamilia de proteínas motoras que utilizan a los filamentos de actina como puntos de anclaje para el movimiento y están implicadas en diferentes e importantes procesos celulares, como son el movimiento celular, la fagocitosis, el mantenimiento de la forma celular, la citocinesis o el tráfico de orgánulos y partículas ⁶⁴. La tropomiosina Cdc8 es una proteína de unión a actina que regula la dinámica de la actina y su interacción con las miosinas ⁶⁵⁻⁶⁸. Las miosinas constituyen la denominada “cadena pesada” de un complejo motor que también incluye una “cadena ligera esencial” y una “cadena ligera reguladora”. La cadena pesada, o miosina propiamente dicha, posee tres dominios bien diferenciados: dominio motor o “cabeza”, que se asocia a la actina para producir movimiento; dominio “cuello”, que se une a la cadena ligera y aumenta la rigidez de la zona permitiendo amplificar la fuerza generada por el dominio motor; y dominio “cola”, que especifica el tipo de interacción proteína-proteína determinando las distintas funciones no motoras existentes (dimerización, unión a membranas,...).

En *S.pombe* existen cinco miosinas pertenecientes a tres clases diferentes: Clase I (Myo1p), Clase II (Myo2p y Myp2p/Myo3p) y Clase V (Myo51p/Myo5p y Myo52p/Myo4p) ⁶⁹. La miosina de clase I, Myo1, posee una larga cola con un extremo C-terminal importante en la estimulación del complejo Arp2/3, nucleador de actina. Esta función es compartida con la proteína de la familia WASP, Wsp1, actuando ambas proteínas en rutas paralelas para la activación de Arp2/3 y la distribución de los parches de actina en los sitios de crecimiento ^{55,56}. Myo1 también parece tener un papel en la remodelación de la membrana plasmática y la endocitosis ^{70,71}. La actividad motora de Myo1 no es necesaria para su función en la polimerización de actina, pero el mecanismo por el cual es importante en otros procesos celulares, como la endocitosis, todavía se desconoce ^{71,72}.

S. pombe posee dos miosinas de la Clase II, Myo2 y Myp2/Myo3 y sólo Myo2 es esencial para la viabilidad celular ^{73,74}. Son componentes de la maquinaria de citocinesis formando parte del CAR, donde Myo2 desempeña un papel crucial en su formación y contracción ⁷⁵⁻⁷⁷.

La actividad de las miosinas de la Clase II se encuentra regulada, de manera similar a la de Myo1, por su unión a las cadenas ligeras, Cdc4 (esencial) y Rlc1 (reguladora). Además, se ha observado que la fosforilación de Myo2 controla su motilidad e incorporación al CAR ^{78,79}.

Las miosinas de Clase V son proteínas que dimerizan para moverse a lo largo de cables de actina y así transportar distintas moléculas hasta localizaciones discretas de la célula ⁶⁹. *S. pombe* posee dos miosinas de Clase V: Myo51/Myo5 y Myo52/Myo4. Myo51 participa en citocinesis, mientras que Myo52 se acumula en los sitios de crecimiento y deposición de pared celular ^{57,80}. El mutante *myo51D* no presenta defectos detectables en el crecimiento mientras que las células carentes de Myo52 son termosensibles y tienen defectos morfológicos. Myo52 se ha asociado a diferentes procesos celulares como son la organización y el mantenimiento vacuolar ^{57,81}, el transporte y la localización de la proteína SNARE sinaptobrevina ^{82M} y la dinámica de MTs ⁸³. Se ha descrito que la localización de las $\beta(1,3)$ glucán sintasas (β GS) Bgs1 y Bgs4 en las regiones de síntesis de pared celular depende de For3 y Myo52 ^{40,84}. También se describió que la localización de la α -glucán sintasa (α GS) Ags1/Mok1 dependía de Myo51 ⁸⁰, sin embargo, recientemente se ha visto que esto no es así ⁸⁵.

Myo51, al igual que Myo52, se localiza durante la fase sexual en la punta de las células en conjugación promoviendo la fusión de las células⁸⁶. Myo51 también juega un papel durante la segregación meiótica localizándose, tras la profase I, en los SPBs y coordinando la organización espacial y temporal de la formación de la espora⁸⁶. Además, se ha descrito que junto con Myo52 contribuye a la organización y dinámica de los cables de actina⁸⁷ y, recientemente, se ha visto que interviene en el ensamblaje y estabilidad del CAR durante citocinesis a través de dos proteínas “coiled coil”, Rng8 y Rng9⁸⁸.

2.5. Dominios lipídicos ricos en esteroides

Hasta la fecha, los dominios de membrana representan uno de los componentes del crecimiento polarizado menos explorados. Los más estudiados son los dominios ricos en esteroides o “lipid rafts”, insolubles en detergentes no iónicos, que en células de mamíferos se han implicado en procesos de reciclado de proteínas, tráfico, señalización y organización del citoesqueleto de actina⁸⁹⁻⁹³. En *S. pombe* se concentran en los polos de crecimiento o en forma de banda en la zona media de la célula durante la citocinesis. Dicha distribución depende del ciclo celular, y requiere una ruta de secreción funcional^{94,95} (Fig. 2). Se ha descrito también que la miosina de Clase I Myo1 controla la organización de los “lipid rafts” en la membrana plasmática y la proteína F-BAR Cdc15 controla la localización de Myo1, y por tanto, la organización de los “lipid rafts”⁹⁶⁻⁹⁹. Además, parece que existe una interdependencia entre Myo1, los “lipid rafts” y la endocitosis^{70,71,98}.

Algunas proteínas como la glucán sintasa (GS) Bgs4, y la quinasa de la familia MARK, Kin1, están asociadas a los “lipid rafts”^{94,100}. Además, una alteración de la composición de los “lipid rafts” provoca un posicionamiento aberrante del sitio de división celular⁹⁴.

3. EL EXOCISTO

Para llevar a cabo el crecimiento polarizado es necesaria una secreción polarizada de nuevo material de membrana en las zonas de crecimiento activo de la célula. Este proceso se lleva a cabo a través del transporte de vesículas exocíticas por los cables de actina hasta las zonas de crecimiento donde se produce su fusión con la membrana plasmática.

El exocisto es un complejo multiproteico conservado que es importante para la fusión de vesículas con la membrana plasmática^{101,102}. En *S. pombe* este complejo se compone de 8 subunidades, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84, y todas son esenciales salvo Exo70¹⁰³⁻¹⁰⁵. A diferencia de lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*, donde las mutaciones en el exocisto provocan defectos en polaridad celular¹⁰⁶, las células de *S. pombe* con mutaciones en el exocisto crecen de forma polarizada pero muestran defectos en citocinesis^{103,107}. El exocisto se localiza en las zonas de crecimiento activo, en los polos durante interfase y en el septo durante la separación celular, donde forma un anillo que se desdobra al comenzar la contracción del CAR. El exocisto participa, junto con el citoesqueleto de actina, en el crecimiento polarizado^{40,103}. Recientemente se ha visto que la subunidad del exocisto Sec3 participa tanto en el anclaje de las vesículas de secreción a la membrana plasmática como en el ensamblaje de las diferentes estructuras de F-actina¹⁰⁸.

La localización del exocisto no depende de los cables de actina pero sí de fosfolípidos de membrana como PIP2. Por ello, se ha propuesto que los cables de actina y el exocisto forman dos módulos que actúan de forma independiente en el proceso de secreción polarizada, siendo ambos controlados por la GTPasa Cdc42^{39,40,45,46,109}.

4. LA PARED CELULAR

La pared celular es una estructura compleja y externa a la membrana plasmática que está presente en todos los hongos. Está formada por polisacáridos entrelazados y glicoproteínas, proporcionando protección mecánica y soporte estructural frente al exterior y frente a la fuerte presión de turgencia interna, por lo que determina la forma y es esencial para el crecimiento y la supervivencia de la célula. Sin embargo, esta estructura no es una simple cubierta rígida y estática, sino que constituye un componente celular muy dinámico, que cambia continuamente durante el ciclo de vida de la levadura y por tanto, desempeña un papel muy importante en la morfogénesis de la célula. La pared celular fúngica es equivalente en algunos aspectos funcionales a la matriz extracelular de células animales pero su composición y propiedades osmóticas y estructurales son totalmente distintas. Estas diferencias permiten que los antifúngicos que afectan específicamente a la pared celular, sean capaces de inhibir la síntesis de la pared fúngica sin afectar a la matriz extracelular de células animales^{110,111}.

4.1. Composición de la pared celular de *S. pombe*

La pared celular de *S. pombe* representa alrededor del 25% del peso seco de la célula y está compuesta principalmente por glicoproteínas y polisacáridos dispuestos en diferentes capas fibrilares, que se enlazan entre ellos mediante enlaces por puentes de hidrógeno, lo que convierte a la pared celular en una estructura fuerte y resistente (**Fig. 6A**). Entre los polisacáridos se encuentran cuatro tipos de glucano que constituyen el 85% del total de la pared: $\beta(1,3)$ glucano lineal, $\beta(1,3)$ glucano ramificado, $\beta(1,6)$ glucano y $\alpha(1,3)$ glucano con una pequeña proporción de enlaces $\alpha(1,4)$. Además, la pared contiene alrededor de un 15% de galactomanoproteínas¹¹²⁻¹¹⁵. A diferencia de lo que ocurre en otros hongos, en la pared celular de *S. pombe* no se han detectado cantidades significativas de quitina durante el crecimiento vegetativo¹¹⁶.

4.1.1. β -glucano

En *S. pombe* este polisacárido representa del 46 al 54% del contenido total de la pared, siendo el principal componente de la misma y el responsable de la fuerza mecánica y del mantenimiento morfológico de la célula^{112,117}. El término β -glucano engloba los polisacáridos formados por monómeros de D-glucosa, clasificándose por el tipo de enlace existente en la cadena principal de estos monómeros^{112,118}:

$\beta(1,3)$ glucano lineal (L- β G)

Está constituido por cadenas lineales de glucosas unidas por enlaces $\beta(1,3)$ que se disponen en forma de triple hélice^{119,120}, lo que le confiere elasticidad y resistencia¹. En *S. pombe* es responsable

de la estructura de septo primario que se observa mediante microscopía electrónica. Además, es el polisacárido que se une de forma específica y con alta afinidad al fluorocromo Calcofluor White (CW), como ocurre con la quitina del septo primario en la levadura de gemación *S. cerevisiae*¹²¹.

$\beta(1,3)$ glucano ramificado

Es el polisacárido más abundante de la pared y está constituido por cadenas lineales de glucosas unidas por enlaces $\beta(1,3)$ con un 14% de ramificaciones a través de enlaces $\beta(1,6)$ (Fig. 6A). Mediante estudios de regeneración de protoplastos se ha podido observar que este polímero es el primero en ser sintetizado por la célula, generando una red de fibras largas y paralelas que se extiende hasta cubrir la superficie del protoplasto, restableciendo la forma cilíndrica inicial de esta levadura y constituyendo el armazón sobre el que se ensamblan posteriormente el α -glucano y el galactomanano^{113,122}. Este glucano es esencial para mantener la viabilidad celular y para la formación del septo secundario. Además participa en la conexión de la pared celular con la membrana plasmática, permitiendo la contracción adecuada del CAR y el avance correcto del septo de división¹²³.

$\beta(1,6)$ glucano

Es un polisacárido formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces $\beta(1,6)$ que está altamente ramificado (un 75%) en uniones tipo $\beta(1,3)$. Debido a la abundancia de los dos tipos de enlaces también es denominado *diglucano* y constituye del 6 al 10% de la pared celular^{115,124} (Fig. 6A).

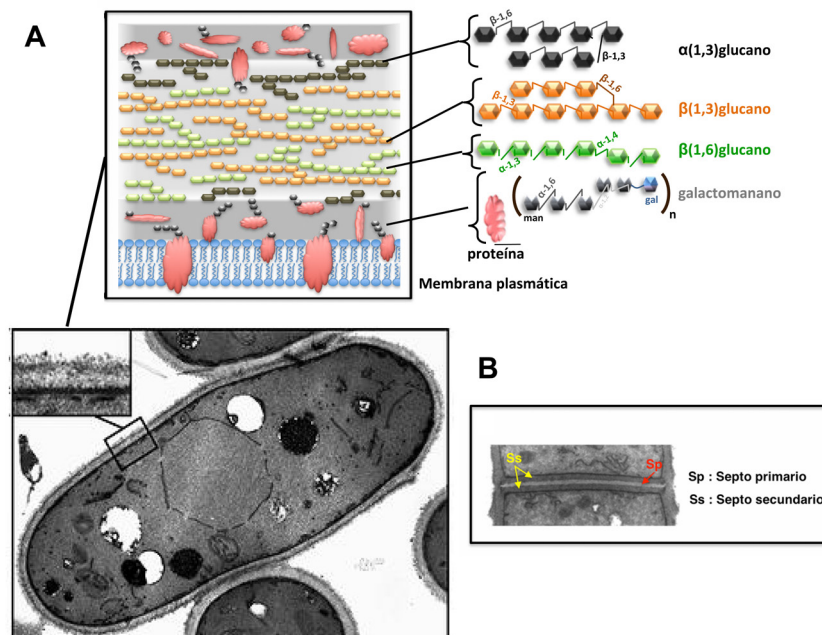


Figura 6. Estructura de la pared celular de *S. pombe*. (A) Estructura y composición de la pared celular de la levadura de fisión. El panel superior muestra un esquema de la organización y composición de las distintas capas que constituyen la pared celular. En el panel inferior se muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una célula y del detalle de un fragmento de pared celular. La pared celular consta de tres capas. La zona interna es menos densa a los electrones, está formada mayoritariamente por α -y β -glucanos y es la que confiere rigidez a la pared. Las superficies externa e interna son más densas al paso de los electrones y están formadas principalmente por galactomanoproteínas, las cuales son responsables de las interacciones celulares y de la antigenicidad. (B) Imagen de TEM de un septo de división el cual presenta una estructura trilaminar, con una estructura interna poco densa a los electrones denominada septo primario (Sp) que contiene, aparte de otros polisacáridos, el L- β G responsable de su estructura, flanqueada a ambos lados por dos estructuras más densas a los electrones denominadas septos secundarios (Ss).

4.1.2. α -glucano

Este polisacárido está ausente en levaduras de gemación como *S. cerevisiae* y *Candida albicans*, pero está presente en la pared celular de *S. pombe* y un gran número de hongos dimórficos y filamentosos ¹²⁵. Constituye el 28% de la pared celular y está formado por la repetición de dos cadenas unidas linealmente, cada una formada por, aproximadamente, 120 residuos de D-glucosa unidos por enlaces $\alpha(1,3)$ y 10 residuos con enlaces $\alpha(1,4)$ situados en el extremo reductor de cada cadena ¹²⁶ (Fig. 6A).

Posee un papel esencial en el mantenimiento de la forma celular ya que cepas mutantes con menor contenido de α -glucano adquieren forma redonda ¹²⁶, y el tratamiento con α -glucanasas genera protoplastos redondeados ¹²⁷, que no se consiguen al tratar las células únicamente con β -glucanasas. Al igual que el β -glucano, el α -glucano desempeña una importante función en la generación de estructuras fibrilares, puesto que mutantes defectuosos en la biosíntesis del α -glucano son incapaces de desarrollar los haces de glucano durante la regeneración de protoplastos, aunque sí llegan a formar fibrillas ^{128,129}.

Recientemente se ha descrito que el $\alpha(1,3)$ glucano es esencial para la integridad celular durante el crecimiento polarizado y, principalmente, durante la separación celular ⁸⁵. Este polisacárido es necesario para la formación del septo secundario y para otorgar al septo primario la fuerza estructural importante para su anclaje al septo secundario y para soportar la fuerza ejercida por la presión de turgencia interna durante la separación celular. Esto permite un proceso de separación estable y gradual de las dos células hermanas.

4.1.3. Galactomanano

Es el componente glucídico de las glicoproteínas de la pared y representa del 9 al 14 % del total de los azúcares de la pared celular. Está formado por un esqueleto lineal de unidades de D-manosa unidas mediante enlaces $\alpha(1,6)$ y con ramificaciones en enlaces $\alpha(1,2)$ o $\alpha(1,3)$, terminadas por un resto de galactosa en los extremos no reductores (Fig. 6A). También se ha encontrado una pequeña cantidad de galactosa situada en posición no terminal ^{118,130}.

El galactomanano se encuentra unido a proteínas mediante enlaces covalentes N- y O-glucosídicos, dando lugar a las galactomananoproteínas. Esta glicosilación se produce en el retículo endoplasmático (RE) y en el aparato de Golgi ¹³¹, y las glicoproteínas generadas se secretan al espacio periplásmico, uniéndose a los polisacáridos de la pared celular, tanto mediante enlaces no covalentes (por puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, interacciones electrostáticas), como covalentes, que dependiendo del tipo y el polisacárido al que se unen se dividen en dos grupos ¹³²:

- Proteínas de la pared celular unidas mediante un residuo GPI (GPI-CWPs, de “Glycosyl phosphatidyl inositol - Cell wall proteins”): Contienen un residuo GPI por el que se unen a la pared. Este residuo es añadido post-traduccionalmente en la zona C-terminal de la proteína por medio de una GPI transamidasa que reconoce una secuencia señal para anclar el GPI y eliminar el resto de la secuencia C-terminal de la proteína ¹³³. Las proteínas GPI están asociadas al $\beta(1,6)$ glucano y éste al $\beta(1,3)$ glucano.

- Proteínas Pir (Pir-CWPs, de “Protein internal repeats - Cell wall proteins”):

Presentan repeticiones ricas en glutamina con el motivo consenso Q[IV]XDGQ[IVP]Q, un péptido señal, un sitio de corte por Kex2 y un dominio C-terminal que contiene cuatro residuos de cisteínas con una estructura -C-65/66-C-C-12-C¹³². Las proteínas Pir se han descrito inicialmente en *S. cerevisiae*¹³⁴. Son proteínas unidas directamente al $\beta(1,3)$ glucano a través de un enlace covalente sensible a álcali.

4.2. Arquitectura de la pared celular

La estructura de la pared celular de *S. pombe* observada mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) presenta una apariencia trilaminar, con una capa central menos densa a los electrones formada por la fibras de glucano, flanqueada por dos capas más densas a los electrones que contienen principalmente galactomanoproteínas (**Fig. 6A**)^{113,130}. Durante la citocinesis en la zona media de la célula se sintetiza el septo de división que formará la barrera física necesaria para permitir la separación de las células hermanas. Su estructura también presenta tres capas cuando se observa mediante MET, el septo primario menos denso al paso de los electrones, flanqueado a ambos lados por el septo secundario más denso (**Fig. 6B**).

El análisis mediante microscopía electrónica de barrido de la regeneración de la pared celular en protoplastos mostró que se estructura creando una red de fibras que se unen a modo de cintas. Estas, a su vez, se agrupan formando haces interconectados rodeados de partículas amorfas. Mediante MET usando lectinas específicas marcadas con oro coloidal, se determinó que dichas partículas corresponden al galactomanano. El uso de Aculeacina A, un inhibidor específico de la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano, mostró que este glucano es el principal componente de la estructura fibrilar. Sin embargo, también se requiere la presencia del $\alpha(1,3)$ glucano para generar dicha estructura, ya que mutantes con un defecto en la síntesis de $\alpha(1,3)$ glucano, aunque mantienen la estructura fibrilar, son incapaces de desarrollar las estructuras de haces durante la regeneración de los protoplastos^{122,128,129}.

Experimentos de inmunomicroscopía electrónica usando anticuerpos marcados con oro coloidal, específicos contra los diferentes β -glucanos, han permitido definir la organización de los diferentes polisacáridos en el septo y la pared celular de *S. pombe*¹¹³ (**Fig. 7**):

$\beta(1,3)$ glucano lineal (L- β G): Se localiza casi exclusivamente en el septo primario^{113,121}.

$\beta(1,3)$ glucano ramificado: Se distribuye por toda la pared celular y se encuentran tanto en el septo primario como en el secundario. Ocasionalmente, las partículas de oro marcan finos filamentos que se extienden perpendicularmente desde la membrana plasmática hacia la capa de galactomanano situada en la superficie externa de la pared.

$\beta(1,6)$ glucano ramificado: Está presente en la parte externa de la capa de la pared celular menos densa a los electrones, bajo la capa externa de galactomanoproteínas de la pared lateral y en el septo secundario¹¹³. Esta localización estaría de acuerdo con el hecho de que el $\beta(1,6)$ glucano conectara las proteínas de la superficie exterior con el resto de los polisacáridos de la pared celular¹²⁴.

.....

$\alpha(1,3)$ glucano: Los anticuerpos policlonales unidos a oro coloidal disponibles para inmunomicroscopía solo detectan un $\alpha(1,3)$ glucano corto e inmaduro, que se puede observar de forma discreta en la superficie e interior de toda la pared celular, pero la mayoría de partículas se localizan a lo largo de la membrana plasmática, e incluso en la parte más externa del citoplasma. Esto sugiere que los anticuerpos usados únicamente reconocen un $\alpha(1,3)$ glucano recién sintetizado, apoyando la idea de que el $\alpha(1,3)$ glucano se sintetiza en la membrana plasmática ¹¹⁴.

Estudios mediante inmunomicroscopía con lectinas específicas han permitido localizar el galactomanano tanto en la superficie exterior de la pared celular como en la superficie interior, junto a la membrana plasmática ¹³⁵⁻¹³⁷.

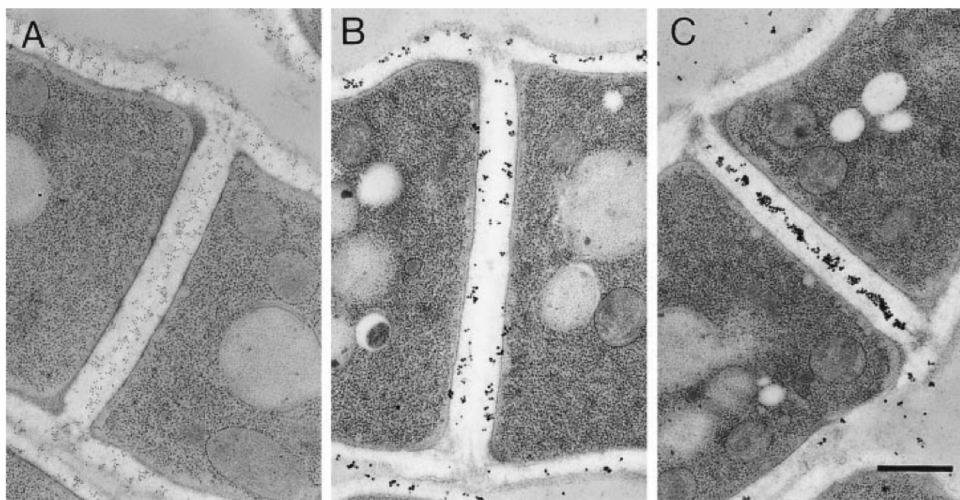


Figura 7. Inmunolocalización de los distintos tipos de β -glucano de la pared celular de *S. pombe*. Inmunomicroscopía electrónica de transmisión utilizando anticuerpos conjugados con oro coloidal específicos contra el $\beta(1,3)$ -glucano ramificado (A), el $\beta(1,6)$ -glucano (B) y el L- β G (C). El $\beta(1,3)$ -glucano ramificado aparece localizado por toda la pared celular y por todo el septo de división. El $\beta(1,6)$ -glucano se localiza por toda la pared celular y en el septo secundario. Por último, el L- β G se localiza casi exclusivamente en el septo primario. Barra 0,5 μ m. Figura adaptada de ¹¹³.

5. BIOSÍNTESIS DE LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR Y SU REGULACIÓN.

5.1. Biosíntesis del $\beta(1,3)$ glucano

La biosíntesis del $\beta(1,3)$ glucano se cataliza por el complejo enzimático $\beta(1,3)$ glucán sintasa (β GS) [UDP-glucosa: (1,3) β -D-glucano-3- β -D-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.34], que se encuentra asociado a la cara interna de la membrana plasmática y requiere la presencia de los nucleósidos trifosfato GTP o ATP para su activación ^{138,139} (Fig. 8). Esta enzima sintetiza *in vitro* cadenas lineales de $\beta(1,3)$ glucano *de novo* con 60-80 residuos de glucosa, carente de ramificaciones $\beta(1,6)$, y de una longitud mucho menor que el β -glucano de la pared celular. La actividad β GS posee al menos dos componentes: una unidad catalítica, correspondiente a una fracción insoluble en presencia de detergentes y NaCl, y una subunidad reguladora que está en la fracción soluble y se activa cuando se une a GTP ¹⁴⁰⁻¹⁴³.

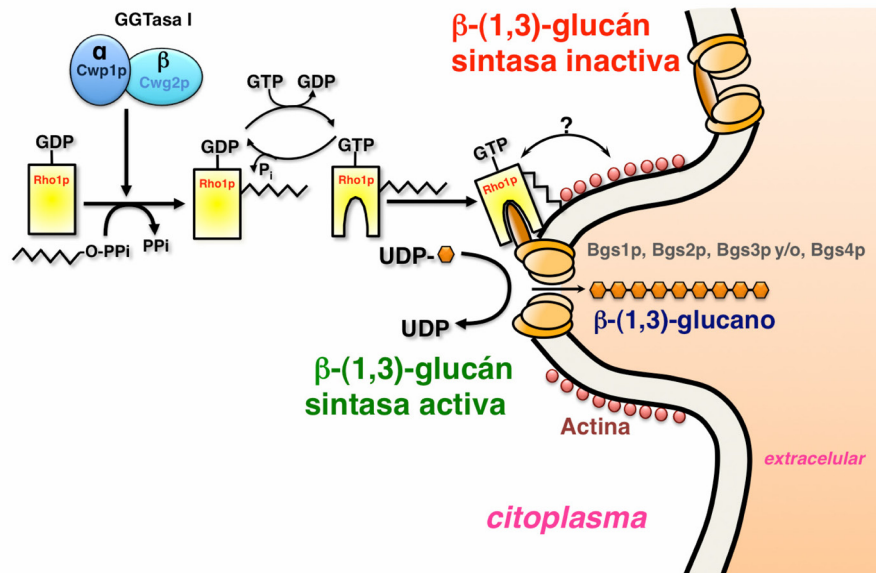


Figura 8. Modelo de activación del complejo $\beta(1,3)$ glucán sintasa en *S. pombe*. El complejo enzimático, formado por al menos dos componentes, se localiza en la cara interna de la membrana plasmática. Estudios bioquímicos permitieron el fraccionamiento del complejo en dos componentes: la GTPasa Rho1, subunidad reguladora encargada de la activación del enzima, y la subunidad catalítica, formada por la familia de proteínas Bgs. La GTPasa Rho1 debe ser prenilada por el heterodímero geranilgeranil-transferasa de tipo I (GGTasa I), formada por Cwp1 y Cwg2, para poder anclarse a la membrana plasmática. Adaptado de ²⁸³.

5.1.1. Subunidad catalítica de la β GS

Los genes que codifican la subunidad catalítica responsable de la actividad β GS fueron identificados inicialmente en *S. cerevisiae* y nombrados *FKS1* y *GSC2/FKS2* ¹⁴⁰⁻¹⁴⁵. *FKS1* (de “**FK**506 sensitive”) fue clonado por primera vez por complementación de un mutante hipersensible a inhibidores de la calcineurina ^{146,147}. Simultáneamente en otros laboratorios se clonaron los genes *ETG1* y *PBR1*, cuyas mutaciones confieren resistencia a antifúngicos que inhiben específicamente la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano de la pared celular ^{144,148,149}, *CND1*, cuya mutación requiere una ruta de la calcineurina funcional ¹⁵⁰, y *CWH53*, clonado a partir de cepas mutantes hipersensibles a CW ¹⁵¹.

La purificación parcial de la actividad β GS mediante atrapamiento del producto insoluble de la reacción permitió la clonación e identificación de dos genes que codifican secuencias homólogas, *GCS1* (*FKS1*) y *GCS2* (*FKS2*) ¹⁵². *FKS2* también fue clonado por homología de secuencia con *FKS1*, con la que presenta una alta identidad (88%) ¹⁴⁵. La delección simultánea de *FKS1* y *FKS2* es inviable, lo que sugiere que durante el crecimiento vegetativo *Fks1* y *Fks2* son dos subunidades alternativas con funciones esenciales y solapadas ^{145,152}.

FKS1 y *FKS2* presentan un patrón de expresión diferente. La transcripción de *FKS1* está regulada por el ciclo celular y asociada a la remodelación de la pared celular mientras que la de *FKS2* depende de la calcineurina ¹⁵³. *FKS1* se expresa durante el crecimiento vegetativo normal, de acuerdo a su función propuesta como la principal subunidad de la β GS. Por otro lado *FKS2* se induce a altas temperaturas, a través de la ruta de MAP quinasas de integridad celular, o independientemente de esta ruta, al entrar en fase estacionaria. La expresión de *FKS2* se activa a través de una cuarta vía que se induce en ausencia de la función de *Fks1*, en presencia de altas concentraciones de calcio, o en respuesta a feromonas ¹⁴⁵. Durante diferenciación sexual los zigotos *fks2D* son incapaces de formar esporas. La gravedad de

.....

fenotipos observados en *fks1*Δ comparados con los observados en *fks2*Δ, sugieren que Fks1 es la principal responsable de la actividad y de la síntesis de β(1,3)glucano durante el crecimiento vegetativo, mientras que Fks2 funcionaría principalmente bajo condiciones de estrés ¹.

Durante la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* se identificó un tercer gen, *FKS3*, ¹⁵⁴ cuyo producto es necesario para la esporulación ^{155,156} Fks3, al igual que Fks2, es necesaria para la maduración de la pared de la espora, ya que mutantes con las deleciones *fks2*Δ y *fks3*Δ presentan defectos en el ensamblaje de las capas de β(1,3)glucano y una reducción de la resistencia a ciertos tipos de estrés (altas temperaturas, etanol, dietiléter), aunque Fks2 presenta la función mayoritaria ¹⁵⁶.

La familia de las βGS está muy conservada en hongos y plantas, y son proteínas largas con múltiples dominios de membrana y una región hidrofílica central ¹⁵⁷. Se han descrito ortólogos de estos genes en la mayoría de los géneros de hongos, que codifican proteínas con un alto grado de identidad con las Fks, desde el 56% (*Cryptococcus neoformans*) hasta el 83% (*Candida glabrata*) ^{1,110,158,159}. Entre las βGS de plantas y hongos existe un 21-30% de identidad y un 41-54% de similitud ¹⁶⁰⁻¹⁶².

En *S. pombe*, la clonación de genes a partir de mutantes obtenidos por diversas estrategias genéticas y la disponibilidad de la secuencia completa del genoma para su análisis, permitió identificar cuatro genes que presentan una alta identidad entre sí y con las proteínas Fks, por lo que se consideraron posibles subunidades catalíticas de la βGS, denominándose proteínas Bgs (de “β(1,3)-D-glucan synthesis”). Estas subunidades están codificadas por 4 genes, de *bgs1*⁺ a *bgs4*⁺, todos ellos esenciales para la viabilidad celular a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* y otros hongos, donde *FKS1* y *FKS2* han mostrado tener funciones redundantes ^{121,158,163-167}. Las subunidades catalíticas de la βGS de la levadura de fisión desempeñan distintas funciones esenciales en el ensamblaje y transporte de los diferentes β(1,3)glucanos durante el crecimiento polarizado de la pared celular, la síntesis del septo y la formación de la pared de la ascospora.

De forma similar a Fks1 y Fks2 de *S. cerevisiae*, las Bgs son proteínas integrales de membrana con un alto peso molecular (≈200KDa), que contienen entre 15 y 16 hipotéticas hélices transmembranales, agrupadas en dos regiones hidrofóbicas y separadas por una región hidrofílica central. Esta región hidrofílica central está muy conservada en todos los hongos, presentando un alto grado de identidad entre todas las hipotéticas subunidades catalíticas βGS ¹ (**Fig. 9**). Ninguna de las subunidades Bgs, Fks o CalS (calosa sintasa de plantas) contienen la secuencia consenso D,D,D,QXXXRW típica de las celulosas sintasas de plantas y bacterias, e implicada en la unión a UDP-glucosa y en la transferencia de su resto glucosilo. Tampoco contienen la secuencia consenso (R/K)XGG típica de las glucógeno sintasas ¹⁶⁸. Sin embargo, todas tienen otra secuencia conservada, RXTG, que podría formar parte del dominio de unión a la UDP-glucosa ^{169,170}. A pesar de que la βGS nunca se ha purificado totalmente, se ha visto que el dominio hidrofílico de una βGS de *Neurospora crassa* parcialmente purificado, se une al sustrato azida-UDP-glucosa, sugiriendo que esta proteína es la subunidad catalítica de la enzima ¹⁷¹. En el futuro, para poder avanzar en el conocimiento de la función de las subunidades catalíticas de la βGS, será necesaria su purificación completa desde la membrana plasmática en condiciones que mantengan su actividad enzimática intacta ¹.

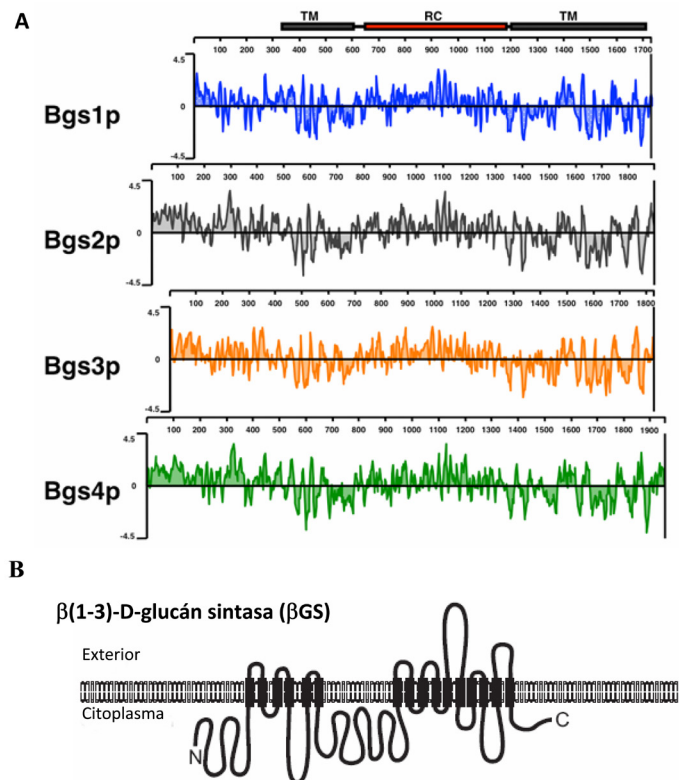


Figura 9. Perfiles hidropáticos de las proteínas Bgs de *S. pombe* y topología de β GS. **(A)** Perfiles hidropáticos de las proteínas Bgs de *S. pombe*²⁸⁴, indicando las hipotéticas regiones transmembranales (TM) y la región central hidrofílica (RC). **(B)** Hipotética topología transmembranal de la enzima $\beta(1,3)$ glucan sintasa basándose en Fks1 de *S. cerevisiae*¹⁵³ mediante el análisis de su perfil hidropático.

5.1.1.1. Bgs1/Cps1

El gen *bgs1*⁺ se clonó por primera vez mediante complementación del mutante termosensible *cps1-12* (de “Clorprofam sensitive”), descrito como hipersensible al compuesto inhibidor del huso mitótico CIPC (isopropil *N*-3-clorofenil carbamato o “clorprofam”). La cepa mutante *cps1-12* también presenta hipersensibilidad a papulacandina B, un inhibidor específico de la β GS, y a ciclosporina A, un inhibidor específico de la Calcineurina¹⁷⁰. Incubada a la temperatura restrictiva, esta cepa exhibe un aumento de la actividad β GS y una subida del porcentaje de la pared celular, que es debida a un exceso del α -glucano¹⁷⁰. Posteriormente, el gen *bgs1*⁺ fue clonado por complementación de otras cepas mutantes con defectos en la formación del septo, *sw11-N12* (de “swollen”) y *drc1-191* (de “defective in ring constriction”). Estas cepas más tarde se renombraron como *cps1-N12* y *cps1-191*. Se caracterizan porque no forman correctamente el septo de división y se paran en la fase G2 del ciclo celular lo que sirvió para describir e implicar a Bgs1 en un “checkpoint” de septación^{165,172,173}.

Bgs1 es una proteína integral de membrana de 1729 aminoácidos con un peso molecular de 200 kDa (Fig. 9), su vida media es superior a cuatro horas y su concentración en la célula no experimenta variaciones a lo largo del ciclo celular¹⁷⁴, siendo la proteína Bgs menos abundante^{121,175}. A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* con las proteínas Fks, la función de Bgs1 es esencial para la célula^{121,158,165}.

Bgs1 se localiza en el CAR y de forma menos intensa a lo largo de la membrana que flanquea al septo durante la división celular (**Fig. 10**), en los polos durante la interfase y en todos los sitios donde se produce síntesis o remodelación de la pared celular durante la diferenciación sexual y la germinación de las esporas^{158,165}. La maquinaria de secreción es esencial para la localización correcta de Bgs1 en los polos^{40,84,174,176}, mientras que el citoesqueleto de actina es necesario para la localización de la enzima en el anillo de división aunque no para su mantenimiento en esta estructura^{158,174}.

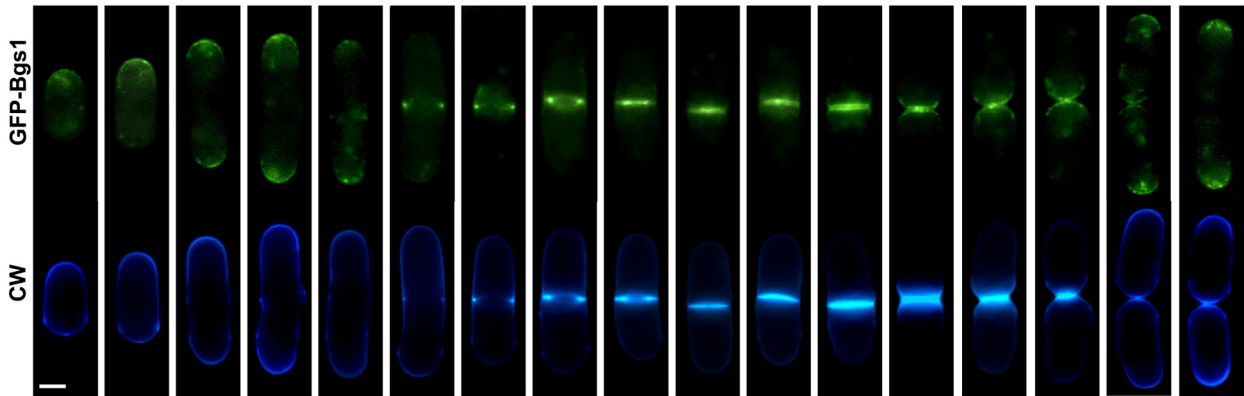


Figura 10. Localización de Bgs1 durante el crecimiento vegetativo. Bgs1 se localiza en las zonas de crecimiento, es decir, en uno o ambos polos y en el anillo y septo. Imágenes de fluorescencia de la progresión en el ciclo celular de una célula procedente de un cultivo de células (*GFP-bgs1⁺ bgs1Δ*), creciendo en fase logarítmica temprana en medio YES a 28°C, y a las que se les realizó una tinción con Calcofluor (CW). El CW fue añadido a una concentración final de 50 mg/ml inmediatamente antes del análisis de la muestra. Barra, 2,5 μm. (Cortés et al., 2007)

Bgs1 es responsable de la síntesis del L-βG que a su vez es responsable de la formación de la estructura del septo primario. Así, se ha observado que esporas carentes de Bgs1 forman septos aberrantes que no se tiñen con CW al no poseer el L-βG del septo primario (**Fig. 11**). En células con una represión fuerte de *bgs1⁺* (más de mil veces) todavía existen septos que presentan un L-βG desorganizado pero no la estructura del septo primario lo que sugiere que el β(1,3)glucano lineal es necesario, pero no suficiente para la formación del septo primario y apoya la importancia del β(1,3)glucano ramificado y el α(1,3)glucano en el mantenimiento de la estructura del septo primario^{85,121,123,158}. Por otro lado, el hecho de que los septos aberrantes que se forman en ausencia de Bgs1 no puedan ser degradados tras la mitosis, sugiere que la organización correcta del L-βG es necesaria para su degradación durante el proceso de separación celular¹²¹.

5.1.1.2. **Bgs2**

El proyecto de secuenciación del genoma de *S. pombe* permitió la identificación de *bgs2⁺* como un gen que codifica una proteína con similitud a Bgs1 y a las proteínas homólogas Fks de *S. cerevisiae*. Bgs2 es una proteína integral de membrana de 1894 aminoácidos con un peso molecular de 219 kDa, y cuya ausencia no produce ningún defecto en células vegetativas. Sin embargo, durante el proceso de esporulación Bgs2 es esencial para la actividad βGS y la síntesis del β-glucano de la pared de las esporas^{164,167}.

5.1.1.3. **Bgs3**

El gen *bgs3*⁺ fue identificado como supresor en multicopia del mutante *ehs2-1* hipersensible a Equinocandina B y CW¹⁷⁷, y codifica una proteína integral de membrana de 1826 aminoácidos con un peso molecular de 211 kDa. Bgs3, al igual que Bgs1, se localiza en los sitios de crecimiento activo durante interfase, en las proyecciones de conjugación o “shmoos” durante el proceso de conjugación y en los tubos germinativos de las esporas. Bgs3 también es esencial durante el crecimiento vegetativo y en su ausencia las células son ovaladas e hinchadas, lo que sugiere que Bgs3 podría estar implicada en el mantenimiento de la forma celular. La ausencia de Bgs3 no modifica la actividad β GS medida in vitro, ni el $\beta(1,3)$ glucano de la pared celular. Sin embargo, si produce un aumento del grosor de la pared celular debido a un considerable aumento del α -glucano¹⁶⁶. Aunque se desconoce la función específica de Bgs3, se ha descrito que su cantidad aumenta en ausencia de Bgs1 y Bgs4, lo que sugiere que interviene en mecanismos compensatorios en respuesta a alteraciones de la pared celular^{121,175}.

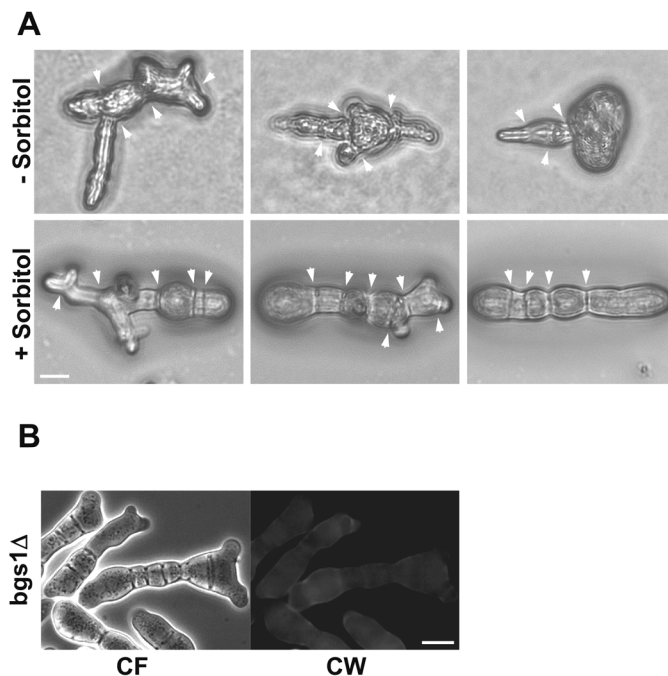


Figura 11. Bgs1 no es necesario para la síntesis del septo pero es responsable de la formación de un septo teñible con Calcoflúor. **(A)** Esporas de *bgs1Δ* son capaces de germinar originando células multiseptadas incapaces de llevar a cabo la separación celular y que finalmente mueren. Imágenes de microscopio de células *bgs1Δ* obtenidas tras la incubación de esporas *bgs1Δ* en placas de YES con o sin sorbitol (según se indica) durante 2-3 días a 28 °C. Las flechas indican los múltiples septos observables en las células. **(B)** Los septos de *bgs1Δ* no se tiñen con Calcoflúor (CW). Las células *bgs1Δ* se incubaron como en (A) y se analizaron por tinción con CW (12,5 mg/ml). CF, contraste de fases. Barras, 10mm.¹²¹.

5.1.1.4. **Bgs4**

La búsqueda de cepas mutantes afectadas en la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano de la pared celular, denominadas *cwg* (de “cell wall glucan”), originó el aislamiento de *cwg1-1*, *cwg1-2* y *cwg2-1* que presentaban defectos en la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano de la pared celular y en la actividad β GS^{141,159}. El defecto de *cwg2-1* residía en la fracción soluble reguladora del complejo β GS mientras que el defecto de *cwg1-1* y *cwg1-2* estaba asociado a la fracción insoluble catalítica, lo que sugirió que el gen *cwg1*⁺ podría codificar la subunidad catalítica del complejo β GS¹⁴¹. Posteriormente, la secuenciación del genoma de *S. pombe* permitió la identificación del gen *cwg1*⁺ como *bgs4*⁺, que codifica una proteína con una alta identidad con las otras proteínas Bgs/Fks^{163,178}. De forma similar, se ha demostrado que *pbr1-6* y *pbr1-8* son alelos mutantes de *bgs4*⁺ con mutaciones que confieren resistencia a antifúngicos inhibidores de la actividad β GS, lo que amplía y define dos nuevos “hot spot” de resistencia dentro de los mutantes de la familia *FKS*^{148,179}.

Bgs4 es una proteína integral de membrana de 1955 aminoácidos con un peso molecular de 225 kDa que se localiza en los mismos sitios que Bgs1 y Bgs3, aunque su localización en la zona media es más tardía que la de Bgs1^{121,175}. Bgs4 es la subunidad Bgs más abundante en la célula y es responsable de la mayoría de la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano de la pared celular y de la actividad β GS valorada in vitro.^{141,163,179}

El análisis de los fenotipos producidos por la represión de *bgs4*⁺ mostró que Bgs4 es esencial para el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento polarizado y sobre todo en la zona del septo al comienzo de la separación celular durante la citocinesis. Su ausencia también produce un descenso de la actividad β GS medida in vitro mientras que la pared celular muestra un contenido normal de β -glucano y un aumento sustancial del α -glucano, además de un aumento en la cantidad de proteína de las GS^{163,175}, lo que sugiere la activación de un mecanismo compensatorio de la pared celular en ausencia de Bgs4 que no ocurre en cepas que tienen alelos mutantes de *bgs4*⁺. Recientemente se ha demostrado que el $\beta(1,3)$ glucano sintetizado por Bgs4 es necesario para el posicionamiento correcto y la estabilización del CAR en el ecuador de la célula antes del inicio de la septación. La ausencia de Bgs4 origina anillos y septos mal posicionados, que se sintetizan sin la formación de un septo secundario, y donde la síntesis del septo primario se encuentra desacoplada de la membrana y el CAR, que es más lábil y presenta inicialmente una contracción más rápida¹²³.

5.1.2. Subunidad reguladora de la β GS

Además de la subunidad catalítica, la β GS tiene una subunidad reguladora, cuya actividad depende de GTP. En *S. cerevisiae* y en *S. pombe* se identificó a la GTPasa Rho1 (de “**Ras homology**”) como la subunidad reguladora del complejo β GS¹⁸⁰⁻¹⁸³. Tras su síntesis en el retículo endoplásmico, Rho1 es prenilado mediante la adición de un resto hidrofóbico de geranilgeranilo en su extremo C-terminal por parte del complejo Cwg2-Cwp1, geranilgeranil transferasa tipo I que permite el anclaje de Rho1 a la membrana plasmática y la activación de la subunidad catalítica β GS¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ (**Fig. 8**). Aunque los miembros de la familia de las Fks se han establecido como efectores de Rho1, los dominios de interacción entre las subunidades catalítica y reguladora de la β GS y las bases para la activación de las subunidades catalíticas por parte de Rho1 siguen sin esclarecerse¹.

5.2. Biosíntesis del $\beta(1,6)$ glucano

Comparado con los conocimientos que se tiene de la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano, se sabe muy poco acerca de la síntesis del $\beta(1,6)$ glucano en *S. pombe*. Hasta la fecha, la mayoría de los genes implicados en la síntesis de este polisacárido se han descrito en *S. cerevisiae* y la información proviene del uso de dos estrategias. Por un lado la detección de mutantes resistentes a la toxina Killer K1¹⁸⁷, y por otro, la búsqueda de mutantes sensibles al CW¹⁸⁸. Gracias a estos y otros estudios, se han descrito un gran número de genes, como los denominados *KRE* (de “**Killer resistant**”) y los *CWH* (de “**Calcofluor White Hypersensitive**”), implicados directa o indirectamente en la biosíntesis del $\beta(1,6)$ glucano. Las proteínas codificadas por estos genes pertenecen a la ruta secretora^{1,187,189}, sugiriendo que la síntesis de este polímero podría iniciarse en el retículo endoplásmico. En *S. pombe* se han podido detectar partículas de $\beta(1,6)$ glucano asociadas al aparato de Golgi¹¹³, sugiriendo que la biosíntesis de este polímero progresa en el Golgi y se completa en la superficie celular. Sin embargo, mutaciones de la ruta de secreción no impiden la acumulación del $\beta(1,6)$ glucano en la superficie celular¹⁹⁰, lo que sugiere que el $\beta(1,6)$ glucano,

al igual que el $\beta(1,3)$ glucano, puede ser sintetizado en la membrana plasmática. Estudios *in vitro* utilizando extractos de membrana de *S. cerevisiae* han permitido detectar y valorar una actividad $\beta(1,6)$ glucán sintasa que requiere UDP-glucosa como sustrato y es activada por GTP. Igualmente, la GTPasa Rho1 participa en la activación de esta actividad $\beta(1,6)$ glucán sintasa¹⁹¹. También se ha detectado actividad $\beta(1,6)$ glucán sintasa utilizando células de *S. cerevisiae* permeabilizadas y UDP-[14C]-glucosa¹⁹². Según este estudio no existe una activación por GTP, lo cual sugiere que no se activa por Rho1. Un descenso de la actividad β GS o del contenido de $\beta(1,3)$ glucano induce una disminución del $\beta(1,6)$ glucano de la pared celular, lo que sugiere que la síntesis de ambos polímeros podría estar coordinada¹⁹² o que la incorporación de $\beta(1,6)$ glucano depende del $\beta(1,3)$ glucano.

5.3. Biosíntesis del α -glucano

Muchos hongos contienen $\alpha(1,3)(1,4)$ glucano en su pared celular. Sin embargo, aún no se ha descrito una actividad enzimática α GS capaz de sintetizar *in vitro* cadenas de $\alpha(1,3)$ glucano. En el genoma de *S. pombe* se han identificado varios genes que codifican posibles α GS. Ags1/Mok1 es una proteína integral de membrana de 2410 aminoácidos y un peso molecular de 271 kDa y, en base a estudios del perfil hidropático y de su secuencia, se ha propuesto que Ags1 sería una proteína multifuncional, constituida por tres dominios diferenciados (Fig. 12): un dominio central intracelular con actividad glucógeno sintasa encargado de sintetizar el α -glucano; un dominio transmembranal situado en la zona C-terminal que formaría un poro para exportar la cadena recién sintetizada; y un dominio transglicosilasa o glucosil hidrolasa, situado en la región N-terminal, encargado de la extensión o remodelación del polímero sintetizado o de su unión a otros carbohidratos^{114,126,193-195}.

Ags1 se localiza en los sitios de crecimiento activo tanto en fase vegetativa como durante diferenciación sexual. Su localización en los polos depende de las proteínas del establecimiento de la polaridad, de los parches de actina y del exocisto, mientras que su localización en la zona de división depende del ensamblaje y posicionamiento del CAR, pero no de la ruta del inicio de la septación (SIN, de "Septation Initiation Network")⁸⁵. La sobreexpresión de *ags1*⁺ provoca un aumento del α -glucano de la pared celular y por otro lado, el mutante termosensible *mok1-664* muestra en condiciones restrictivas una disminución del α -glucano de la pared celular y una morfología celular redondeada y frágil¹⁹⁴. La represión de *ags1*⁺ también induce una bajada de contenido de α -glucano y conduce a la lisis de la célula⁸⁵.

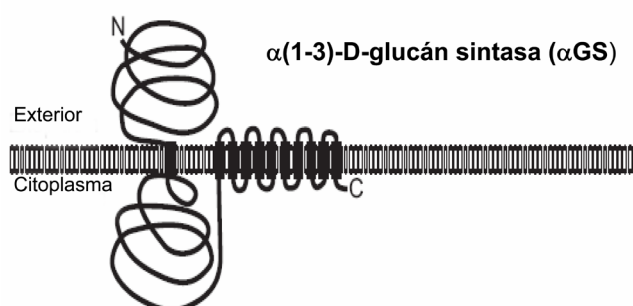


Figura 12. Topología transmembranal de Ags1 de *S. pombe*. Hipotética topología transmembranal de la enzima $\alpha(1,3)$ -glucán sintasa Ags1 de *S. pombe*¹⁹³ basada en su perfil hidropático.

La regulación de la actividad α GS depende de la GTPasa Rho2 y la quinasa Pck2^{194,196}. Rho1 también regula la biosíntesis del α -glucano ya que la sobreexpresión de esta GTPasa causa un aumento general de la pared pero se desconoce cómo se ejerce esta regulación (Arellano *et al.*, 1996).

.....

mok11⁺, *mok12⁺*, *mok13⁺* y *mok14⁺* codifican cuatro proteínas con elevada similitud a Ags1. Estas proteínas no se detectan durante el ciclo vegetativo pero intervienen, y algunas son esenciales, en el proceso de esporulación ¹⁹⁷. La función de Mok11 es desconocida. Mok12 y Mok13 son responsables de la síntesis del $\alpha(1,3)$ glucano de la pared de las ascosporas ¹⁹⁷. Mok14 es responsable de la síntesis de un polímero amiloide compuesto mayoritariamente por enlaces de $\alpha(1,4)$ ¹⁹⁷.

5.4. Biosíntesis del galactomanano

Las proteínas de la pared celular sufren modificaciones mediante N- y O-glicosilaciones antes de incorporarse a la misma. La O-glicosilación consiste en la adición de cadenas cortas de manosas con enlaces $\alpha(1,2)$ y $\alpha(1,3)$ a los residuos de serina o treonina de la proteína, mientras que la N-glicosilación consiste en la unión de largas cadenas de manosas con enlaces $\alpha(1,6)$ y ramificadas en enlaces $\alpha(1,2)$ y $\alpha(1,3)$ sobre residuos de asparragina. Ambos procesos se inician en el RE y continúan con la modificación y extensión de las cadenas de manosas en el aparato de Golgi, así como con la adición de un residuo de galactosa en los extremos no reductores de las cadenas de manosas en el caso de *S. pombe* ¹⁹⁸.

6. GTPasas DE LA FAMILIA Rho

Las GTPasas de la familia Rho forman parte de la superfamilia Ras de proteínas G pequeñas y son proteínas reguladoras de muchos de los procesos morfológicos en organismos eucariotas. Estas proteínas tienen la capacidad de unir nucleótidos de guanina (GDP o GTP) y como casi todos los miembros de la superfamilia de Ras, se comportan como interruptores moleculares, fluctuando entre los estados activo e inactivo que dependen de la conformación de la GTPasa al unir GTP o GDP, respectivamente ¹⁹⁹⁻²⁰¹. Además, poseen actividad GTPásica intrínseca, lo que les permite hidrolizar el GTP al que se encuentran unidas, dando lugar a GDP y fosfato inorgánico.

Para que las GTPasas realicen sus funciones de manera adecuada es necesaria la existencia de un gran número de proteínas que regulen el ciclo GDP/GTP. Existen tres clases de proteínas reguladoras de las proteínas Rho (**Fig. 13**):

- Las proteínas GEF (de “Guanine Nucleotide Exchange Factor”): Son proteínas que al interactuar con las GTPasas provocan un cambio conformacional que favorece la unión del GTP ^{199,202}.

- Las proteínas GAP (de “GTPase Activating Protein”): Son proteínas que promueven la actividad GTPásica intrínseca de la proteína G favoreciendo la hidrólisis del GTP a GDP provocando que la GTPasa se encuentre en estado inactivo ²⁰².

- Las proteínas GDI (de “GDP Dissociation Inhibitor”): Son proteínas que inhiben la disociación del nucleótido GDP y tienden a mantener a la GTPasa en estado inactivo. ²⁰⁰.

6.1. Rho GTPasas de *S. pombe*

S. pombe contiene en su genoma seis genes que codifican seis GTPasas de la familia Rho con 59% a 91% de similitud entre ellas. De todas ellas, como en *S. cerevisiae*, sólo Rho1 y Cdc42 son esenciales ²⁰¹.

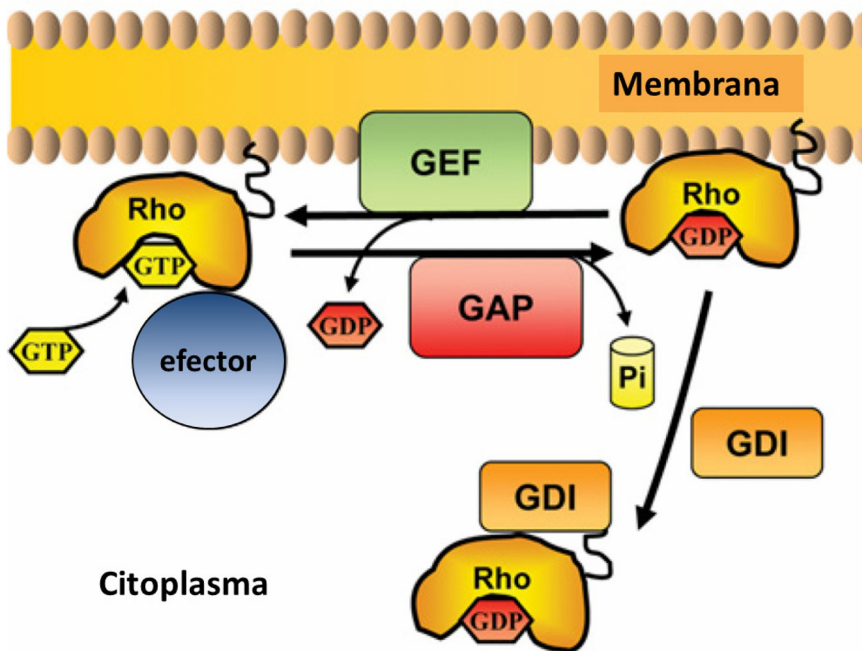


Figura 13. Regulación de las GTPasas Rho. Ilustración esquemática de la regulación de las GTPasas de la familia Rho. Las proteínas con actividad GEF favorecen el intercambio de GDP por GTP y activan las GTPasas permitiendo así la unión de estas a sus efectores. Las proteínas con actividad GAP inactivan a las GTPasas estimulando la actividad GTPásica intrínseca de estas. Los factores GDI se unen a la forma prenilada inactiva (unida a GDP) de las GTPasas y las secuestran en el citosol.

6.1.1. Rho1

En hongos Rho1 activa directamente las subunidades catalíticas responsables de la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano de la pared celular^{142,203}. El gen *rho1⁺* de la levadura de fisión fue aislado utilizando ADN copia de *RhoA* como sonda frente a una genoteca de ADN de *S. pombe*²⁰⁴. Las células que sobreexpresan *rho1⁺* poseen una pared celular mucho más gruesa y aparecen células encadenadas, lo que sugiere un papel de Rho1 en la citocinesis. Cuando se reprime la expresión de *rho1⁺* se produce una disminución de la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa que conduce a la lisis de las células durante la septación⁵¹.

rho1⁺ codifica una proteína con un 67-73% de identidad frente a Rho1 de *S. cerevisiae* y RhoA de *Homo sapiens* respectivamente²⁰⁴, que se localiza en los sitios de crecimiento activo, polos y septo⁵¹, donde juega un papel fundamental en la activación de la síntesis de la pared celular y la regulación del citoesqueleto de actina (Fig. 14)^{180,205}.

Además de las GS, Pck1 y Pck2 se han descrito como proteínas diana de Rho1 en *S. pombe*^{196,206,207}. De esta forma Rho1 activa la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano directamente a través de las GS e indirectamente a través de Pck1 y Pck2 (Fig. 14).

La regulación de Rho1 se lleva a cabo a través de al menos tres activadores o proteínas GEFs denominados Rgf1, Rgf2 y Rgf3. Rgf1 regula a Rho1 durante el crecimiento polarizado y participa en el proceso de NETO²⁰⁸. Rgf2 es esencial en esporulación y coopera con Rgf1 durante el crecimiento vegetativo²⁰⁹. Rgf3 activa a Rho1 específicamente durante la citocinesis²¹⁰⁻²¹². Se han descrito también tres proteínas GAPs (Rga1, Rga5 y Rga8) que regulan negativamente a Rho1. Además, Rho1 podría estar regulado por Rdi1, el único Rho-GDI de *S. pombe*, que también interacciona con Rho4 y Cdc42²¹³. Por último, la proteína ortóloga de la paxilina, Pxl1, también regula negativamente la actividad de Rho1 y tiene un papel en la formación y contracción del CAR²¹⁴.

6.1.2. Rho2

El gen *rho2*⁺ fue identificado en un análisis masivo de genes cuya sobreexpresión causaba una morfología aberrante. Rho2 regula la síntesis del α -glucano de la pared celular^{196,215}. Igual que Rho1, Rho2 se localiza en las zonas de crecimiento activo pero hasta la fecha no se ha descrito ningún regulador positivo de esta GTPasa. Sin embargo, se han descrito tres proteínas GAP reguladoras de Rho2: Rga2, Rga4 y Rga7²¹⁶⁻²¹⁸. La ausencia de Rho2 no es letal pero las células son sensibles a aculeacina A, fenotipo que es parcialmente rescatado por la sobreexpresión de *rho1*⁺²¹⁵. Por ello se propuso que aunque las funciones de Rho1 y Rho2 son diferentes, debía existir un solapamiento parcial entre ellas. Igual que Rho1, Rho2 interacciona en el ensayo de dos híbridos con Pck1 y Pck2, sin embargo, sólo Pck2 forma parte de la ruta de señalización de Rho2 que regula la activación y localización de Mok1,^{194,196,215} y la ruta de integridad celular²¹⁹. Esta ruta es una de las tres rutas de MAPK (de “Mitogen-Activated Protein Kinase”) presentes en *S. pombe* (Fig. 14). Regula procesos muy diversos como la integridad celular, la citocinesis, la homeostasis iónica y la fusión de vacuolas. Esta cascada de señalización incluye el módulo de MAPK quinasas compuesto por Mkh1(MAPKKK), Pek/Shk1 (MAPKK), and Pmk1/Spm1 (MAPK) y responde a diferentes estímulos de estrés^{201,220}.

Además de Rho2 y Pck2, Rho1 y Pck1 pueden funcionar como reguladores positivos de esta ruta MAPK en respuesta a daños en la pared celular^{209,221}.

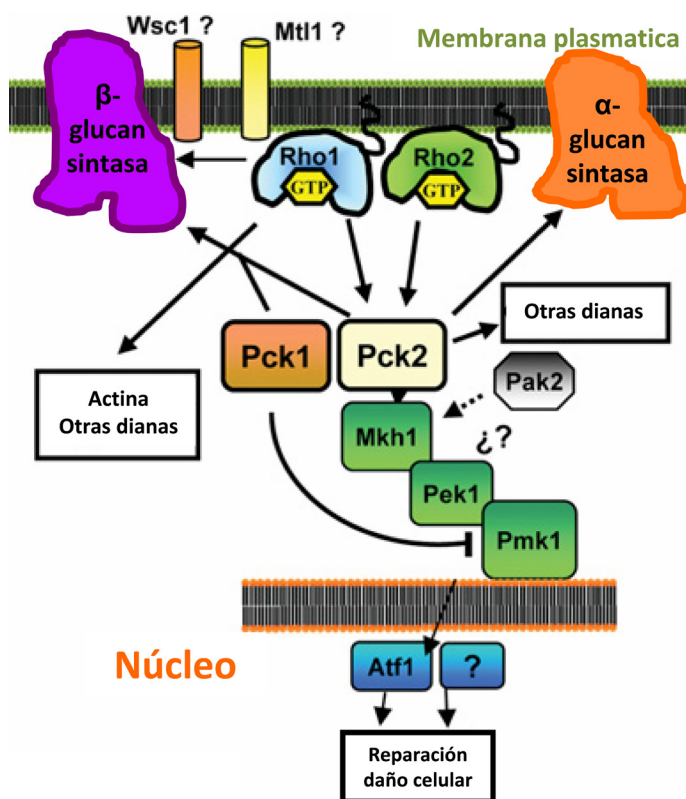


Figura 14. Representación esquemática de la ruta de integridad MAPK de *S. pombe*. En *S. pombe*, Rho1 y Rho2 activan a Pck1 y Pck2. Pck2 regula a las enzimas biosintéticas de la pared celular, α - y β -glucan sintasa y activa la ruta MAPK de integridad, mientras que Pck1 la inhibe. Rho1 y Pck1 también activan la síntesis de β -glucano de manera directa.

6.1.3. Cdc42

Cdc42 participa en el control del crecimiento polarizado y la morfogénesis y se localiza tanto en las membranas internas como en la membrana plasmática, estando más concentrada en los polos de crecimiento y en el septo. La pérdida de función de Cdc42 produce fuertes defectos en la polaridad celular, lo que indica su papel central en el establecimiento del crecimiento polarizado^{222,223}.

En *S. pombe* Cdc42 está regulada positivamente por dos GEFs, Ral1/Scd1 y Gef1, y negativamente por, al menos una GAP, Rga4 y una GDI, Rdi1^{201,224} (Fig. 15). La ausencia simultánea de las dos proteínas GEF es letal, generando células redondeadas que mimetizan el fenotipo de la delección de *cdc42*⁺, sugiriendo que Scd1 y Gef1 comparten la función esencial de activación de la GTPasa.

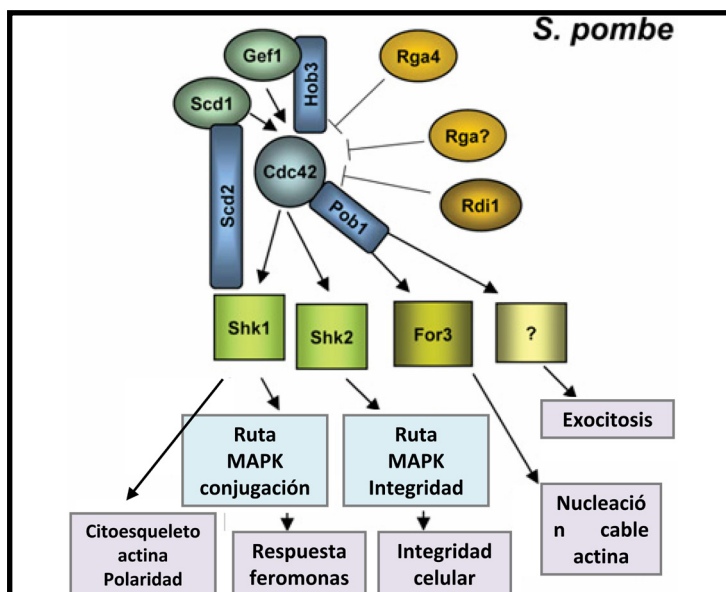


Figura 15. Reguladores y dianas de Cdc42 en *S. pombe*. Adaptado de²⁰¹

Scd1 se localiza en el núcleo, el huso mitótico, los polos de crecimiento y el septo, lo que sugiere una gran variedad de funciones en diferentes procesos. Las células carentes de Scd1 muestran un fenotipo redondeado, lo que implica a esta proteína en la regulación del crecimiento apical²²⁵. Scd1 pone en contacto a las GTPasas Ras1 y Cdc42 formando un complejo macromolecular que incluye, además, a la proteína adaptadora Scd2 y a la quinasa de la familia PAK Shk1, para regular la morfología celular y el proceso de conjugación mediante el control de la ruta MAPK de respuesta a feromonas²²⁵⁻²²⁷.

Gef1 participa en el proceso de citocinesis y en la transición de crecimiento monopolar a bipolar. Se localiza fundamentalmente en la región de división como un anillo que se contrae durante la citocinesis, aunque también puede detectarse en los polos de crecimiento. Gef1 y Cdc42 interactúan con la proteína Hob3 en la región del septo. La localización de Cdc42 en la zona media durante la citocinesis depende de Hob3, lo que podría ser la causa de los defectos de septación detectados en *hob3D*²²⁸⁻²³⁰. Gef1 también se localiza en los polos y esta localización está regulada por la NDR quinasa Orb6 que restringe su localización impidiendo que se extienda a otras partes de la membrana plasmática²³¹.

La activación de Cdc42 en los polos de crecimiento se encuentra además regulada por el GAP Rga4, que se localiza en los lados de la célula y evita la activación de Cdc42 en las regiones no apicales. A su vez Pom1 fosforila a Rga4 y así la mantiene excluida de los polos de crecimiento^{48,232}.

La localización de Cdc42 activa en los polos de crecimiento orienta al citoesqueleto de actina y al tráfico de membranas lo que permite un crecimiento polarizado. Para ello, se necesita la interacción con múltiple efectores (Fig. 15). Cdc42 interacciona en su forma activa con las quinasas de la familia PAK, Shk1 y Shk2, que regulan procesos relacionados con el citoesqueleto de actina y la ruta de integridad celular respectivamente ^{201,224}. Adicionalmente, Cdc42 contribuye al crecimiento polarizado a través de dos módulos paralelos: la regulación del ensamblaje de cables de actina a través de la activación y localización de la formina For3 ^{38,213,233}, y la localización del complejo del exocisto ^{40,109}. En ambos procesos Cdc42 funciona a través de la proteína Pob1 ^{39,45,46,109}. Estudios recientes han revelado un papel esencial de Cdc42 relacionado con el tráfico de membranas y se ha descrito que una alteración de la actividad de Cdc42 induce un defecto en el transporte y la localización de las βGS Bgs1 y Bgs4 ⁴⁴.

6.1.4. Otras proteínas Rho

Rho3 regula la función del exocisto y la secreción polarizada de las enzimas hidrolíticas encargadas de digerir el septo primario durante la separación celular ¹⁰⁷. Durante la citocinesis Rho3 en su forma activa, interacciona físicamente con Gef3, un nuevo Rho GEF cuya localización en la zona media depende de las septinas y Mid2 ²³⁴. Rho3 se une también a la formina For3 ⁶³ aunque no se ha demostrado que participe en su activación. Estos datos sugieren que Rho3 en *S. pombe* funciona coordinando procesos necesarios para la secreción polarizada. Recientemente se ha descrito un nuevo papel de Rho3 en la regulación del tráfico del Golgi a endosomas, donde Rho3 coordinaría el tráfico de membranas interaccionando con la clatrina del complejo adaptador AP-1 ²³⁵.

Rho4 se localiza exclusivamente en la zona media durante la citocinesis, ejerciendo una regulación positiva sobre la secreción y localización de las glucanasas Agn1 y Eng1 necesarias para la degradación del septo ²³⁶. Además, se ha sugerido que Rho4 actúa sobre el citoesqueleto de actina y de MTs ^{213,237}.

rho5⁺ se expresa durante la fase estacionaria, en condiciones de falta de nutrientes y en los procesos de reproducción sexual. Rho5 comparte una identidad del 86% con Rho1 y su sobreproducción mantiene viables a células carentes de Rho1 ^{238,239}.

7. LA CITOCINESIS EN *S. pombe*

La citocinesis es la etapa final del ciclo celular donde se construyen las barreras físicas que dividen el citoplasma para dar lugar a dos células hermanas independientes. Para asegurar la correcta segregación cromosómica y el reparto equitativo del citoplasma entre las dos células hermanas la citocinesis debe producirse en la zona media de forma perpendicular al eje de segregación cromosómica. La citocinesis requiere, tanto en células animales como en hongos, la formación de un CAR, cuya contracción al final de la anafase B se cree que genera la fuerza necesaria para la división celular ^{240,241}. En hongos, la citocinesis requiere además la formación de un septo de división, constituido por material de pared, cuya síntesis debe estar coordinada con la contracción del CAR y con el resto de eventos que tienen lugar durante el proceso de división ²⁴².

En *S. pombe* el establecimiento del CAR tiene lugar durante las primeras etapas de la mitosis, seguido de un proceso de contracción desde la superficie celular hacia el centro de la célula ²⁴³. Se ha descrito que la contracción del CAR empieza al final de anafase B, después de la desintegración del huso mitótico, y ocurre de manera coordinada con la deposición del material de pared que dará lugar al septo. Una vez que el septo es completado se produce el proceso de la separación celular ^{102,244,245}.

7.1. Selección del sitio de división

La elección del sitio de división viene determinada por dos procesos: la posición del núcleo y la presencia de la proteína Mid1 en la zona de la membrana plasmática próxima al núcleo ²⁴⁶. La posición del núcleo en la zona media de la célula depende de las fuerzas que ejercen los MTs interfásicos unidos a la envuelta nuclear por un extremo, al contactar por el otro extremo con los polos de la célula ^{247,248} (ver apartado 2.2, Citoesqueleto de MTs).

Mid1 es esencial para el posicionamiento correcto del CAR y el septo de división ²⁴⁹. Durante la interfase se localiza tanto en el interior del núcleo como una banda difusa en la zona media del citoplasma cercano al núcleo ²⁵⁰⁻²⁵². En la transición de la fase G2 a mitosis, sale del núcleo y se concentra en la región cortical central cercana al núcleo uniéndose a otras proteínas para formar una banda ecuatorial que posteriormente se concentra dando lugar al CAR ^{249,251,253-255}.

7.2. Ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina (CAR)

Las principales proteínas del CAR aparecen inicialmente como nodos durante G2 y mitosis temprana. A medida que el huso mitótico se alarga y separa a los dos SPBs, los nodos de estas proteínas se fusionan de manera secuencial para dar lugar al CAR, que madura a lo largo de la anafase y, finalmente, comienza a contraerse después de la rotura del huso mitótico y la segregación completa del material genético ²⁴⁹ (**Fig. 16A**). Inicialmente, el ensamblaje del CAR requiere de la interacción de Mid1 con Myo2, lo que permite la acumulación de esta miosina en la zona media. Análisis cuantitativos de este proceso de ensamblaje, junto con estudios genéticos, han llevado a proponer dos modelos independientes, pero complementarios, para la formación del CAR (**Fig. 16B y C**) ^{256,257}.

Modelo de “nodos citocinéticos” o SCPR (de “Search, Capture, Pull and Release)

Este modelo se basa en que la polimerización del anillo de actina se produce por la formación inicial de una banda de múltiples “nodos citocinéticos” de proteínas cuya localización vendría determinada por Mid1. Estos nodos se ensamblan después para dar lugar al anillo que constituye el CAR (**Fig. 16A y B**). La forma Cdc12 es esencial en el ensamblaje del CAR siendo responsable de la nucleación de los filamentos de actina entre los distintos nodos de la zona de división. En la compactación de los nodos y filamentos de actina intervienen proteínas como la profilina Cdc3, la tropomiosina Cdc8 y la cofilina Cof1.

Modelo de “cable guía” (“leading cable model”)

Este modelo propone la acumulación de Cdc12 en uno o varios puntos de la región central de la célula, lo que permitiría el ensamblaje de una estructura en forma de asterisco, del que partiría un “cable guía” de filamentos de actina que rodearían gradualmente la región central de la célula donde

se encuentra Mid1, para dar lugar al anillo de actina, que permitiría la compactación de los nodos y originará el CAR (Fig. 16C).

Tras la condensación de los nodos para dar lugar al anillo de actomiosina, este mantiene un diámetro constante hasta el final de la anafase, donde sufre una etapa de maduración, que consiste en el aumento de la concentración de algunas de sus proteínas (Cdc15), o la incorporación de proteínas adicionales al anillo o a la membrana adyacente (Myp2, las Rho GTPasas y sus proteínas reguladoras, el complejo Arp2/3 y sus activadores, las septinas, etc.)²⁴¹. Durante esta maduración, la integridad del CAR está mediada al menos en parte a través del dominio SH3 de Cdc15. Éste interactúa con el dominio C2 de la proteína Fic1 y con la paxilina Pxl1, dos de las proteínas que aparecen en el sitio de división durante la maduración del CAR y que están implicadas en el mantenimiento de su integridad^{214,258,259}. La proteína F-BAR Imp2 y Cyk3 también cooperan con Cdc15 en este proceso^{259,260}.

También se ha descrito Chs2, que presenta similitud con las quitín sintasas Chs de *S. cerevisiae* y otros hongos²⁶¹ pero su secuencia no contiene los residuos conservados QRRRW, los cuales se consideran formar parte del centro catalítico de la actividad quitín sintasa²⁶². Chs2 se localiza en el CAR y su presencia es necesaria para la correcta localización de la miosina de tipo II Myp2/Myo3²⁶³. También se ha identificado Cfh3 que presenta una identidad significativa con la proteína reguladora Chs4 de la actividad quitín sintasa III de *S. cerevisiae* que regula la localización de Bgs1 en la zona media en condiciones de estrés²⁶⁴. Tanto Cfh3, como un septo primario intacto, podrían ser necesarios para asegurar la estabilidad del CAR en condiciones de estrés²⁶⁵.

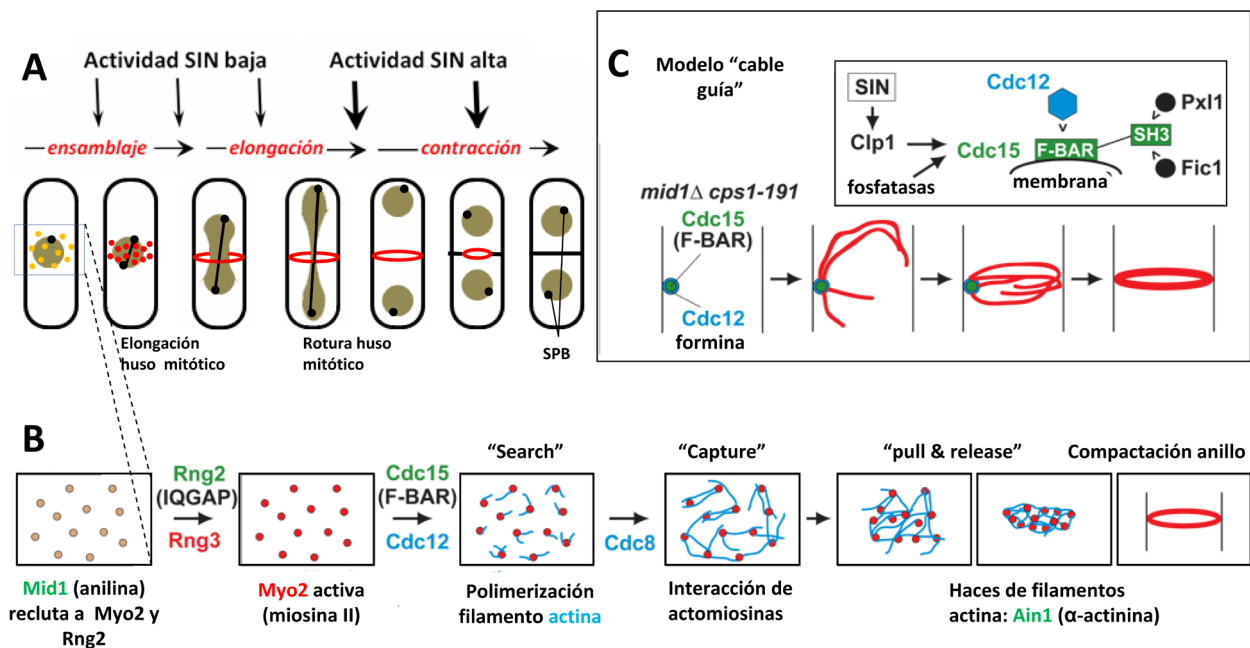
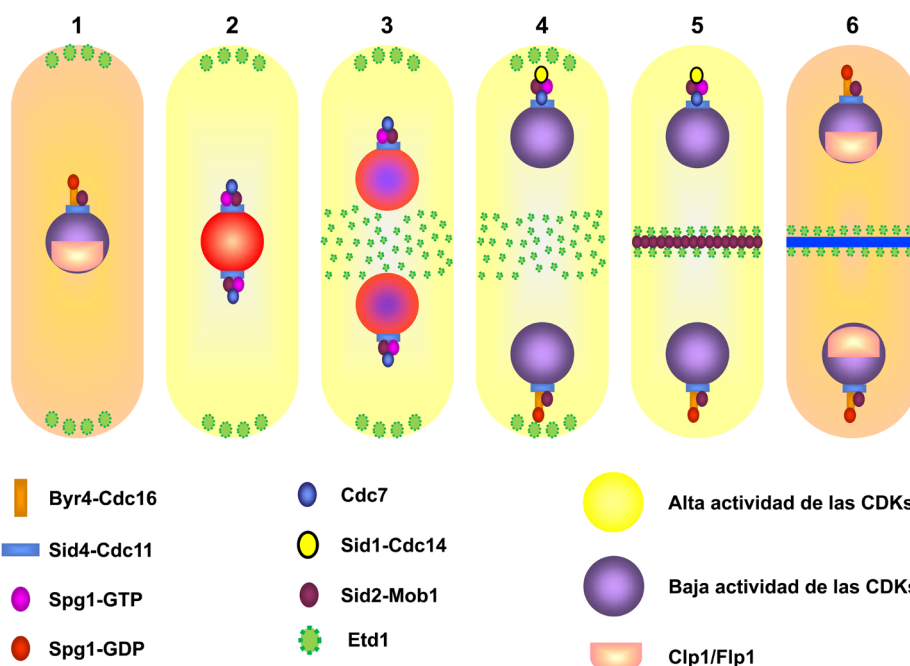


Figura 16. Mecanismos de ensamblaje del CAR. (A) Ilustración esquemática del ensamblaje, maduración y contracción del anillo contráctil (rojo) de una célula de *S. pombe*, en relación a la elongación del huso mitótico (negro) y a la actividad SIN durante la mitosis. (B) Adaptación del mecanismo de “nodos citocinéticos” o SCPR en el ensamblaje del CAR. Mid1 señala los sitios de reclutamiento de Rng2 y Myo2. Rng3 asegura la activación motora de Myo2. Cdc15 y Cdc12 aparecen para estimular el ensamblaje de la actina. Cdc8 se une a los filamentos de actina y promueve la elongación de los mismos mediada por Cdc12, limita el desensamblaje de los filamentos por parte de la cofilina Cof1, y especifica la actividad motora de Myo2 para la compactación del CAR. (C) Resumen esquemático del ensamblaje del anillo a partir de cables de actina (rojo) mediante el mecanismo de “cable guía” dependiente de la ruta SIN. La activación de la ruta SIN activa a su vez a la fosfatasa Clp1 en el citoplasma (junto a otras fosfatasa) defosforila a Cdc15 y esto a su vez produce el ensamblaje, la deformación de la membrana, el reclutamiento de la formina Cdc12, y las asociaciones con la paxilina Pxl1 y con el dominio C2 de la proteína Fic1 para estabilizar el anillo. Adaptado de²⁵⁶.

7.3. Contracción del CAR: La ruta SIN.

Al final de anafase B, una vez que el CAR ha madurado, comienza la contracción del mismo junto con la deposición simultánea de nuevo material de membrana y la síntesis del septo de división (Fig. 16A). El CAR es una estructura muy dinámica en la que se produce un continuo intercambio de sus componentes ²⁶⁶. La actividad de Myo2 es necesaria tanto para el ensamblaje como para la contracción del CAR ²⁶⁷. Es posible que la fuerza ejercida por la actividad de Myo2 a través de su desplazamiento sobre los cables de actina sea suficiente para deslizar los cables de actina a lo largo de la membrana plasmática durante el ensamblaje del anillo pero no para contrarrestar la presión de turgencia necesaria para iniciar la contracción del anillo y la membrana plasmática. Estudios recientes indican que en ausencia del anillo de F-actina, la síntesis del septo es suficiente para empujar la membrana y finalizar el proceso de septación ²⁶⁸.

El inicio de la contracción del CAR, y por tanto la incorporación de nuevo material de membrana y la síntesis del septo de división, debe estar regulada temporalmente para asegurar que la citocinesis no tenga lugar antes de que haya finalizado la segregación cromosómica. En *S. pombe* esta regulación la lleva a cabo una ruta de señalización denominada SIN (de "Septation Initiation Network") (Fig. 16A y 17), que es esencial para el mantenimiento del CAR. La mayoría de los componentes de la ruta SIN se localizan en el SPB. Las proteínas adaptadoras Cdc11 y Sid4 permiten el anclaje del resto de proteínas de la ruta al SPB. La señalización de la ruta progresa a través de la activación secuencial de la GTPasa Spg1 y sus efectores (Fig. 17). Spg1 se localiza en el SPB a lo largo de todo el ciclo celular. Durante la interfase Spg1 se mantiene inactiva por la presencia del complejo GAP Cdc16-Byr4, lo que impide que se active la cascada de quinasas formada por Cdc7, Sid1-Cdc14 y Sid2-Mob1. A lo largo de anafase el complejo GAP desaparece de uno de los dos SPBs, permitiendo la activación de Spg1 y el reclutamiento de la quinasa Cdc7 en este SPB. En ese momento el complejo Sid1-Cdc14 se localiza en el SPB que contiene a Spg1 activo, lo que se cree que provoca el movimiento del complejo Sid2-Mob1 del SPB a la zona media al final de anafase B ^{257,269}.



.....

Figura 17. Esquema de la localización de las proteínas de la ruta SIN durante la citocinesis en *S. pombe*. (1) En interfase, Sid4p-Cdc11p, Byr4p-Cdc16p y Spg1p-GDP se encuentran en el cuerpo polar del núcleo y Etd1 en los polos. La fosfatasa Clp1p se localiza en el nucleolo y la actividad de las ciclinas mitóticas CDKs es baja. (2) El complejo formado por el cuerpo polar y las proteínas asociadas se duplica. Antes de la entrada en la mitosis, Byr4p-Cdc16p abandonan ambos cuerpos polares y Spg1p pasa a una conformación activa unida a GTP, reclutando a Cdc7p en el cuerpo polar. La actividad de las CDKs aumenta y Clp1p abandona el nucleolo. (3) Antes de entrar en la anafase, la actividad de las CDKs comienza a disminuir. (4) Byr4p-Cdc16p vuelven a uno de los cuerpos polares y es inactiva a Spg1p, lo que induce que Cdc7p abandone el cuerpo polar. Durante la anafase Sid1p-Cdc14p aparecen en el cuerpo polar que mantiene a Cdc7p. (5) Justo antes de la activación de la citocinesis Sid2p-Mob1p pasan a la zona media, probablemente para activar la contracción del anillo medio y la síntesis del septo. (6) Una vez finalizada la síntesis del septo, la célula vuelve al mismo estado interfásico inicial. Adaptado de ²⁸⁵.

Además de ser esencial para el mantenimiento del CAR, la ruta SIN también es importante para la formación del anillo durante los estadios tempranos de la mitosis. Una reducción de la actividad de la ruta SIN produce una disminución en el reclutamiento de Cdc15, lo que origina fallos en el mantenimiento de la integridad del CAR. Además, se ha descrito que la fosforilación de Cdc12 por Sid2 controla su oligomerización y activa la formación del CAR ^{270,271}.

La activación de la ruta SIN requiere el descenso de actividad Cdk1 lo que permite la localización de Sid1-Cdc14 en el SPB ²⁷². Recientemente se ha descrito que la actividad Cdk1 regula también la localización de Byr4 en el SPB mediante fosforilación ²⁷³. Además, se ha descrito que Etd1 regula la actividad de la GTPasa Spg1. Etd1 se localiza en la corteza celular y en el medio de la célula durante la citocinesis, y podría regular el inicio de la contracción del CAR mediante su acción sobre Spg1. Así, la activación máxima de Spg1 tiene lugar al final de anafase, coincidiendo con la extensión máxima del huso mitótico y la llegada del SPB a los polos de la célula, donde se encuentra Etd1, esto aseguraría que la ruta SIN sólo se activase una vez que ha tenido lugar la segregación cromosómica ^{274,275}.

Además del mantenimiento del CAR, se ha propuesto que la ruta SIN podría controlar la formación del septo de división mediante la regulación de la localización de Bgs1 en la zona media ^{158,174}. En contraste, el desplazamiento de Ags1 desde los polos hacia la zona media de la célula no depende de la actividad SIN ⁸⁵.

7.4. Formación del septo de división

En hongos, una vez que se activa la contracción del CAR al final de anafase B, para que el proceso de citocinesis se complete correctamente es necesaria una coordinación entre la contracción del CAR y la síntesis de membrana y del septo. El septo constituye la barrera física necesaria para la separación adecuada de las dos células hermanas durante la división celular y su correcta formación es crítica para la integridad y la supervivencia de la célula ¹²¹. La formación del septo comienza con la aparición en la zona media de la célula de un material poco denso a los electrones denominado rudimento anular, que es el inicio del septo primario, íntimamente ligado a la superficie interna de la pared celular. Según progresa la síntesis centrípeta del septo primario se va depositando a ambos lados del mismo el denominado septo secundario. Al mismo tiempo, aparece un material más denso a los electrones en la base del septo secundario, dando lugar a una estructura denominada material denso triangular, que recorre la base del septo secundario desde la membrana plasmática hasta el extremo de anclaje del septo primario. Tanto la función, como la composición, del material triangular denso son aún desconocidas. Una vez que el septo se cierra por completo, el septo secundario sufre un proceso de maduración hasta que adquiere un grosor similar al de la pared celular ¹⁷⁵ (Fig. 18A).

7.5. Separación celular

El estadio final de la citocinesis, una vez completado el septo de división, es la separación celular que conduce a la liberación de las dos células hermanas. Este proceso es crítico para la integridad y viabilidad de la célula. Se inicia con la degradación de la pared celular adyacente al septo de división, lo que originará la cicatriz de fisión en la célula nueva, seguido de la degradación específica del septo primario. Al mismo tiempo, el material triangular denso da lugar a una estructura residual denominada fuscánel, localizada junto a la cicatriz de fisión ^{102,276} (Fig. 18B).

Se han descrito una serie de enzimas hidrolíticas implicadas en el proceso de separación celular: la $\alpha(1,3)$ endoglucanasa Agn1p ^{277,278}, la $\beta(1,3)$ endoglucanasa Eng1 ²⁷⁹ y la $\beta(1,6)$ endoglucanasa Exg1 ²⁸⁰. Agn1 es necesaria para degradar el $\alpha(1,3)$ glucano de la pared adyacente al septo, lo que permite que Eng1 degrade el L β G del septo primario. Tanto Agn1 como Eng1 se localizan en la región del septo de división, y su ausencia produce un fenotipo de células encadenadas que con el tiempo consiguen separarse. Tanto *agn1*⁺ como *eng1*⁺ presentan una expresión cíclica regulada por el factor de transcripción Ace2. Este factor de transcripción regula además la expresión de otros genes relacionados con la división celular ¹⁰². Las septinas y Mid2 también desempeñan una función importante durante la separación celular, actuando como una guía para el exocisto, el cual es necesario para que Eng1 y Agn1 se localicen correctamente en la base del septo de división ^{245,281,282}.

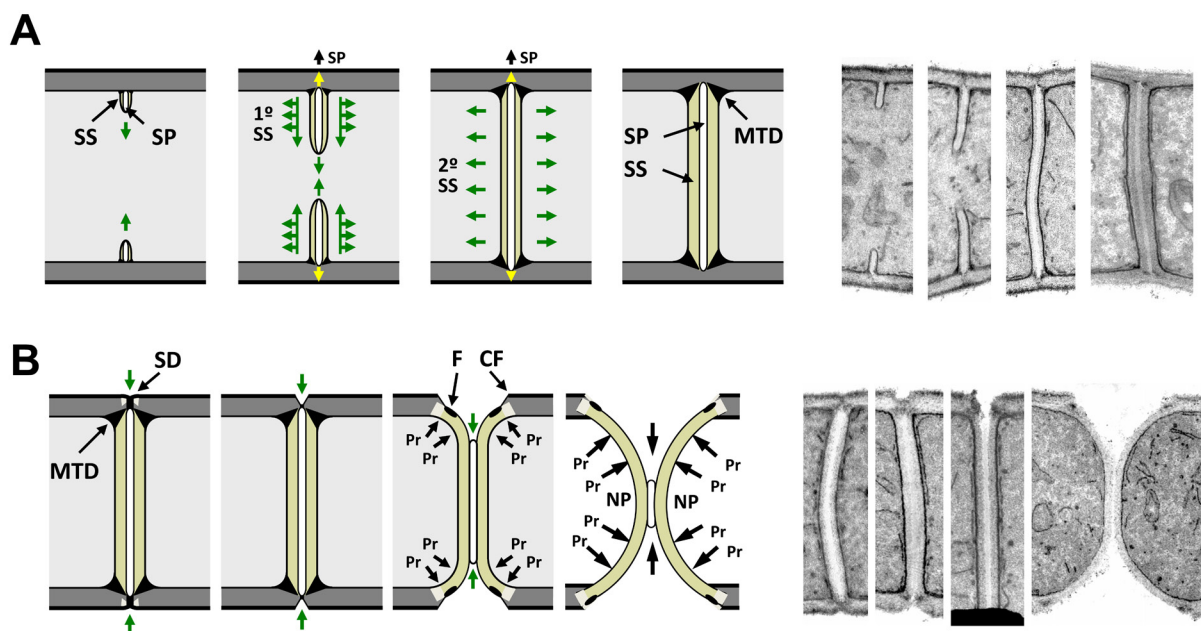


Figura 18. Esquema de la síntesis y degradación del septo de división. (A) Ilustración esquemática de la formación del septo (izquierda). La síntesis coordinada y simultánea (flecha) del septo primario (perpendicular a la pared celular) y del septo secundario (paralelo al septo primario) forman una estructura de septo trilaminar. La maduración del septo tiene lugar mediante el anclaje del septo primario a la pared celular (flecha amarilla) y por una segunda ronda de síntesis de septo secundario. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) de la progresión de la síntesis un septo de una célula silvestre (derecha). (B) Degradación del septo y separación celular (izquierda). Primero se produce la degradación de la pared lateral adyacente al septo originando la cicatriz de fisión, seguido de la degradación específica del septo primario. Durante este proceso, el material triangular denso da lugar a una estructura residual denominada fuscánel. Debido a la presión interna de la célula, el septo secundario se curva hasta una conformación estable asegurando la integridad de la separación celular. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) de la progresión de degradación de un septo (derecha). CF, cicatriz de fisión; F, fuscánel; MTD, material triangular denso; NE, nuevo polo; Pr, presión interna; Sp: septo primario; Ss: septo secundario; SD, surco de degradación. Barra, 1 μ m. Adaptado de ²⁸⁶.

Objetivos



El objetivo general de este trabajo es el estudio del papel de Bgs1 en el control de la polaridad celular y la citocinesis. Para llevar a cabo este objetivo nos planteamos:

1. El estudio de la represión de *bgs1*⁺ durante el crecimiento polarizado.
2. El estudio de la relación del citoesqueleto de actina y los “lipid rafts” en los procesos de transporte exocitosis y endocitosis de las GS.
3. El estudio de la citocinesis y el papel de Bgs1 en ausencia del anillo contráctil de actomiosina (CAR).

Además, nos propusimos realizar un análisis temporal de la aparición de Bgs1 en la zona de división respecto a las proteínas del CAR y al resto de GS durante la citocinesis.

Bibliografía



1. **Lesage, G. & Bussey, H.** Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 317-343 (2006).
2. **Leupold, U.** Die Verebung von homothalie und heterothalie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg* **24**, 359-364 (1950).
3. **Egel, R., Willer, M., Kjaerulff, S., Davey, J. & Nielsen, O.** Assessment of pheromone production and response in fission yeast by a halo test of induced sporulation. *Yeast* **10**, 1347-54 (1994).
4. **Yanagida, M.** The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* **3**, 1-4 (2002).
5. **Brunner, D. & Nurse, P.** New concepts in fission yeast morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**, 873-877. (2000).
6. **Hayles, J. & Nurse, P.** A journey into space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 647-656 (2001).
7. **Martin, S. G. & Berthelot-Grosjean, M.** Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* **459**, 852-6 (2009).
8. **Moseley, J. B. & Nurse, P.** Cdk1 and cell morphology: connections and directions. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 82-8 (2009).
9. **Mitchison, J. M. & Nurse, P.** Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **75**, 357-376 (1985).
10. **Martin, S. G. & Chang, F.** New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle* **4**, 1046-1049 (2005).
11. **La Carbona, S., Le Goff, C. & Le Goff, X.** Fission yeast cytoskeletons and cell polarity factors: connecting at the cortex. *Biol. Cell* **98**, 619-631 (2006).
12. **Castagnetti, S., Novak, B. & Nurse, P.** Microtubules offset growth site from the cell centre in fission yeast. *J. Cell Sci.* **120**, 2205-2213 (2007).
13. **Martin, S. G.** Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends Cell. Biol.* **19**, 447-454 (2009).
14. **Hagan, I. M.** The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 12)**, 1603-1612 (1998).
15. **Sawin, K. E. & Tran, P. T.** Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast* **23**, 1001-1014 (2006).
16. **Piel, M. & Tran, P. T.** Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr. Biol.* **19**, R823-827 (2009).
17. **Samejima, I., Miller, V. J., Rincon, S. A. & Sawin, K. E.** Fission yeast Mto1 regulates diversity of cytoplasmic microtubule organizing centers. *Curr Biol* **20**, 1959-65 (2010).

-
18. **Thadani, R., Huang, D. & Oliferenko, S.** Robust polarity specification operates above a threshold of microtubule dynamicity. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 290-9 (2011).
 19. **Hoog, J. L. et al.** Organization of interphase microtubules in fission yeast analyzed by electron tomography. *Dev Cell* **12**, 349-61 (2007).
 20. **Janson, M. E. et al.** Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell* **128**, 357-68 (2007).
 21. **Sawin, K. E.** Microtubule dynamics: faint speckle, hidden dragon. *Curr. Biol.* **14**, R702-704 (2004).
 22. **Tolic-Norrelykke, I. M., Sacconi, L., Thon, G. & Pavone, F. S.** Positioning and elongation of the fission yeast spindle by microtubule-based pushing. *Curr Biol* **14**, 1181-6 (2004).
 23. **Venkatram, S. et al.** Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast gamma-tubulin complex function. *Mol Biol Cell* **15**, 2287-301 (2004).
 24. **Hagan, I. M. & Hyams, J. S.** The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **89**, 343-357 (1988).
 25. **Pardo, M. & Nurse, P.** Equatorial retention of the contractile actin ring by microtubules during cytokinesis. *Science* **300**, 1569-1574 (2003).
 26. **Mata, J. & Nurse, P.** Tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**, 939-949 (1997).
 27. **Martin, S. G., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd & Chang, F.** Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev. Cell* **8**, 479-491 (2005).
 28. **Tatebe, H., Shimada, K., Uzawa, S., Morigasaki, S. & Shiozaki, K.** Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr. Biol.* **15**, 1006-1015 (2005).
 29. **Snaith, H. A. & Sawin, K. E.** Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**, 647-651 (2003).
 30. **Snaith, H. A., Samejima, I. & Sawin, K. E.** Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J.* **24**, 3690-3699 (2005).
 31. **Arellano, M., Niccoli, T. & Nurse, P.** Tea3p is a cell end marker activating polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Biol.* **12**, 751-756 (2002).
 32. **Browning, H. et al.** Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *J. Cell Biol.* **151**, 15-28. (2000).
 33. **Busch, K. E., Hayles, J., Nurse, P. & Brunner, D.** Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev. Cell* **6**, 831-843 (2004).

34. **Brunner, D. & Nurse, P.** CLIP170-like Tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**, 695-704 (2000).
35. **Busch, K. E. & Brunner, D.** The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol* **14**, 548-59 (2004).
36. **Sandblad, L. et al.** The *Schizosaccharomyces pombe* EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell* **127**, 1415-24 (2006).
37. **Feierbach, B., Verde, F. & Chang, F.** Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J. Cell Biol.* **165**, 697-707 (2004).
38. **Feierbach, B. & Chang, F.** Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr. Biol.* **11**, 1656-1665 (2001).
39. **Martin, S. G., Rincon, S. A., Basu, R., Perez, P. & Chang, F.** Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4155-4167 (2007).
40. **Bendezu, F. O. & Martin, S. G.** Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 44-53 (2011).
41. **Glynn, J. M., Lustig, R. J., Berlin, A. & Chang, F.** Role of bud6p and tea1p in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast. *Curr. Biol.* **11**, 836-845 (2001).
42. **Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F. & Pringle, J. R.** CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **111**, 131-42 (1990).
43. **Johnson, D. I. & Pringle, J. R.** Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* **111**, 143-52 (1990).
44. **Estravis, M., Rincon, S. & Perez, P.** Cdc42 regulation of polarized traffic in fission yeast. *Commun Integr Biol* **5**, 370-3 (2012).
45. **Rincon, S. A. et al.** Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **20**, 4390-9 (2009).
46. **Nakano, K. et al.** Pob1 ensures cylindrical cell shape by coupling two distinct rho signaling events during secretory vesicle targeting. *Traffic* **12**, 726-739 (2011).
47. **Bahler, J. & Pringle, J. R.** Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* **12**, 1356-1370 (1998).
48. **Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R. & Shiozaki, K.** Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr. Biol.* **18**, 322-330 (2008).

-
49. **Kobori, H., Yamada, N., Taki, A. & Osumi, M.** Actin is associated with the formation of the cell wall in reverting protoplasts of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **94**, 635-646 (1989).
 50. **Marks, J. & Hyams, J. S.** Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.* **39**, 27-32 (1985).
 51. **Arellano, M., Durán, A. & Pérez, P.** Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **110**, 2547-2555 (1997).
 52. **Balasubramanian, M. K. et al.** Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* **149**, 1265-1275. (1998).
 53. **Gachet, Y. & Hyams, J. S.** Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J. Cell Sci.* **118**, 4231-4242 (2005).
 54. **Minc, N., Boudaoud, A. & Chang, F.** Mechanical forces of fission yeast growth. *Curr Biol* **19**, 1096-101 (2009).
 55. **Lee, W. L., Bezanilla, M. & Pollard, T. D.** Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *J. Cell Biol.* **151**, 789-800 (2000).
 56. **Sirotkin, V., Beltzner, C. C., Marchand, J. B. & Pollard, T. D.** Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J. Cell Biol.* **170**, 637-648 (2005).
 57. **Motegi, F., Arai, R. & Mabuchi, I.** Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1367-1380 (2001).
 58. **Pelham, R. J., Jr. & Chang, F.** Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Cell Biol.* **3**, 235-244 (2001).
 59. **Martin, S. G. & Chang, F.** Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr. Biol.* **16**, 1161-1170 (2006).
 60. **Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. & Mabuchi, I.** Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat. Cell Biol.* **7**, 916-917 (2005).
 61. **Chang, F., Drubin, D. & Nurse, P.** cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J. Cell Biol.* **137**, 169-182 (1997).
 62. **Coffman, V. C., Sees, J. A., Kovar, D. R. & Wu, J. Q.** The formins Cdc12 and For3 cooperate during contractile ring assembly in cytokinesis. *J Cell Biol* **203**, 101-14 (2013).
 63. **Nakano, K. et al.** The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J. Cell Sci.* **115**, 4629-4639 (2002).
 64. **Berg, J. S., Powell, B. C. & Cheney, R. E.** A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* **12**, 780-794 (2001).

65. **Balasubramanian, M. K., Helfman, D. M. & Hemmingsen, S. M.** A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast *S. pombe*. *Nature* **360**, 84-87 (1992).
66. **Skoumpla, K., Coulton, A. T., Lehman, W., Geeves, M. A. & Mulvihill, D. P.** Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **120**, 1635-45 (2007).
67. **East, D. A. et al.** Altering the stability of the Cdc8 overlap region modulates the ability of this tropomyosin to bind co-operatively to actin and regulate myosin. *Biochem J* **438**, 265-73 (2011).
68. **Johnson, M., East, D. A. & Mulvihill, D. P.** Formins Determine the Functional Properties of Actin Filaments in Yeast. *Curr Biol* (2014).
69. **East, D. A. & Mulvihill, D. P.** Regulation and function of the fission yeast myosins. *J Cell Sci* **124**, 1383-90 (2011).
70. **Codlin, S., Haines, R. L., Burden, J. J. & Mole, S. E.** Btn1 affects cytokinesis and cell-wall deposition by independent mechanisms, one of which is linked to dysregulation of vacuole pH. *J. Cell Sci.* **121**, 2860-2870 (2008).
71. **Attanapola, S. L., Alexander, C. J. & Mulvihill, D. P.** Ste20-kinase-dependent TEDS-site phosphorylation modulates the dynamic localisation and endocytic function of the fission yeast class I myosin, Myo1. *J Cell Sci* **122**, 3856-61 (2009).
72. **Clayton, J. E., Sammons, M. R., Stark, B. C., Hodges, A. R. & Lord, M.** Differential regulation of unconventional fission yeast myosins via the actin track. *Curr Biol* **20**, 1423-31 (2010).
73. **Kitayama, C., Sugimoto, A. & Yamamoto, M.** Type II myosin heavy chain encoded by the *myo2* gene composes the contractile ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* **137**, 1309-1319 (1997).
74. **May, K. M., Watts, F. Z., Jones, N. & Hyams, J. S.** Type II myosin involved in cytokinesis in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **38**, 385-396 (1997).
75. **Bezanilla, M. & Pollard, T. D.** Myosin-II tails confer unique functions in *Schizosaccharomyces pombe*: characterization of a novel myosin-II tail. *Mol. Biol. Cell* **11**, 79-91 (2000).
76. **Motegi, F., Nakano, K. & Mabuchi, I.** Molecular mechanism of myosin-II assembly at the division site in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **113**, 1813-1825 (2000).
77. **Lord, M., Laves, E. & Pollard, T. D.** Cytokinesis depends on the motor domains of myosin-II in fission yeast but not in budding yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 5346-55 (2005).
78. **Motegi, F., Mishra, M., Balasubramanian, M. K. & Mabuchi, I.** Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by Mid1 in fission yeast. *J. Cell Biol.* **165**, 685-695 (2004).

79. **Sladewski, T. E., Previs, M. J. & Lord, M.** Regulation of fission yeast myosin-II function and contractile ring dynamics by regulatory light-chain and heavy-chain phosphorylation. *Mol Biol Cell* **20**, 3941-52 (2009).
80. **Win, T. Z., Gachet, Y., Mulvihill, D. P., May, K. M. & Hyams, J. S.** Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring. *J. Cell Sci.* **114**, 69-79 (2001).
81. **Mulvihill, D. P., Barretto, C. & Hyams, J. S.** Localization of fission yeast type II myosin, Myo2, to the cytokinetic actin ring is regulated by phosphorylation of a C-terminal coiled-coil domain and requires a functional septation initiation network. *Mol. Biol. Cell* **12**, 4044-4053 (2001).
82. **Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y.** Fission yeast synaptobrevin is involved in cytokinesis and cell elongation. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 641-5 (2003).
83. **Martin-Garcia, R. & Mulvihill, D. P.** Myosin V spatially regulates microtubule dynamics and promotes the ubiquitin-dependent degradation of the fission yeast CLIP-170 homologue, Tip1. *J Cell Sci* **122**, 3862-72 (2009).
84. **Mulvihill, D. P., Edwards, S. R. & Hyams, J. S.** A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 149-161 (2006).
85. **Cortés, J. C. G. et al.** Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J. Cell Biol.* **198**, 637-656 (2012).
86. **Doyle, A., Martin-Garcia, R., Coulton, A. T., Bagley, S. & Mulvihill, D. P.** Fission yeast Myo51 is a meiotic spindle pole body component with discrete roles during cell fusion and spore formation. *J Cell Sci* **122**, 4330-40 (2009).
87. **Lo Presti, L., Chang, F. & Martin, S. G.** Myosin Vs organize actin cables in fission yeast. *Mol Biol Cell* **23**, 4579-91 (2012).
88. **Wang, N. et al.** The novel proteins Rng8 and Rng9 regulate the myosin-V Myo51 during fission yeast cytokinesis. *J Cell Biol* **205**, 357-75 (2014).
89. **Simons, K. & Ikonen, E.** Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72 (1997).
90. **Brown, D. A. & London, E.** Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111-36 (1998).
91. **Oliferenko, S. et al.** Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **146**, 843-54 (1999).
92. **Caroni, P.** New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J* **20**, 4332-6 (2001).

93. **Ikonen, E.** Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 470-7 (2001).
94. **Wachtler, V., Rajagopalan, S. & Balasubramanian, M. K.** Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **116**, 867-874 (2003).
95. **Wachtler, V. & Balasubramanian, M. K.** Yeast lipid rafts?--an emerging view. *Trends Cell Biol.* **16**, 1-4 (2006).
96. **Carnahan, R. H. & Gould, K. L.** The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* **162**, 851-862 (2003).
97. **Jonsdottir, G. A. & Li, R.** Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Curr Biol* **14**, 1604-9 (2004).
98. **Takeda, T., Kawate, T. & Chang, F.** Organization of a sterol-rich membrane domain by cdc15p during cytokinesis in fission yeast. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1142-1144 (2004).
99. **Takeda, T. & Chang, F.** Role of fission yeast Myosin I in organization of sterol-rich membrane domains. *Curr. Biol.* **15**, 1331-1336 (2005).
100. **Cadou, A. et al.** Kin1 is a plasma membrane-associated kinase that regulates the cell surface in fission yeast. *Mol Microbiol* **77**, 1186-202 (2010).
101. **Hsu, S. C., TerBush, D., Abraham, M. & Guo, W.** The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol* **233**, 243-65 (2004).
102. **Sipiczki, M.** Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Res.* **7**, 761-770 (2007).
103. **Wang, H. et al.** The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 515-529 (2002).
104. **Bendezu, F. O., Vincenzetti, V. & Martin, S. G.** Fission yeast Sec3 and Exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell poles. *PLoS One* **7**, e40248 (2012).
105. **Jourdain, I., Dooley, H. C. & Toda, T.** Fission yeast Sec3 bridges the exocyst complex to the actin cytoskeleton. *Traffic* **13**, 1481-1495 (2012).
106. **Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Foletti, D. L. & Scheller, R. H.** Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol* **9**, 150-3 (1999).
107. **Wang, H., Tang, X. & Balasubramanian, M. K.** Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **164**, 1323-1331 (2003).
108. **Jourdain, I., Brzezinska, E. A. & Toda, T.** Fission yeast Nod1 is a component of cortical nodes involved in cell size control and division site placement. *PLoS One* **8**, e54142 (2013).
109. **Estravis, M., Rincon, S. A., Santos, B. & Perez, P.** Cdc42 regulates multiple membrane traffic events in fission yeast. *Traffic* **12**, 1744-1758 (2011).

-
110. **Latge, J. P.** The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**, 279-290 (2007).
 111. **Ribas, J. C., Durán, A. & Cortés, J. C. G.** in *Antimicrobial Compounds* (eds. Villa, T. G. & P., V.-C.) 237-268 (Springer Verlag, Berlin, 2014).
 112. **Manners, D. J. & Meyer, M. T.** The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydr. Res.* **57**, 189-203 (1977).
 113. **Humbel, B. M. et al.** In situ localization of β -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**, 433-444 (2001).
 114. **Sugawara, T. et al.** In situ localization of cell wall α -1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* **52**, 237-242 (2003).
 115. **Magnelli, P. E., Cipollo, J. F. & Robbins, P. W.** A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Anal. Biochem.* **336**, 202-212 (2005).
 116. **Cabib, E. & Arroyo, J.** How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 648-655 (2013).
 117. **Ishiguro, J.** Genetic control of fission yeast cell wall synthesis: the genes involved in wall biogenesis and their interactions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Genet. Syst.* **73**, 181-191 (1998).
 118. **Bush, D. A., Horisberger, M., Horman, I. & Wursch, P.** The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* **81**, 199-206 (1974).
 119. **Kopecka, M. & Kreger, D. R.** Assembly of microfibrils *in vivo* and *in vitro* from (1-3)- β -D-glucan synthesized by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **143**, 387-395 (1986).
 120. **Gawronski, M., Park, J. T., Magee, A. S. & Conrad, H.** Microfibrillar structure of PGG-glucan in aqueous solution as triple-helix aggregates by small angle x-ray scattering. *Biopolymers* **50**, 569-578 (1999).
 121. **Cortés, J. C. G. et al.** The (1,3) β -D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol. Microbiol.* **65**, 201-217 (2007).
 122. **Osumi, M. et al.** Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet. Biol.* **24**, 178-206 (1998).
 123. **Muñoz, J. et al.** Extracellular cell wall β (1,3)glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J. Cell Biol.* **203**, 265-282 (2013).
 124. **Sugawara, T., Takahashi, S., Osumi, M. & Ohno, N.** Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **339**, 2255-2265 (2004).

125. **Free, S. J.** Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* **81**, 33-82 (2013).
126. **Grun, C. H. et al.** The structure of cell wall α -glucan from fission yeast. *Glycobiology* **15**, 245-257 (2005).
127. **Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. & Warbrick, E. (eds.)** *Experiments with fission yeast: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1993).
128. **Horisberger, M. & Rouvet-Vauthey, M.** Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* **41**, 748-750 (1985).
129. **Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T. & Osumi, M.** Characterization and behaviour of α -glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast* **20**, 427-438 (2003).
130. **Horisberger, M., Vonlanthen, M. & Rosset, J.** Localization of α -galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Microbiol.* **119**, 107-111 (1978).
131. **Gemmill, T. R. & Trimble, R. B.** Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 227-37 (1999).
132. **Ruiz-Herrera, J. & Ortiz-Castellanos, L.** Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* **10**, 225-43 (2010).
133. **Pittet, M. & Conzelmann, A.** Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 405-20 (2007).
134. **Toh-e, A. et al.** Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**, 481-94 (1993).
135. **Hayes, C. E. & Goldstein, I. J.** An α -D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J. Biol. Chem.* **249**, 1904-1914 (1974).
136. **Nicolson, G. L., Blaustein, J. & Etzler, M. E.** Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry* **13**, 196-204 (1974).
137. **Osumi, M.** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**, 207-233 (1998).
138. **Shematek, E. M., Braatz, J. A. & Cabib, E.** Biosynthesis of yeast cell wall. I. Preparation and properties of $\beta(1-3)$ glucan synthetase. *J. Biol. Chem.* **255**, 888-894 (1980).
139. **Shematek, E. M. & Cabib, E.** Biosynthesis of yeast cell wall. II. Regulation of $\beta(1-3)$ glucan synthetase by ATP and GTP. *J. Biol. Chem.* **255**, 895-902 (1980).
140. **Kang, M. S. & Cabib, E.** Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding proteinaceous component required for activity of (1,3)- β -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 5808-5812 (1986).

-
141. **Ribas, J. C., Díaz, M., Durán, A. & Pérez, P.** Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3) β -D-glucan. *J. Bacteriol.* **173**, 3456-3462 (1991).
 142. **Cabib, E., Drgonova, J. & Drgon, T.** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 307-333 (1998).
 143. **Douglas, C. M.** Fungal β (1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **39** 55-66 (2001).
 144. **Douglas, C. M., Marrinan, J. A., Li, W. & Kurtz, M. B.** A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3- β -D-glucan synthase. *J. Bacteriol.* **176**, 5686-5696 (1994).
 145. **Mazur, P. et al.** Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- β -D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5671-5681 (1995).
 146. **Douglas, C. M. et al.** The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- β -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12907-12911 (1994).
 147. **Eng, W. K. et al.** The yeast *FKS1* gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Gene* **151**, 61-71 (1994).
 148. **Castro, C. et al.** Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3) β -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**, 5732-5739 (1995).
 149. **El-Sherbeini, M. & Clemas, J. A.** Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 200-207 (1995).
 150. **Garrett-Engle, P., Moilanen, B. & Cyert, M. S.** Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H⁺-ATPase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4103-4114 (1995).
 151. **Ram, A. F., Brekelmans, S. S., Oehlen, L. J. & Klis, F. M.** Identification of two cell cycle regulated genes affecting the b1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**, 165-170 (1995).
 152. **Inoue, S. B. et al.** Characterization and gene cloning of 1,3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **231**, 845-854 (1995).
 153. **Kurtz, M. B. & Rex, J. H.** Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. *Adv. Protein Chem.* **56**, 423-475 (2001).
 154. **Chervitz, S. A. et al.** Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. *Science* **282**, 2022-2028 (1998).

155. **Deutschbauer, A. M., Williams, R. M., Chu, A. M. & Davis, R. W.** Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15530-5 (2002).
156. **Ishihara, S. et al.** Homologous subunits of 1,3- β -glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **6**, 143-156 (2007).
157. **Johnson, M. E. & Edlind, T. D.** Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryot Cell* **11**, 952-60 (2012).
158. **Cortés, J. C. G., Ishiguro, J., Durán, A. & Ribas, J. C.** Localization of the (1,3) β -D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J. Cell Sci.* **115**, 4081-4096 (2002).
159. **Pérez, P. & Ribas, J. C.** Cell wall analysis. *Methods* **33**, 245-251 (2004).
160. **Cui, X. et al.** A putative plant homolog of the yeast β -1,3-glucan synthase subunit *FKS1* from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers. *Planta* **213**, 223-230 (2001).
161. **Hong, Z., Delauney, A. J. & Verma, D. P.** A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* **13**, 755-768 (2001).
162. **Li, J. et al.** Biochemical evidence linking a putative callose synthase gene with (1-3)- β -D-glucan biosynthesis in barley. *Plant Mol. Biol.* **53**, 213-225 (2003).
163. **Cortés, J. C. G. et al.** The novel fission yeast (1,3) β -D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J. Cell Sci.* **118**, 157-174 (2005).
164. **Liu, J., Tang, X., Wang, H. & Balasubramanian, M.** Bgs2p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **478**, 105-108 (2000).
165. **Liu, J., Wang, H., McCollum, D. & Balasubramanian, M. K.** Drc1p/Cps1p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **153**, 1193-1203 (1999).
166. **Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A. & Sánchez, Y.** Bgs3p, a putative 1,3- β -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **2**, 159-169 (2003).
167. **Martín, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Durán, A. & Sánchez, Y.** *bgs2⁺*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol. Microbiol.* **38**, 308-321 (2000).
168. **Brown, R. M., Jr. & Saxena, I. M.** Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 57-67 (2000).

-
169. **Inoue, S. B. et al.** Signaling toward yeast 1,3- β -glucan synthesis. *Cell Struct. Funct.* **21**, 395-402 (1996).
 170. **Ishiguro, J., Saitou, A., Durán, A. & Ribas, J. C.** *cps1⁺*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J. Bacteriol.* **179**, 7653-7662 (1997).
 171. **Schimoler-O'Rourke, R., Renault, S., Mo, W. & Selitrennikoff, C. P.** *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3) β -glucan synthase substrate, UDP-glucose. *Curr. Microbiol.* **46**, 408-412 (2003).
 172. **Le Goff, X., Woollard, A. & Simanis, V.** Analysis of the *cps1* gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 163-172 (1999).
 173. **Liu, J., Wang, H. & Balasubramanian, M. K.** A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **113**, 1223-1230 (2000).
 174. **Liu, J., Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S. & Balasubramanian, M. K.** The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 989-1000 (2002).
 175. **Muñoz, J.** Funciones esenciales de la β -glucán sintasa Bgs4p en la integridad celular y la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis doctoral. (2012).
 176. **Yu, Y. et al.** Sip1, a conserved AP-1 accessory protein, is important for Golgi/endosome trafficking in fission yeast. *PLoS One* **7**, e45324 (2012).
 177. **Carnero, E., Ribas, J. C., García, B., Durán, A. & Sánchez, Y.** *Schizosaccharomyces pombe* Ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 173-183 (2000).
 178. **Verde, F., Mata, J. & Nurse, P.** Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *J. Cell Biol.* **131**, 1529-1538 (1995).
 179. **Martins, I. M. et al.** Differential activities of three families of specific $\beta(1,3)$ glucan synthase inhibitors in wild-type and resistant strains of fission yeast. *J. Biol. Chem.* **286**, 3484-3496 (2011).
 180. **Arellano, M., Duran, A. & Perez, P.** Rho1 GTPase activates the (1-3) β -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J.* **15**, 4584-4591 (1996).
 181. **Drgonova, J. et al.** Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* **272**, 277-279 (1996).
 182. **Mazur, P. & Baginsky, W.** *In vitro* activity of 1,3- β -D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* **271**, 14604-14609 (1996).
 183. **Qadota, H. et al.** Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -glucan synthase. *Science* **272**, 279-281 (1996).

184. **Díaz, M. et al.** The *Schizosaccharomyces pombe* *cwg2⁺* gene codes for the β subunit of a geranylgeranyltransferase type I required for β -glucan synthesis. *EMBO J.* **12**, 5245-5254 (1993).
185. **Arellano, M. et al.** Characterization of the geranylgeranyl transferase type I from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **29**, 1357-1367 (1998).
186. **Inoue, S. B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T. & Ohya, Y.** Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1, 3- β -glucan synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 38119-38124 (1999).
187. **Page, N. et al.** A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* **163**, 875-94 (2003).
188. **Ram, A. F. J., Wolters, A., ten Hoopen, R. & Klis, F. M.** A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**, 1019-1030 (1994).
189. **Shahinian, S. & Bussey, H.** β -1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **35**, 477-489 (2000).
190. **Montijn, R. C. et al.** Localization of synthesis of β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**, 7414-20 (1999).
191. **Vink, E. et al.** An *in vitro* assay for (1-6)- β -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**, 1121-1131 (2004).
192. **Aimanianda, V. et al.** Cell wall β -(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and *in situ* synthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 13401-13412 (2009).
193. **Hochstenbach, F. et al.** Identification of a putative α -glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9161-9166 (1998).
194. **Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P. & Toda, T.** Fission yeast α -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J. Cell Biol.* **144**, 1173-1186 (1999).
195. **Vos, A., Dekker, N., Distel, B., Leunissen, J. A. & Hochstenbach, F.** Role of the synthase domain of Ags1p in cell wall alpha-glucan biosynthesis in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **282**, 18969-18979 (2007).
196. **Calonge, T. M. et al.** *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall α -glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4393-4401 (2000).
197. **García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T. & Sánchez, Y.** Synthesis of α -glucans in fission yeast spores is carried out by three α -glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol. Microbiol.* **59**, 836-853 (2006).
198. **Ohashi, T. et al.** Structural analysis of alpha1,3-linked galactose-containing oligosaccharides in *Schizosaccharomyces pombe* mutants harboring single and multiple alpha-galactosyltransferase genes disruptions. *Glycobiology* **21**, 340-51 (2011).

199. **Vetter, I. R. & Wittinghofer, A.** The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-304 (2001).
200. **Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J.** The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**, 843-6 (2005).
201. **Perez, P. & Rincon, S. A.** Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.* **426**, 243-253 (2010).
202. **Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A.** GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-77 (2007).
203. **Levin, D. E.** Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 262-291 (2005).
204. **Nakano, K. & Mabuchi, I.** Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding Rho proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **155**, 119-122 (1995).
205. **Nakano, K., Arai, R. & Mabuchi, I.** The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **2**, 679-694 (1997).
206. **Mazzei, G. J., Schmid, E. M., Knowles, J. K., Payton, M. A. & Maundrell, K. G.** A Ca²⁺-independent protein kinase C from fission yeast. *J Biol Chem* **268**, 7401-6 (1993).
207. **Toda, T., Shimanuki, M. & Yanagida, M.** Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J.* **12**, 1987-1995 (1993).
208. **Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. & Sanchez, Y.** Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1620-1631 (2006).
209. **Garcia, P., Tajadura, V. & Sanchez, Y.** The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 721-31 (2009).
210. **Tajadura, V., García, B., García, I., García, P. & Sánchez, Y.** *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall β -glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J. Cell Sci.* **117**, 6163-6174 (2004).
211. **Morrell-Falvey, J. L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G. D. & Gould, K. L.** Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J. Cell Sci.* **118**, 5563-5573 (2005).
212. **Mutoh, T., Nakano, K. & Mabuchi, I.** Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* **10**, 1189-202 (2005).
213. **Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. & Mabuchi, I.** The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* **8**, 357-370 (2003).

214. **Pinar, M., Coll, P. M., Rincon, S. A. & Perez, P.** Schizosaccharomyces pombe Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* **19**, 1727-38 (2008).
215. **Hirata, D. et al.** Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role of a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *J. Cell Sci.* **111**, 149-159 (1998).
216. **Villar-Tajadura, M. A. et al.** Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol. Microbiol.* **70**, 867-881 (2008).
217. **Cansado, J., Soto, T., Gacto, M. & Perez, P.** Rga4, a Rho-GAP from fission yeast: Finding specificity within promiscuity. *Commun Integr Biol* **3**, 436-9 (2010).
218. **Soto, T. et al.** Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* **285**, 11516-25 (2010).
219. **Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y. & Sugiura, R.** Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **17**, 5028-5037 (2006).
220. **Takada, H.** [Cell surface protein Ecm33 is involved in negative feedback regulation of MAP kinase signalling and development of the in vivo real-time monitoring of MAP kinase signalling]. *Yakugaku Zasshi* **131**, 1195-200 (2011).
221. **Sanchez-Mir, L. et al.** Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS One* **9**, e88020 (2014).
222. **Miller, P. J. & Johnson, D. I.** Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1075-1083 (1994).
223. **Merla, A. & Johnson, D. I.** The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 469-477 (2000).
224. **Rincon, S. A., Estravis, M. & Perez, P.** Cdc42 regulates polarized growth and cell integrity in fission yeast. *Biochem Soc Trans* **42**, 201-5 (2014).
225. **Chang, E. C. et al.** Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**, 131-141 (1994).
226. **Fukui, Y. & Yamamoto, M.** Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to *ras1*. *Mol. Gen. Genet.* **215**, 26-31 (1988).
227. **Tu, H., Barr, M., Dong, D. L. & Wigler, M.** Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 5876-87 (1997).
228. **Coll, P. M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. & Pérez, P.** Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 313-23 (2003).

229. **Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. & Yamamoto, M.** Gef1p and Scd1p, the two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3617-3627 (2003).
230. **Coll, P. M., Rincon, S. A., Izquierdo, R. A. & Perez, P.** Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *Embo J.* **26**, 1865-1877 (2007).
231. **Das, M., Wiley, D. J., Chen, X., Shah, K. & Verde, F.** The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol* **19**, 1314-9 (2009).
232. **Das, M. et al.** Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2090-2101 (2007).
233. **Sawin, K. E.** Cell polarity: following formin function. *Curr. Biol.* **12**, R6-8 (2002).
234. **Munoz, S., Manjon, E. & Sanchez, Y.** The putative exchange factor Gef3p interacts with Rho3p GTPase and the septin ring during cytokinesis in fission yeast. *J Biol Chem* (2014).
235. **Kita, A. et al.** Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome trafficking through functional interaction with adaptin in Fission Yeast. *PLoS One* **6**, e16842 (2011).
236. **Santos, B., Martín-Cuadrado, A. B., Vázquez de Aldana, C. R., Del Rey, F. & Pérez, P.** Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot. Cell* **4**, 1639-1645 (2005).
237. **Santos, B., Gutierrez, J., Calonge, T. M. & Pérez, P.** Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **2**, 521-533 (2003).
238. **Nakano, K., Bunai, F. & Numata, O.** Stg 1 is a novel SM22/transgelin-like actin-modulating protein in fission yeast. *FEBS Lett* **579**, 6311-6 (2005).
239. **Rincón, S. A., Santos, B. & Pérez, P.** Fission yeast Rho5p GTPase is a functional paralogue of Rho1p that plays a role in survival of spores and stationary-phase cells. *Eukaryot. Cell* **5**, 435-446 (2006).
240. **Pollard, T. D.** Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 50-56 (2010).
241. **Pollard, T. D. & Wu, J. Q.** Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 149-155 (2010).
242. **Balasubramanian, M. K., Bi, E. & Glotzer, M.** Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr. Biol.* **14**, R806-R818 (2004).
243. **Marks, J., Hagan, I. M. & Hyams, J. S.** Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* **5**, 229-241 (1986).
244. **Bathe, M. & Chang, F.** Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast: towards a systems-level understanding. *Trends Microbiol.* **18**, 38-45 (2010).

245. **Goyal, A., Takaine, M., Simanis, V. & Nakano, K.** Dividing the spoils of growth and the cell cycle: The fission yeast as a model for the study of cytokinesis. *Cytoskeleton* **68**, 69-88 (2011).
246. **Daga, R. R. & Chang, F.** Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8228-8232 (2005).
247. **Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. & Chang, F.** A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol* **153**, 397-411 (2001).
248. **Daga, R. R., Yonetani, A. & Chang, F.** Asymmetric microtubule pushing forces in nuclear centering. *Curr. Biol.* **16**, 1544-1550 (2006).
249. **Wu, J. Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R. & Pollard, T. D.** Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev. Cell* **5**, 723-734 (2003).
250. **Sohrmann, M., Fankhauser, C., Brodbeck, C. & Simanis, V.** The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev.* **10**, 2707-2719 (1996).
251. **Bahler, J. et al.** Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *J. Cell Biol.* **143**, 1603-1616. (1998).
252. **Paoletti, A. & Chang, F.** Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2757-2773 (2000).
253. **Wu, J. Q. et al.** Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J. Cell Biol.* **174**, 391-402 (2006).
254. **Vavylonis, D., Wu, J. Q., Hao, S., O'Shaughnessy, B. & Pollard, T. D.** Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science* **319**, 97-100 (2008).
255. **Almonacid, M. & Paoletti, A.** Mechanisms controlling division-plane positioning. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 874-880 (2010).
256. **Kovar, D. R., Sirotkin, V. & Lord, M.** Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **21**, 177-87 (2011).
257. **Johnson, A. E., McCollum, D. & Gould, K. L.** Polar opposites: Fine-tuning cytokinesis through SIN asymmetry. *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 686-699 (2012).
258. **Ge, W. & Balasubramanian, M. K.** Pxl1p, a Paxillin-related protein, stabilizes the actomyosin ring during cytokinesis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1680-1692 (2008).
259. **Roberts-Galbraith, R. H., Chen, J. S., Wang, J. & Gould, K. L.** The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *J Cell Biol* **184**, 113-27 (2009).

-
260. **Pollard, L. W., Onishi, M., Pringle, J. R. & Lord, M.** Fission yeast Cyk3p is a transglutaminase-like protein that participates in cytokinesis and cell morphogenesis. *Mol Biol Cell* **23**, 2433-44 (2012).
261. **Arellano, M., Cartagena-Lirola, H., Nasser Hajibagheri, M. A., Durán, A. & Valdivieso, M. H.** Proper ascospore maturation requires the *chs1⁺* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **35**, 79-89 (2000).
262. **Martín-García, R., Durán, A. & Valdivieso, M. H.** In *Schizosaccharomyces pombe* chs2p has no chitin synthase activity but is related to septum formation. *FEBS Lett.* **549**, 176-180 (2003).
263. **Martín-García, R. & Valdivieso, M. H.** The fission yeast Chs2 protein interacts with the type-II myosin Myo3p and is required for the integrity of the actomyosin ring. *J. Cell Sci.* **119**, 2768-2779 (2006).
264. **Sharifmoghadam, M. R. & Valdivieso, M. H.** The fission yeast SEL1 domain protein Cfh3p: a novel regulator of the glucan synthase Bgs1p whose function is more relevant under stress conditions. *J. Biol. Chem.* **284**, 11070-11079 (2009).
265. **Sharifmoghadam, M. R. et al.** The integrity of the cytokinesis machinery under stress conditions requires the glucan synthase Bgs1p and its regulator Cfh3p. *PLoS One* **7**, e42726 (2012).
266. **Pelham, R. J. & Chang, F.** Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* **419**, 82-86 (2002).
267. **Lord, M., Sladewski, T. E. & Pollard, T. D.** Yeast UCS proteins promote actomyosin interactions and limit myosin turnover in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8014-9 (2008).
268. **Proctor, S. A., Minc, N., Boudaoud, A. & Chang, F.** Contributions of turgor pressure, the contractile ring, and septum assembly to forces in cytokinesis in fission yeast. *Curr. Biol.* **22**, 1601-1608 (2012).
269. **Krapp, A. & Simanis, V.** An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 411-415 (2008).
270. **Hachet, O. & Simanis, V.** Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev.* **22**, 3205-3216 (2008).
271. **Bohnert, K. A. et al.** SIN-dependent phosphoinhibition of formin multimerization controls fission yeast cytokinesis. *Genes Dev.* **27**, 2164-2177 (2013).
272. **Guertin, D. A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K. L. & McCollum, D.** The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *EMBO J.* **19**, 1803-1815 (2000).
273. **Rachfall, N., Johnson, A. E., Mehta, S., Chen, J. S. & Gould, K. L.** Cdk1 Promotes Cytokinesis in Fission Yeast through Activation of the Septation Initiation Network. *Mol Biol Cell* (2014).
274. **Daga, R. R., Lahoz, A., Muñoz, M. J., Moreno, S. & Jiménez, J.** Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *EMBO J.* **24**, 2436-2446 (2005).
275. **García-Cortés, J. C. & McCollum, D.** Proper timing of cytokinesis is regulated by *Schizosaccharomyces pombe* Etd1. *J. Cell Biol.* **186**, 739-753 (2009).

276. Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B. & Varma, A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 19679-19682 (2001).
277. Dekker, N. et al. Role of the α -glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3903-3914 (2004).
278. García, I., Jiménez, D., Martín, V., Durán, A. & Sánchez, Y. The α -glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol. Cell* **97**, 569-576 (2005).
279. Martín-Cuadrado, A. B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Vázquez de Aldana, C. R. & del Rey, F. The endo- β -1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **116**, 1689-1698 (2003).
280. Duenas-Santero, E. et al. Characterization of glycoside hydrolase family 5 proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **9**, 1650-60 (2010).
281. Martín-Cuadrado, A. B. et al. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4867-4881 (2005).
282. D'Avino, P. P. How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - lessons from Anillin-related proteins. *J. Cell Sci.* **122**, 1071-1079 (2009).
283. Drgonova, J., Drgon, T., Roh, D. H. & Cabib, E. The GTP-binding protein Rho1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *J. Cell Biol.* **146**, 373-387 (1999).
284. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132 (1982).
285. Guertin, D. A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K. L. & McCollum, D. The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *Embo J* **19**, 1803-1815 (2000).
286. Johnson, B. F., Yoo, B. Y. & Calleja, G. B. Cell division in yeasts: movement of organelles associated with cell plate growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **115**, 358-366 (1973).
287. Cortés, J. C. G. Estudio de Bgs1 y Bgs4: dos proteínas esenciales implicadas en la biosíntesis del β -(1,3)-D-glucano de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis doctoral. (2006).
288. Behrens, R. & Nurse, P. Roles of fission yeast Tea1p in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **157**, 783-793 (2002).
289. Bahler, J. & Nurse, P. Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *EMBO J.* **20**, 1064-1073 (2001).
290. Niccoli, T., Arellano, M. & Nurse, P. Role of Tea1p, Tea3p and Pom1p in the determination of cell ends in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **20**, 1349-1358 (2003).
291. Hachet, O. et al. A phosphorylation cycle shapes gradients of the DYRK family kinase Pom1 at the plasma membrane. *Cell* **145**, 1116-28 (2011).

-
292. **Arellano, M. et al.** *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J. Cell Sci.* **112**, 3569-3578 (1999).
293. **Perez, P. & Calonge, T. M.** Yeast protein kinase C. *J Biochem* **132**, 513-7 (2002).
294. **Barba, G. et al.** Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell. Signal.* **20**, 748-757 (2008).
295. **Calonge, T. M., Arellano, M., Coll, P. M. & Pérez, P.** Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **47**, 507-518 (2003).
296. **Kanoh, J., Watanabe, Y., Ohsugi, M., Iino, Y. & Yamamoto, M.** *Schizosaccharomyces pombe* gad7+ encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells* **1**, 391-408 (1996).
297. **Shiozaki, K. & Russell, P.** Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2276-88 (1996).
298. **Kim, H. et al.** The kelch repeat protein, Tea1, is a potential substrate target of the p21-activated kinase, Shk1, in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **278**, 30074-30082 (2003).
299. **Toya, M., Motegi, F., Nakano, K., Mabuchi, I. & Yamamoto, M.** Identification and functional analysis of the gene for type I myosin in fission yeast. *Genes Cells* **6**, 187-99 (2001).
300. **Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L. & Pollard, T. D.** Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Mol Biol Cell* **21**, 2894-904 (2010).
301. **Humphries, C. L. et al.** Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J Cell Biol* **159**, 993-1004 (2002).
302. **Moseley, J. B. & Goode, B. L.** The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 605-645 (2006).
303. **Gandhi, M., Jangi, M. & Goode, B. L.** Functional surfaces on the actin-binding protein coronin revealed by systematic mutagenesis. *J Biol Chem* **285**, 34899-908 (2010).
304. **Iwaki, T., Tanaka, N., Takagi, H., Giga-Hama, Y. & Takegawa, K.** Characterization of end4+, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **21**, 867-81 (2004).
305. **Castagnetti, S., Behrens, R. & Nurse, P.** End4/Sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **118**, 1843-1850 (2005).
306. **Ishiguro, J. & Kobayashi, W.** An actin point-mutation neighboring the 'hydrophobic plug' causes defects in the maintenance of cell polarity and septum organization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **392**, 237-241 (1996).

307. Lindner, R. & Naim, H. Y. Domains in biological membranes. *Exp. Cell Res.* **315**, 2871-2878 (2009).
308. Simons, K. & Sampaio, J. L. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004697 (2011).
309. McCollum, D., Feoktistova, A., Morpew, M., Balasubramanian, M. & Gould, K. L. The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *EMBO J.* **15**, 6438-6446 (1996).
310. Morton, W. M., Ayscough, K. R. & McLaughlin, P. J. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol* **2**, 376-8 (2000).
311. Chang, F. & Martin, S. G. Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1-14 (2009).
312. Heider, M. R. & Munson, M. Exorcising the exocyst complex. *Traffic* **13**, 898-907 (2012).
313. Liu, J., Fairn, G. D., Ceccarelli, D. F., Sicheri, F. & Wilde, A. Cleavage furrow organization requires PIP(2)-mediated recruitment of anillin. *Curr. Biol.* **22**, 64-69 (2012).
314. Friend, D. S. & Bearer, E. L. beta-Hydroxysterol distribution as determined by freeze-fracture cytochemistry. *Histochem J* **13**, 535-46 (1981).
315. Severs, N. J. & Robenek, H. Detection of microdomains in biomembranes. An appraisal of recent developments in freeze-fracture cytochemistry. *Biochim Biophys Acta* **737**, 373-408 (1983).
316. Balasubramanian, M. K., Srinivasan, R., Huang, Y. & Ng, K. H. Comparing contractile apparatus-driven cytokinesis mechanisms across kingdoms. *Cytoskeleton* **69**, 942-956 (2012).
317. Le Goff, X., Motegi, F., Salimova, E., Mabuchi, I. & Simanis, V. The *S. pombe rlc1* gene encodes a putative myosin regulatory light chain that binds the type II myosins myo3p and myo2p. *J. Cell Sci.* **113**, 4157-4163 (2000).
318. Wong, K. C. et al. Importance of a myosin II-containing progenitor for actomyosin ring assembly in fission yeast. *Curr. Biol.* **12**, 724-729 (2002).
319. Yonetani, A. et al. Regulation and targeting of the fission yeast formin cdc12p in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2208-2219 (2008).
320. Viana, R. A. et al. Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics* **195**, 421-32 (2013).
321. Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. & Sanchez, Y. Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* **23**, 1031-1043 (2006).
322. Lewellyn, L., Dumont, J., Desai, A. & Oegema, K. Analyzing the effects of delaying aster separation on furrow formation during cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Mol. Biol. Cell* **21**, 50-62 (2010).

-
323. **Green, R. A., Paluch, E. & Oegema, K.** Cytokinesis in animal cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 29-58 (2012).
324. **Barr, F. A. & Gruneberg, U.** Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* **131**, 847-860 (2007).
325. **Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H. & Earnshaw, W. C.** The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 789-803 (2012).
326. **Matsumoto, S. & Yanagida, M.** Histone gene organization of fission yeast: a common upstream sequence. *EMBO J* **4**, 3531-8 (1985).
327. **Ding, D. Q., Chikashige, Y., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y.** Oscillatory nuclear movement in fission yeast meiotic prophase is driven by astral microtubules, as revealed by continuous observation of chromosomes and microtubules in living cells. *J Cell Sci* **111 (Pt 6)**, 701-12 (1998).
328. **Bai, S. W. et al.** The fission yeast Nup107-120 complex functionally interacts with the small GTPase Ran/Spi1 and is required for mRNA export, nuclear pore distribution, and proper cell division. *Mol Cell Biol* **24**, 6379-92 (2004).
329. **Unsworth, A., Masuda, H., Dhut, S. & Toda, T.** Fission yeast kinesin-8 Klp5 and Klp6 are interdependent for mitotic nuclear retention and required for proper microtubule dynamics. *Mol Biol Cell* **19**, 5104-15 (2008).
330. **Laporte, D., Coffman, V. C., Lee, I. J. & Wu, J. Q.** Assembly and architecture of precursor nodes during fission yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* **192**, 1005-1021 (2011).
331. **Sparks, C. A., Morphew, M. & McCollum, D.** Sid2p, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis. *J. Cell Biol.* **146**, 777-790 (1999).
332. **Barral, Y. & Liakopoulos, D.** Role of spindle asymmetry in cellular dynamics. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **278**, 149-213 (2009).
333. **Tomlin, G. C., Morrell, J. L. & Gould, K. L.** The spindle pole body protein Cdc11p links Sid4p to the fission yeast septation initiation network. *Mol Biol Cell* **13**, 1203-14 (2002).
334. **Arellano, M., Coll, P. M. & Pérez, P.** Rho GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 51-60. (1999).
335. **Durán, A. & Pérez, P.** in *Molecular biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond* (ed. Egel, R.) 269-279 (Springer Verlag, Berlin, 2004).
336. **Kovar, D. R., Kuhn, J. R., Tichy, A. L. & Pollard, T. D.** The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol* **161**, 875-87 (2003).
337. **Kovar, D. R., Harris, E. S., Mahaffy, R., Higgs, H. N. & Pollard, T. D.** Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* **124**, 423-35 (2006).

338. **Ciobanasu, C., Faivre, B. & Le Clainche, C.** Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur J Cell Biol* **92**, 339-48 (2013).
339. **Bernal, M., Sanchez-Romero, M. A., Salas-Pino, S. & Daga, R. R.** Regulation of fission yeast morphogenesis by PP2A activator pta2. *PLoS One* **7**, e32823 (2012).
340. **Basu, R., Munteanu, E. L. & Chang, F.** Role of turgor pressure in endocytosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **25**, 679-87 (2014).
341. **Yamamoto, T. et al.** Initial polarized bud growth by endocytic recycling in the absence of actin cable-dependent vesicle transport in yeast. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1237-1252 (2010).
342. **Zuo, X. et al.** Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1383-1388 (2006).
343. **Sacristan, C., Reyes, A. & Roncero, C.** Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells. *Mol Microbiol* **83**, 1124-35 (2012).
344. **Greenberg, M. L. & Axelrod, D.** Anomalously slow mobility of fluorescent lipid probes in the plasma membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* **131**, 115-27 (1993).
345. **Valdez-Taubas, J. & Pelham, H. R.** Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr Biol* **13**, 1636-40 (2003).
346. **Fededa, J. P. & Gerlich, D. W.** Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* **14**, 440-447 (2012).
347. **Hachet, O., Bendezu, F. O. & Martin, S. G.** Fission yeast: in shape to divide. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 858-864 (2012).
348. **Johnson, B. F., Yoo, B. Y., Calleja, G. B. & Kozela, C. P.** Second thoughts on septation by the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*: pull vs. push mechanisms with an appendix - dimensional modelling of the flat and variable septa. *Antonie Van Leeuwenhoek* **88**, 1-12 (2005).