

Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Biología Funcional y Genómica  
(USAL / CSIC)



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA



Estudio del papel de Bgs1p de *Schizosaccharomyces pombe* en la conexión entre la ruta SIN y el establecimiento del crecimiento polarizado

Memoria presentada por José Ángel Clemente Ramos  
para optar al Grado de Doctor en Biología

JOSÉ ÁNGEL CLEMENTE RAMOS

Salamanca, 2015





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

CERTIFICA

Que la memoria titulada “Estudio del papel de Bgs1p de *Schizosaccharomyces pombe* en la conexión entre la ruta SIN y el establecimiento del crecimiento polarizado”, presentada por el licenciado **José Ángel Clemente Ramos** para optar al grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. Juan Carlos García 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 201\_.

Fdo. Dr. Luis Román Fernández Lago



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**Dpto. de Microbiología y Genética**  
**Instituto de Biología Funcional y**  
**Genómica**



**VNiVERSiDAD**  
**D SALAMANCA**



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 el licenciado **José Ángel Clemente Ramos** ha realizado el trabajo titulado “Estudio del papel de Bgs1p de *Schizosaccharomyces pombe* en la conexión entre la ruta SIN y el establecimiento del crecimiento polarizado” 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, firma el presente certificado en Salamanca, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

Fdo. Dr. Juan Carlos Ribas Elcorobarrutia

Fdo. Juan Carlos García Cortés



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**Dpto. de Microbiología y Genética**  
**Instituto de Biología Funcional y**  
**Genómica**



**VNiVERSiDAD**  
**D SALAMANCA**



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

**CERTIFICA**

Que la memoria titulada “Estudio del papel de Bgs1p de *Schizosaccharomyces pombe* en la conexión entre la ruta SIN y el establecimiento del crecimiento polarizado”, presentada por el licenciada **José Ángel Clemente Ramos** para optar al grado de **Doctor en Biología**, 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 201\_\_.

Fdo. Dra. Henar Valdivieso





## Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el laboratorio del Dr. Ribas 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 gracias a la financiación de una beca predoctoral del Programa de Formación del Personal Investigador (BES2007-14169) del Ministerio de Educación del Gobierno de España y una beca EMBO (ASTF-368-2009) para una estancia breve en el laboratorio del Prof. Simanis en el ISREC (Lausana, Suiza). Así como los proyectos del Plan Nacional de I+D BIO2006-13566 y BIO2009-10597 (MICINN/Programa FEDER), y el proyecto de la Junta de Castilla y León GR231.



**A mi familia**



## Abreviaturas

- $\alpha$ GS**  $\alpha(1,3)$ glucán sintasa
- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ARN** Ácido ribonucleico
- ATP** Adenosina 5'-trifosfato (de “Adenosine-5'-triphosphate”)
- $\beta$ GS**  $\beta(1,3)$ glucán sintasa
- BSA** Seroalbúmina bovina (de “Bovine serum albumin”)
- CAR** Anillo contráctil de actomiosina (de “Contractile actomyosin ring”)
- cdc** Mutantes de ciclo celular (de “*cell division cycle*”)
- CDKs** Ciclinas mitóticas (de “Cyclin dependent kinases”)
- CRIB** Dominio de unión a Cdc42/Rac (de “*Cdc42/Rac Interactive Binding*”)
- CW** Calcofluor White
- DMSO** Dimetil Sulfóxido
- D.O.** Densidad óptica
- EDTA** Ácido etilén diamino tetracético (de “Ethylenediaminetetraacetic acid”)
- G418** 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)

**MBP** Proteína Básica de Mielina (de “Myelin Basic Protein”)

**MCS** Sitio de clonación múltiple (de “Multiple cloning site”)

**MET** Microscopía Electrónica de Transmisión

**min** Minutos

**MM** Medio Mínimo para *Schizosaccharomyces pombe*

**MTs** Microtúbulos

**MTOC** Centro organizador de microtúbulos (de “MicroTubule Organizing Center”)

**MOR** Ruta de morfogénesis (de “Morphogenesis”)

**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 “Protein internal repeats - Cell wall proteins”)

**PMSF** Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo (de “Phenylmethylsulfonyl fluoride”)

**PVDF** Fluoruro de polivinilideno (de “Polyvinylidene fluoride”)

**RE** Retículo Endoplásmico

**rpm** Revoluciones por minuto

**S** Sorbitol

**SIN** Ruta de activación de la septación (de “Septation initiation network”)

**SDS** Dodecil sulfato sódico (de “Sodium Dodecyl Sulfate”)

**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 **B**roth para *E. Coli*

**TBZ** Tiabendazol

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

**tea** Mutantes de polaridad celular (de “**t**ip **e**longaion **a**berrant”)

**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



---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Historia</b>	<b>3</b>
1.1 Ciclo de vida de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
<b>2. Ciclo morfogénico y ciclo celular</b>	<b>5</b>
2.1 Regulación del crecimiento polarizado	6
2.2 Citoesqueleto de actina	7
2.3 Citoesqueleto de microtúbulos	9
2.4 Cdc42p	10
<b>3. La pared celular</b>	<b>12</b>
3.1 Composición	12
3.1.1 $\beta$ -glucano	12
3.1.2 $\alpha$ -glucano	12
3.1.3 Galactomanoproteínas	13
3.2 Arquitectura de la pared celular	14
<b>4. Biosíntesis de los componentes de la pared celular y su regulación</b>	<b>15</b>
4.1 Biosíntesis del $\beta$ -glucano	15
4.1.1.1 Bgs1p/Cps1p	16
4.1.1.2 Bgs2p	17
4.1.1.3 Bgs3p	18
4.1.1.4 Bgs4p	18
4.1.2 Regulación de la biosíntesis del $\beta$ -glucano	19
4.2 Biosíntesis del $\alpha$ -glucano	21
4.2.1 Regulación de la biosíntesis del $\alpha$ -glucano	21
4.3 Biosíntesis de las galactomanoproteínas	22
4.4 Biosíntesis de la quitina	22
<b>5. La citocinesis en <i>Schizosaccharomyces pombe</i></b>	<b>22</b>
5.1 Selección de sitio de división	23
5.2 Ensamblaje del CAR	23
5.3 Mantenimiento del CAR en la zona media	25
5.4 La ruta SIN	26
5.4.1 Localización de los componentes de la ruta SIN	27
5.4.2 Funciones de la ruta SIN	29
5.4.3 Checkpoint de citocinesis	29

---

5.4.4 Reguladores de la ruta SIN	30
5.5 Deposición del material de membrana y síntesis del septo de división	31
5.6 Separación celular	33
5.6.1 $\alpha$ - y $\beta$ -glucanasas	33
5.6.2 Septinas, anilina Mid2p y complejo del exocisto	33
5.6.3 GTPasas Rho3p y Rho4p	35
<b>6. La ruta MOR</b>	<b>36</b>
6.1 Componentes, localización y mecanismo de acción de la ruta MOR	36
6.2 Comunicación entre la ruta SIN y la ruta MOR	36
<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>43</b>

# Introducción



### 1. Historia

La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* fue descrita y aislada por primera vez en 1883 por P. Lindner a partir de una variedad de cerveza africana, una bebida que en idioma suajili se denomina “pombe”. En 1921 A. Osterwalder aisló una cepa homotática, que denominó  $h^{90}$  debido a que el 90% del cultivo podía conjugarse y formar esporas cuando los nutrientes del medio se agotaban. Las cepas de *S. pombe* que se utilizan actualmente en el laboratorio fueron caracterizadas genéticamente por Urs Leopold a mediados del siglo XX, generando las estirpes silvestres heterotáticas  $h^+$  975 y  $h^-$  972 a partir de un parental  $h^{90}$  (Leupold, 1950). *S. pombe* se utilizó experimentalmente por primera vez de la mano de Murdoch Mitchison, que reconoció su utilidad como modelo para el estudio del ciclo celular (Mitchison, 1957).

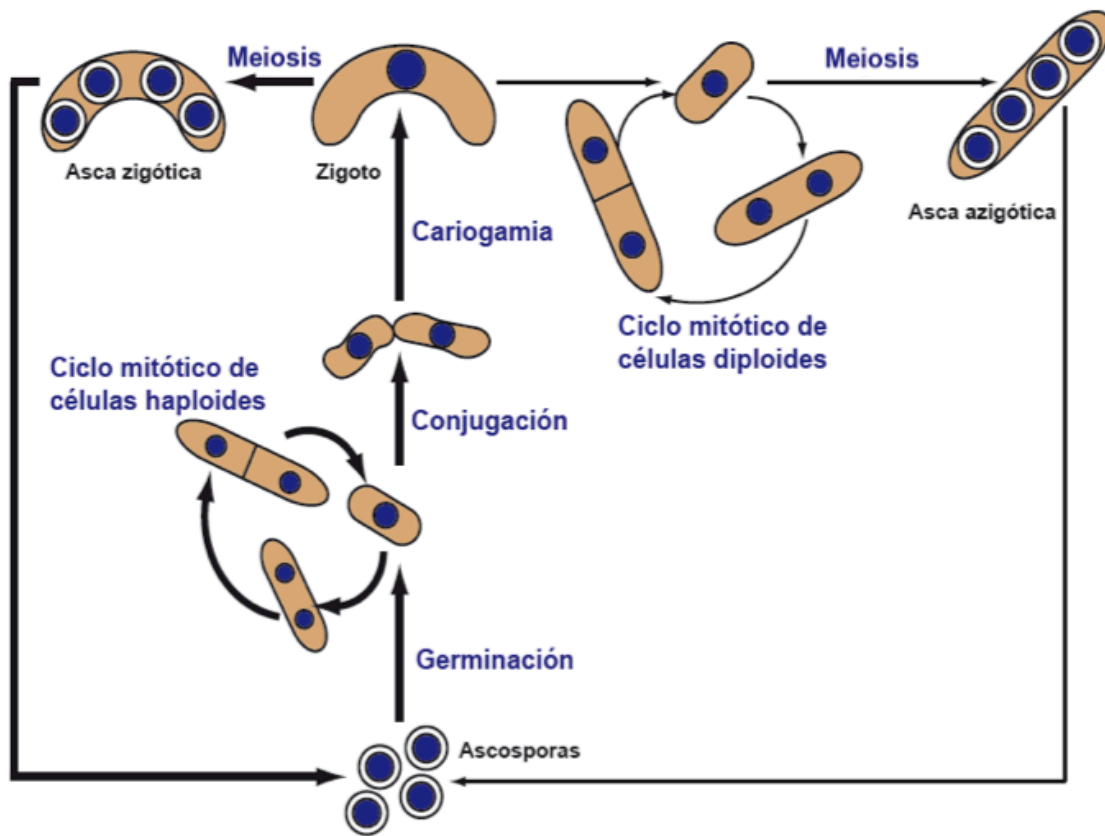
Los sistemas taxonómicos incluyen dentro del género *Schizosaccharomyces* a tres especies: *S. pombe*, *S. octosporus* y *S. japonicus*. El género *Schizosaccharomyces* se ha incluido dentro del *Phylum Ascomycota*. Los ascomicetos son un grupo muy heterogéneo de hongos que forman una pared celular típica, con ascosporas endógenas y una mitosis cerrada. A este grupo pertenecen también las levaduras de gemación como *Saccharomyces cerevisiae*, aunque son organismos evolutivamente muy distantes. Se estima que la separación de ambas especies ocurrió hace unos 1000 millones de años, mientras que la divergencia entre hongos, plantas y metazoos se produjo hace unos 1600 millones de años (Sipiczki, 2000; Heckman *et al.*, 2001; Hedges, 2002; Yanagida, 2002).

El genoma de *S. pombe* fue secuenciado en 2002 y se compone de unos 13,8 millones de nucleótidos organizados en tres cromosomas con unas 5.000 secuencias de lectura abierta que probablemente codifiquen un número equivalente de proteínas (Wood *et al.*, 2002; Forsburg, 2003; Bitton *et al.*, 2011). Al tratarse de un microorganismo fácil de cultivar en el laboratorio y manipulable genéticamente, *S. pombe* es un modelo muy adecuado para el estudio de procesos celulares como la reparación, recombinación, replicación y transcripción del ADN, la dinámica de los cromosomas, la meiosis, la expresión génica, la señalización celular, el ciclo celular, la citocinesis y la morfogénesis.

#### 1.1 Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*.

*S. pombe* es un hongo ascomiceto que presenta un ciclo de vida sencillo con células haploides estables que son heterotáticas, de tipo sexual  $h^+$  (plus) o  $h^-$  (minus). Cuando células de tipo sexual opuesto crecen en condiciones de ausencia de nutrientes o de nitrógeno, se induce una parada de su ciclo celular en fase G1 y la puesta en marcha de un programa de diferenciación celular, que permite su conjugación y la posterior generación de un cigoto diploide (Egel, 1994).

Durante el proceso de conjugación las células forman unas proyecciones denominadas “shmoo”, que ponen en contacto a las parejas de células de tipo sexual opuesto, que posteriormente fusionan sus citoplasmas y núcleos para dar lugar a un cigoto diploide. Los cigotos diploides se pueden mantener en el laboratorio y crecer mediante sucesivos ciclos mitóticos si se transfieren a un medio rico en nutrientes antes de producirse la meiosis (Egel y Egel-Mitani, 1974). Sin embargo, lo habitual es que se mantenga la situación de escasez de nutrientes o de nitrógeno lo que hace que los cigotos sufran la meiosis y generen unas ascas con cuatro ascosporas haploides en su interior. La degradación de las ascas permite la liberación de las ascosporas, que germinarán cuando las condiciones nutricionales del medio vuelvan a ser favorables (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *S. pombe*.** Se muestra las fases haploide y diploide con la generación de ascas zigóticas y azigóticas respectivamente. Las flechas gruesas marcan el ciclo biológico más habitual en la levadura de fisión.

También se ha descrito que en determinadas condiciones de crecimiento *S. pombe* es capaz de formar hifas y tener un crecimiento invasivo. La combinación de una matriz extracelular adecuada, en presencia de una fuente ilimitada de carbono y escasez de nitrógeno estimularía el crecimiento filamentoso (Amoah-Buahin *et al.*, 2005).



## 2. Ciclo morfogenésico y ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto de eventos que conducen al crecimiento y la división de una célula. El ciclo celular de *S. pombe* presenta dos etapas principales: una etapa de interfase dividida en las fases: G1, S y G2 y una etapa M de división, compuesta por la mitosis y la citocinesis. En un cultivo de *S. pombe* creciendo exponencialmente las fases G1 y S se solapan con el final de la citocinesis, siendo G1 apenas distinguible por su corta duración. Una vez que se ha completado la separación, las células inician la fase G2, que en esta levadura ocupa casi las dos terceras partes del ciclo celular (70% del total), por lo que la mayoría de las células creciendo exponencialmente se encuentran en esta fase con un contenido doble de ADN denominado 2C (Nurse, 1975).

La levadura de fisión es también un modelo atractivo para el estudio de la morfogénesis. Sus células son cilíndricas, con 3-4  $\mu\text{m}$  de diámetro y 7-15  $\mu\text{m}$  de longitud, que crecen por extensión apical y se dividen por fisión en la zona media. Después de la división celular las células inician su crecimiento por el polo viejo (el extremo existente en la célula antes de la división), en un patrón de crecimiento denominado OETO (Old end take off), que arranca durante los primeros momentos de la fase G2. Cuando las células alcanzan un tamaño específico, comienzan a crecer por el polo nuevo (el extremo formado después de la división celular) en un proceso denominado NETO (New end take off), que tiene lugar durante la fase G2 del ciclo celular (Mitchison y Nurse, 1985). Las células continúan creciendo hasta que alcanzan un tamaño determinado, deteniendo entonces su crecimiento y entrando en mitosis. Finalmente se produce la formación de un septo de división en la zona media y la posterior degradación del septo y separación de las dos células hermanas (Hayles y Nurse, 2001; Martin y Chang, 2005; La Carbona *et al.*, 2006; Petersen y Nurse, 2007; Chang y Martin, 2009) (Figura 2).

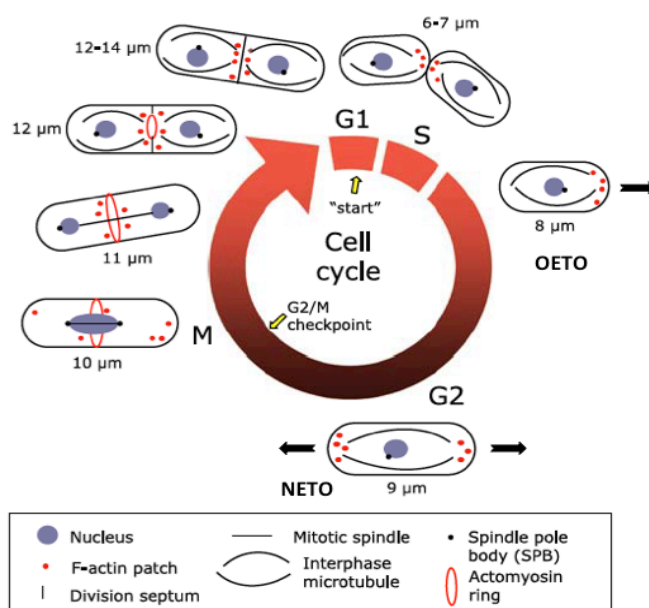


Figura 2. Ciclo morfogenésico y ciclo celular durante el crecimiento vegetativo en *S. pombe*. Los cambios en el tamaño celular y en la distribución de los citoesqueletos de actina y de microtúbulos se corresponden con diferentes estadios del ciclo celular (G1/S, G2 y M). Esquema adaptado de (Ng *et al.*, 2006).

## 2.1 Regulación del crecimiento polarizado

El patrón de crecimiento de la levadura de fisión se consigue gracias a la creación y el mantenimiento de zonas de crecimiento activo en los polos celulares. Tanto la actina como los microtúbulos (MTs) son necesarios para el crecimiento polarizado (Piel y Tran, 2009; Pérez y Rincón, 2010). El citoesqueleto de MTs sería responsable de determinar por dónde tiene que crecer, mientras que el citoesqueleto de actina dirigiría los componentes necesarios para el crecimiento polarizado a las zonas especificadas (Figura 3).

Los mutantes de *S. pombe* con defectos en el crecimiento se agrupan en dos categorías. Células esféricas con una pérdida completa de la polaridad y células dobladas o con nuevas zonas de crecimiento que mantienen el crecimiento polarizado (Verde *et al.*, 1995; Brunner y Nurse, 2000; Snaith y Sawin, 2005) (Figura 4).

Estos fenotipos son el resultado de alteraciones de los citoesqueletos, tanto de MTs como de actina, que causan respectivamente defectos en el posicionamiento de las zonas de crecimiento y en la secreción polarizada. Por lo

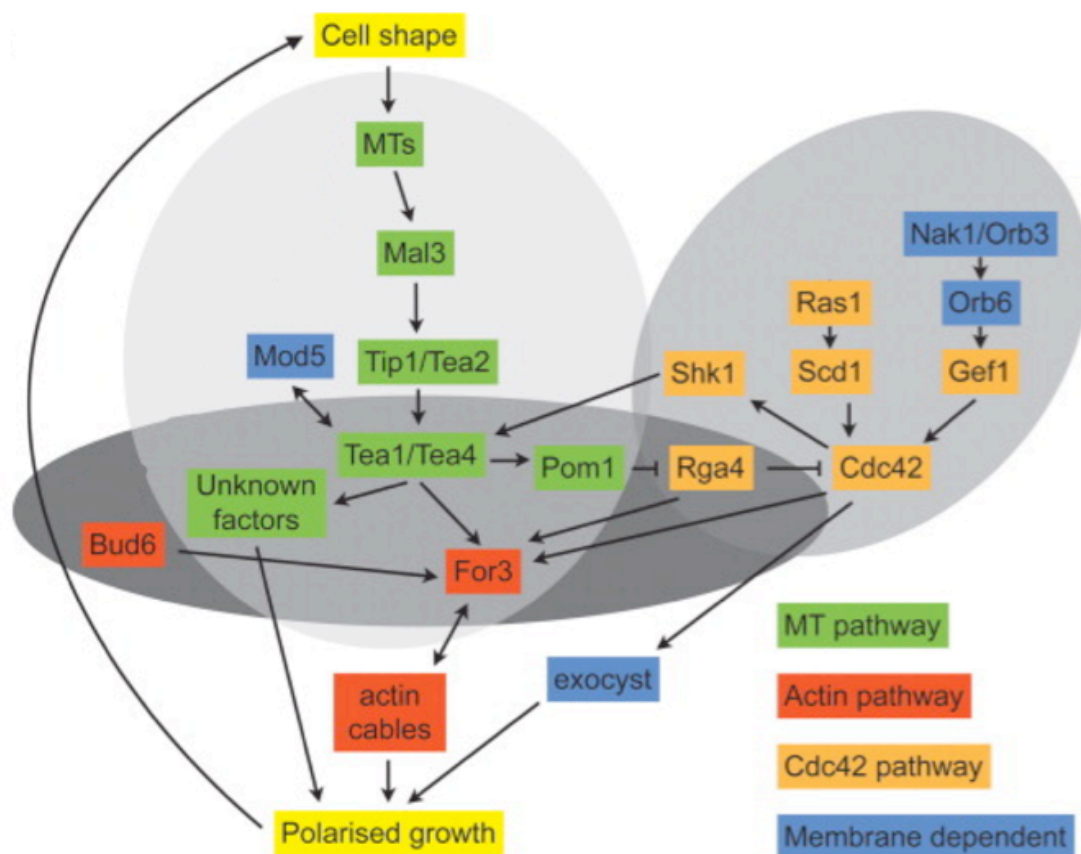
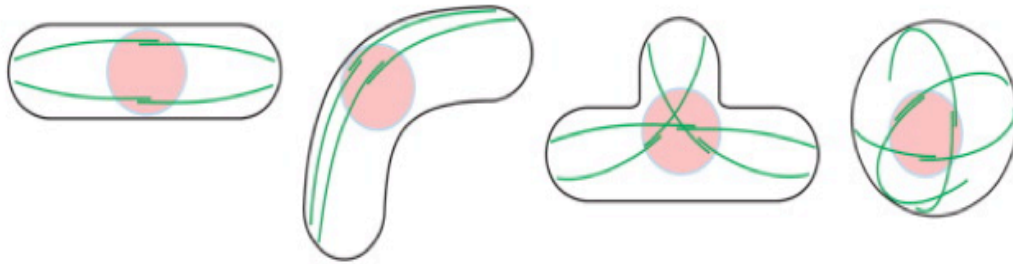


Figura 3. Representación esquemática de la red de polaridad en *S. pombe*. Gris claro: las proteínas implicadas en el establecimiento del crecimiento polarizado. Gris intermedio: factores implicados en restringir las zonas de crecimiento. Gris oscuro: proteínas necesarias durante NETO. Adaptado de (Huisman y Brunner, 2011).



**Figura 4. Defectos en la polaridad celular.** Los fenotipos de células dobladas, ramificadas o de pérdida de polaridad, que difieren drásticamente de la morfología cilíndrica de una estirpe silvestre, generalmente se encuentran asociados a defectos en los citoesqueletos de microtúbulos y de actina, encargados de posicionar los determinantes de polaridad, así como de regular el aporte de aquellos componentes que aseguran el mantenimiento del crecimiento polarizado. Adaptado de (Huisman y Brunner, 2011).

tanto, el correcto funcionamiento de ambos citoesqueletos es esencial para el aporte de nuevos componentes estructurales y enzimas, necesarios para la síntesis de nueva membrana plasmática y pared celular en las zonas de crecimiento (Huisman y Brunner, 2011).

## 2.2 Citoesqueleto de actina

La levadura de fisión posee una única isoforma de la actina, codificada por *act1<sup>+</sup>*, con dos conformaciones: como monómeros de actina globular (G-actina) y como polímeros de actina denominada actina fibrilar (F-actina) que puede encontrarse en tres estructuras diferentes a lo largo del ciclo celular: parches, cables y anillo contráctil (Kovar *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2014) (**Figura 5A**).

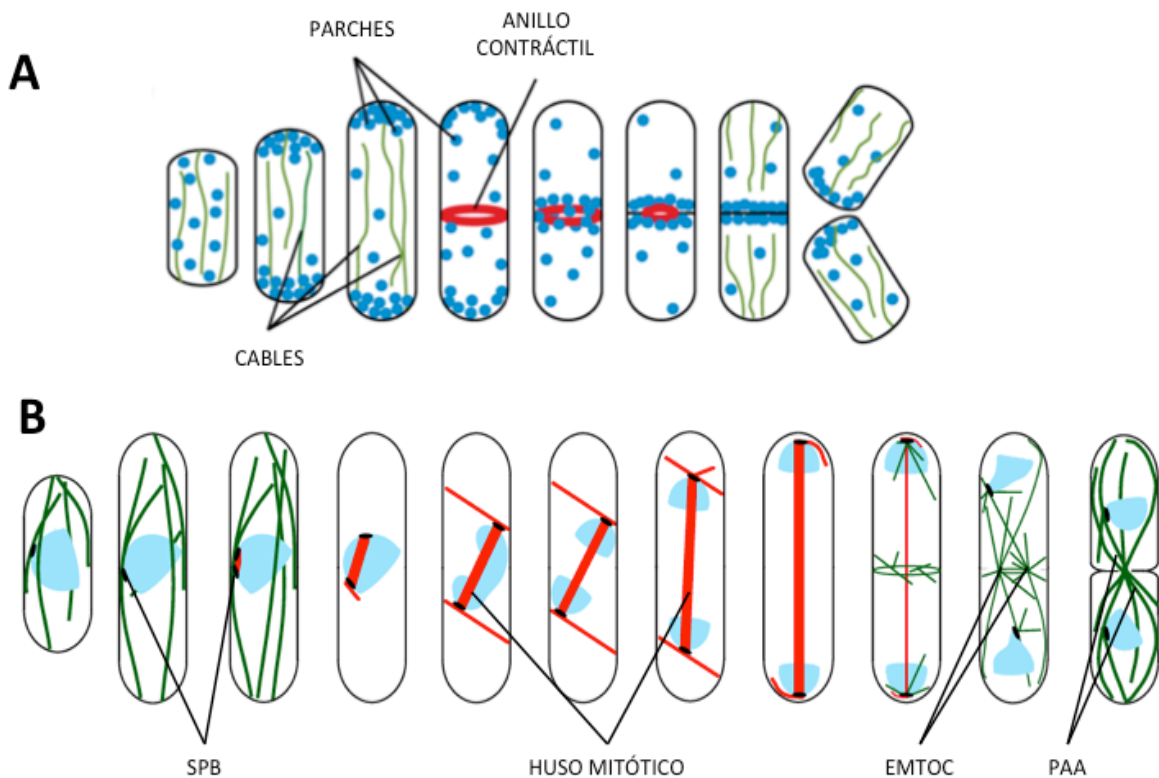
La generación del crecimiento polarizado depende de la exocitosis y la secreción polarizada, así como de los cables de actina y las miosinas de tipo V (Bendezú y Martin, 2011). Además los dominios lipídicos de la membrana denominados "lipids rafts" se encuentran íntimamente asociados a las zonas de crecimiento activo, regulando la distribución espacial de proteínas y lípidos críticos para el establecimiento de polaridad (Wachtler *et al.*, 2003).

-Los parches de actina son la principal forma de organización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento en interfase. Los parches de actina son sitios dinámicos de polimerización de actina y marcan las zonas de la membrana plasmática donde se produce la endocitosis (Kaksonen *et al.*, 2003; Gachet y Hyams, 2005; Sirotkin *et al.*, 2010). Se concentran en los polos de crecimiento durante interfase y en la zona media durante la división celular. El complejo Arp2p/3p es el encargado de nuclear los parches de actina (Moreau *et al.*, 1996; Winter *et al.*, 1997). Este complejo se encuentra regulado por Wsp1p y la miosina de tipo I Myo1p (Moreau *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2005).

-Los cables de actina son necesarios para la secreción y el crecimiento polarizado, funcionando como pistas para el movimiento de los parches de actina y

proteínas motoras como las miosinas de tipo V (Myo51p y Myo52p), que están implicadas en el transporte de vesículas que contienen las proteínas y el material necesarios para la síntesis de membrana plasmática y pared celular (Motegi *et al.*, 2001; Mulvihill *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001). Los cables de actina se componen de haces paralelos de filamentos de actina, que se ensamblan de forma polarizada gracias a la actividad de la formina For3p y a la tropomiosina Cdc8p. For3p se activa interaccionando con Cdc42p y los reguladores Bud6p y Hob1p (Feierbach y Chang, 2001; Kamasaki *et al.*, 2005; Kovar, 2006; Martin y Chang, 2006; Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009).

-El anillo contráctil de actomiosina (CAR) se trata de una estructura específica que se ensambla en la zona media al comienzo de la mitosis y que va a permitir llevar a cabo la citocinesis, dirigiendo la síntesis del septo de división durante su contracción. Está formado principalmente por filamentos de actina, las miosinas de clase II Myo2p y Myo3p y otras proteínas de unión a la actina y la miosina, como la formina Cdc12p, que ensambla los cables de actina que se incorporan al CAR, y cuya actividad está regulada por la profilina Cdc3p y la tropomiosina Cdc8p (Streiblova *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 1997; Kovar, 2003; Kovar, 2006; Skau *et al.*, 2009; Laporte *et al.*, 2010).



**Figura 5 Citoesqueletos de actina y de microtúbulos.** (A) Esquema de las principales estructuras de actina: parches, cables y anillo contráctil. Adaptado de (Kovar *et al.*, 2001). (B) Dinámica del citoesqueleto de MTs durante el ciclo vegetativo. Azul, núcleo; negro, cuerpo polar del huso mitótico (SPB); verde: MTs; y rojo: huso mitótico. SPB: cuerpo polar del huso (Spindle Pole Body), EMTOC: centros organizadores de MTs ecuatoriales (equatorial MT organizing centre), PAA: distribución de MTs tras anaphase (Post-Anaphase Array). Adaptado de (Hagan, 1998).

### 2.3 Citoesqueleto de microtúbulos

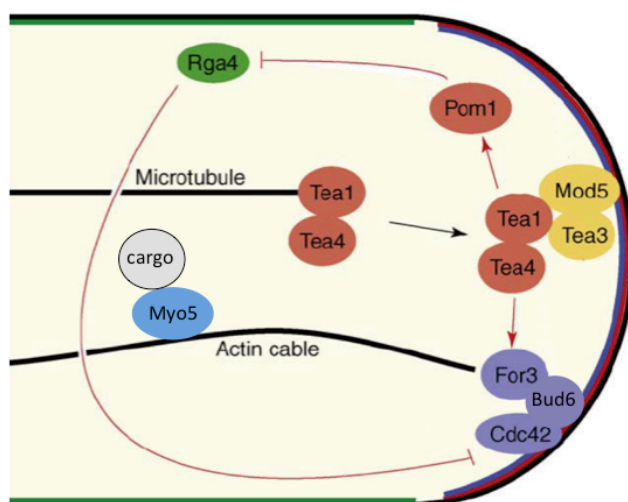
Los MTs y el transporte a través de los mismos contribuyen a la generación de un patrón de crecimiento polarizado, identificando los extremos celulares gracias a la distribución de unos determinantes o factores de polaridad que señalan dónde se producirá la nucleación de los filamentos de actina (Martin y Chang, 2003 y 2005). Además, el citoesqueleto de MTs es responsable de mantener el núcleo en la zona media de la célula determinando el sitio de la división celular (Chang y Verde, 2004; Huisman y Brunner, 2011; Martin, 2009) (Figura 5B).

Las células en interfase presentan entre tres y cinco haces de MTs que se extienden a lo largo del eje longitudinal de la célula. El extremo negativo de los MTs se extiende hacia el núcleo y contacta con la envuelta nuclear y los Centros Organizadores de Microtúbulos (MTOCs, de “Microtubule Organizing Centre”), mientras que el extremo positivo se dirige hacia los polos celulares (Drummond y Cross, 2000; Tran *et al.*, 2001).

Estos MTs se reorganizan al comienzo de la mitosis pasando a formar parte de una estructura intranuclear denominada huso mitótico, necesario para la segregación cromosómica. El huso mitótico se origina a partir del cuerpo polar del huso (SPB, de Spinde Pole Body) que previamente se ha duplicado en el núcleo. Al final de la anafase, coincidiendo con la formación del septo de división, se originan nuevos MTs formando un complejo central postanafásico (PAA, de Post Anaphase Array) (Hagan, 1998).

Los extremos positivos de los MTs guían a los marcadores de polaridad hacia el extremo de la célula, donde van a dirigir el crecimiento polarizado. El complejo Tea1p-Tea4p se ancla al córtex celular gracias a la interacción de Tea1p con Mod5p y Tea3p (Arellano *et al.*, 2002; Snaith y Sawin, 2003). Tea1p-Tea4p reclutan a la quinasa de la familia DYRK Pom1p, que inhibe la localización del GAP de Cdc42p Rga4p, permitiendo así la localización de Cdc42p activo en los polos de crecimiento. Tea1p-Tea4p también reclutan a la formina For3p y a la proteína reguladora Bud6p. La interacción de For3p-Cdc42-Bud6p y otras proteínas como la tropomiosina Cdc8p permite el ensamblaje de los cables de actina en los polos de crecimiento (Martin *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008; Rincón *et al.*, 2009) (Figura 6).

Se desconoce cómo Tea1p-Tea4p activan a Cdc42p. Tea4p se une a la fosfatasa Dis2p y ambas podrían promover la activación de Cdc42p y el crecimiento polarizado a través del reclutamiento del GEF de Cdc42p Gef1p y la exclusión del GAP de Cdc42 Rga4p de las zonas de crecimiento (Kokkoris *et al.*, 2014).



**Figura 6. Establecimiento del crecimiento polarizado.** El complejo Tea1p-Tea4p es transportado por los microtúbulos hacia el polo donde es anclado al córtex celular por Tea3p-Mod5p. En los polos celulares Tea1p-Tea4p recluta a la quinasa Pom1p que inhibe la localización del GAP Rga4p de Cdc42p, dirigiendo la activación localizada de Cdc42p en los polos de crecimiento. Tea4p también se une directamente a la formina For3p. Cdc42p activo junto con Bud6p activan a For3p, originando el ensamblaje polarizado de los cables de actina, que son usados como pistas para la distribución hacia los polos de vesículas con los componentes necesarios para el crecimiento celular. Adaptado de (Martin, 2009; Chang y

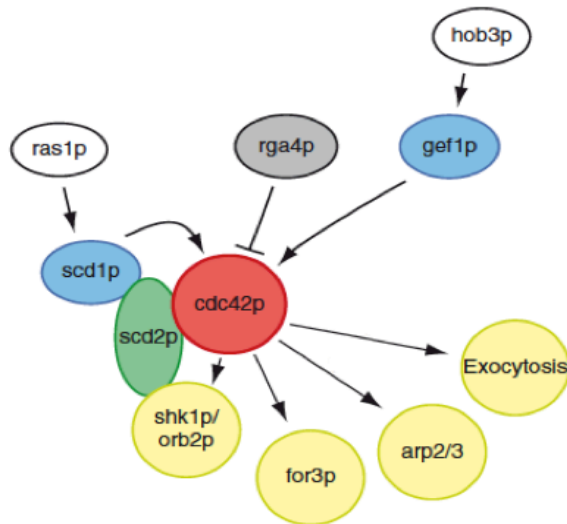
## 2.4 Cdc42p

Cdc42p es una GTPasa de la familia Rho, que ha sido ampliamente caracterizada como un regulador universal del crecimiento polarizado (Pérez y Rincón, 2010; Rincón *et al.*, 2014). Las GTPasas actúan como interruptores moleculares gracias a su habilidad para intercambiar GTP por GDP, pasando de un estado activo (unido a GTP) a otro inactivo (unido a GDP). Estas proteínas sólo pueden interactuar con sus proteínas efectoras cuando están unidas a GTP.

En la levadura de fisión, Cdc42p se localiza por toda la membrana plasmática, aunque es más abundante en las regiones de crecimiento activo, como los polos, el sitio de división, y en las membranas vacuolares (Estravís *et al.*, 2011). Cdc42p está controlada por la situación y actividad de sus proteínas reguladoras. Cdc42p es activada por las proteínas GEFs (Guanine Exchange Factor): Gef1p y Scd1p/Ral1p (Coll *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003) e inhibida por la proteína Rga4p con actividad GAP (GTPase-Activating Protein) (Tatebe *et al.*, 2008). Rga4p es excluida de los polos por la quinasa Pom1p, localizándose exclusivamente en los laterales de la célula, lo que permite la activación de Cdc42p exclusivamente en los extremos celulares (Hirota *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2007; Kelly y Nurse, 2011). Por tanto, Gef1p y Rga4p son responsables de regular la distribución y activación local de Cdc42p en los polos, lo que permite a las células modular el grado de polarización y el patrón de crecimiento celular.

Cdc42p en su forma activa interactúa con los siguientes efectores moleculares para dirigir el crecimiento polarizado (Figura 7):

- La formina For3p promueve la nucleación de la actina y la formación de cables que dirigen el crecimiento polarizado (Feierbach y Chang, 2001; Martin *et al.*, 2007).



**Figura 7. Módulo de Cdc42p.**  
Esquema de la ruta de señalización a través de Cdc42p en la levadura de fisión. Adaptado de (Chang y Martin, 2009).

-La quinasa Pak1p/Shk1p/Orb2p pertenece a las quinasas de tipo PAK (p21 activated kinase) de la familia Ste20. Es una proteína esencial para la viabilidad celular, el crecimiento polarizado y la morfogénesis, (Ottillie *et al.*, 1995). Participa en la polaridad celular mediante la fosforilación de Tea1p (Marcus *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2003; Attanapola *et al.*, 2009). También está implicada en la fosforilación de la miosina de tipo I Myo1p y de la cadena reguladora Rlc1p de las miosinas de tipo II (Loo y Balasubramanian, 2008), afectando a su localización y capacidad para asociarse con las estructuras corticales de actina, regulando así la endocitosis. Por último se ha descrito que Pak1p regula negativamente la distribución y activación de Cdc42p en los polos celulares (Das *et al.*, 2012).

-La quinasa Pak2p/Shk2p no es esencial y su ausencia no origina ningún fenotipo aparente. Pak2p interacciona con Cdc42p y podría ser funcionalmente redundante con Pak1p (Sells *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998).

-El complejo del exocisto contribuye a la regulación de la secreción polarizada. Es dirigido por Cdc42p hacia las zonas de crecimiento permitiendo el anclaje de las vesículas exocíticas a la membrana plasmática. Además, Cdc42p y su proteína adaptadora Pob1p, de manera coordinada con la GTPasa Rho3p, estarían encargadas de la regulación del tráfico de membranas, participando en el reciclaje endocítico y en la formación de las vacuolas (Wang *et al.*, 2002; Estravís *et al.*, 2011; Bendezú y Martin, 2011; Nakano *et al.*, 2011).

---

## 3. La pared celular

### 3.1 Composición

La pared celular es un elemento común en todas las células fúngicas que se encuentra ausente en las células de animales. Se trata de una estructura rígida, externa a la membrana plasmática, que proporciona a la célula protección mecánica y resistencia a la presión osmótica interna. A pesar de su rigidez, la pared celular es una estructura dinámica capaz de adaptarse a los cambios morfológicos que se producen durante el ciclo de vida de la célula fúngica (Durán y Pérez, 2004; Orlean, 2012; Cabib y Arroyo, 2013).

La pared celular en *S. pombe* representa del 15 al 25% del peso seco de la célula y está compuesta por polisacáridos y una pequeña cantidad de proteínas. Estudios mediante extracción con álcali, metilación, resonancia magnética nuclear y anticuerpos específicos revelan que la pared celular de *S. pombe* contiene cuatro tipos de glucanos:  $\alpha(1,3)$ -glucano,  $\beta(1,3)$ -glucano ramificado,  $\beta(1,3)$ -glucano lineal y  $\beta(1,6)$ -glucano además de las galactomanoproteínas (Manners y Meyers, 1977; Humbel *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003; Magnelli *et al.*, 2005).

#### 3.1.1 $\beta$ -glucano

El término  $\beta$ -glucano engloba los polisacáridos formados por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces  $\beta(1,3)$  o  $\beta(1,6)$ . Representan del 48-54% del contenido total de la pared, siendo el principal componente de la misma. En *S. pombe* se distinguen tres tipos de  $\beta$ -glucano:  $\beta(1,3)$ -glucano lineal (L-BG),  $\beta(1,3)$ -glucano ramificado (R-BG) formado por cadenas lineales de glucosas unidas mediante enlaces  $\beta(1,3)$  y con ramificaciones  $\beta(1,6)$ . El R-BG es el glucano más abundante de la pared y en la regeneración de la pared de células convertidas en protoplastos es el que primero se sintetiza, formando una matriz sobre la que se depositan el resto de componentes. El  $\beta(1,6)$ -glucano es un polímero muy ramificado constituido por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta(1,6)$  que contienen hasta un 43% de ramificaciones en  $\beta(1,3)$  (Osumi, 1998; Osumi *et al.*, 1998; Konomi *et al.*, 2003, Sugawara *et al.*, 2004).

#### 3.1.2 $\alpha$ -glucano

Es un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1,3)$  y con una pequeña proporción, hasta un 7%, de enlaces  $\alpha(1,4)$ . En *S. pombe* constituye casi un tercio de la pared (18-28%) y es esencial para la morfogénesis celular. Se ha comprobado que mutantes con menor contenido de  $\alpha$ -glucano adquieren forma redondeada. Además el tratamiento con  $\alpha$ -glucanasas genera protoplastos redondeados que no se consiguen al tratar las células con  $\beta$ -glucanasas (Manners y



Meyer, 1977; Alfa *et al.*, 1993; Grün *et al.*, 2005; Magnelli *et al.*, 2005).

### 3.1.3 Galactomanoproteínas

Representan del 9 al 14 % del total de los azúcares de la pared celular. Son polímeros de naturaleza glicoproteica. Su parte polisacáridica está formada por un esqueleto lineal de unidades de manosa con enlaces  $\alpha(1,6)$  al que se unen cadenas laterales de manosa con enlaces  $\alpha(1,2)$  o  $\alpha(1,3)$  y terminadas por un resto galactosa en los extremos no reductores (Bush *et al.*, 1974; Horisberger *et al.*, 1978; Magnelli *et al.*, 2005).

El galactomanano se encuentra unido a proteínas mediante enlaces covalentes N- y O-glicosídicos, dando lugar a las galactomanoproteínas. Las glicoproteínas se secretan al espacio periplásmico, uniéndose a los polisacáridos de la pared celular, tanto mediante enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, interacciones electrostáticas), como covalentes, mediante un residuo GPI (de “Glycosyl phosphatidyl inositol”) o proteínas PIR (de “Protein internal repeats”) (Pittet y Conzelmann, 2007; Ruíz-Herrera y Ortiz-Castellanos, 2010).

De acuerdo con las propiedades físico-químicas de estos polímeros el  $\alpha$ -glucano y el  $\beta$ -glucano lineal serían responsables de dotar de flexibilidad a la pared celular, mientras que el  $\beta$ -glucano ramificado proporcionarían la rigidez (Sugawara *et al.*, 2004; Cortés *et al.*, 2007).

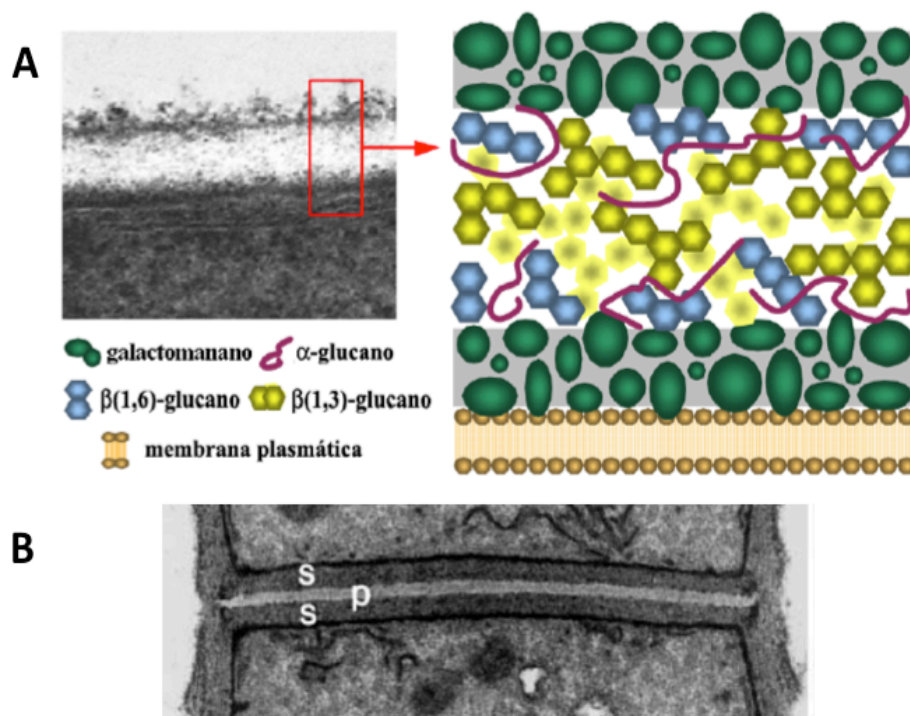
### 3.1.4 Quitina

Está formada por cadenas lineales de unos 190 residuos de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosamina que forman a su vez una estructura de doble hélice  $\alpha$  estabilizada por puentes de hidrógeno de manera similar a la celulosa, lo cual estaría de acuerdo con su papel como polímero estructural. En *S. cerevisiae* la quitina representa el 1-2% del total de la pared celular. Se localiza principalmente en el septo primario y en las cicatrices de gemación, aunque también hay una pequeña cantidad repartida a lo largo de la pared celular (Valdivieso *et al.*, 2004).

A pesar de que algunos autores han identificado residuos de glucosamina en la pared celular de *S. pombe* (Sietsma y Wessels, 1990), no se ha detectado la presencia de quitina ni en estudios de difracción de rayos-X, ni por tinción con la aglutinina del germen de trigo (WGA), una lectina que se une específicamente a la quitina (Horisberger *et al.*, 1978). La quitina parece estar presente en *S. pombe* es en las ascosporas y podría corresponder a quitosán, su forma desacetilada (Arellano *et al.*, 2000).

## 3.2 Arquitectura de la pared celular

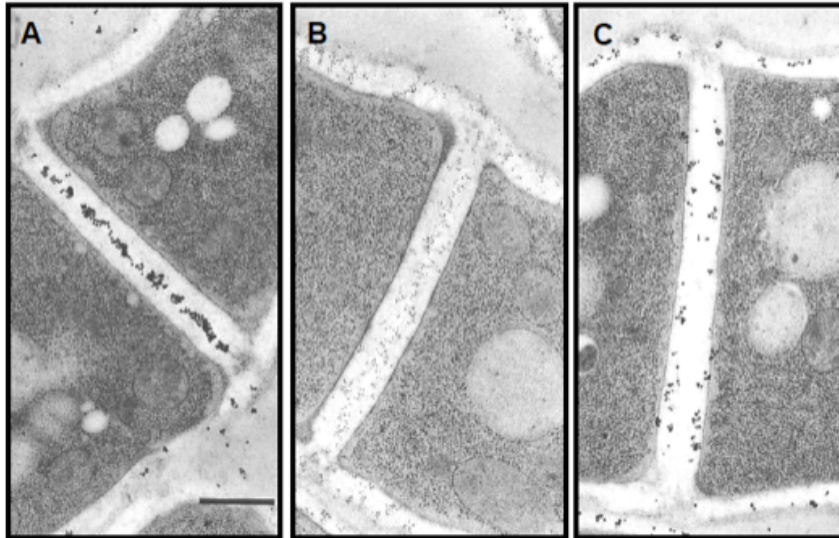
El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de la pared celular de *S. pombe* muestra una estructura trilaminar, con una capa central poco densa al paso de los electrones, compuesta principalmente por R-BG interconectado con el  $\alpha(1,3)$ -glucano y una pequeña proporción de  $\beta(1,6)$  glucano, flanqueada por dos capas más densas a los electrones formadas principalmente por galactomanoproteínas (Bush *et al.*, 1974; Hayes y Goldstein, 1974; Nicolson *et al.*, 1974; Manners y Meyer, 1977; Horisberger *et al.*, 1978; Kopecká *et al.*, 1995; Osumi, 1998; Grün *et al.*, 2005) (Figura 8).



**Figura 8. Ultraestructura de la pared celular de *S. pombe*.** (A) La pared celular consta de tres capas. La capa intermedia, menos densa a los electrones, está formada principalmente por  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos. Las capas externas, más densas a los electrones, son abundantes en galactomanoproteínas. (B) Ultraestructura del septo de división. La capa interna, menos densa a los electrones, forma el septo primario (p) y las capas situadas a ambos lados, más densas a los electrones, constituyen el septo secundario (s).

Mediante experimentos de inmunomicroscopía se ha podido detectar la presencia de los diferentes  $\beta$ -glucanos en la pared celular de *S. pombe*: el L-BG que se localiza en la región del septo primario y una muy pequeña cantidad en la pared celular, el R-BG se localiza por toda la pared celular y el septo, y el  $\beta(1,6)$ -glucano se distribuye por el septo secundario y la pared celular. En cuanto al  $\alpha(1,3)$ -glucano los anticuerpos utilizados no pudieron detectarlo excepto en zonas adyacentes a la membrana plasmática donde se llevaría a cabo su síntesis. El  $\alpha(1,3)$ -glucano no sólo se localiza en la pared celular, sino que también está presente en el septo secundario, ya que en su ausencia se producen septos carentes de septo secundario. Además, el hecho de que el  $\alpha(1,3)$ -glucano sea

esencial para formar un septo primario con la rigidez necesaria para soportar la presión de turgencia durante la separación celular, indica que el  $\alpha(1,3)$ -glucano también forma parte del septo primario (Humbel *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2012) (Figura 9).



**Figura 9. Inmunolocalización del  $\beta$ -glucano de la pared celular de *S. pombe*.** Detección de los distintos  $\beta$ -glucanos mediante inmunomicroscopía electrónica, utilizando distintos anticuerpos específicos conjugados con oro coloidal: (A)  $\beta(1,3)$ -glucano lineal, (B)  $\beta(1,3)$ -glucano ramificado, y (C)  $\beta(1,6)$ -glucano ramificado. Adaptado de (Humbel *et al.*, 2001).

## 4. Biosíntesis de los componentes de la pared celular y su regulación

### 4.1 Biosíntesis del $\beta$ -glucano

La biosíntesis del  $\beta(1,3)$ -glucano es catalizada por un complejo enzimático denominado  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa ( $\beta$ GS) (E.C.2.4.1.34, UDP-glucosa: (1,3)- $\beta$ -D-glucano-3- $\beta$ -gucanosiltransferasa). Este complejo emplea como sustrato UDP-glucosa, sintetizando en ensayos *in vitro* cadenas lineales de unos 70 residuos de glucosa con enlaces  $\beta(1,3)$ . El complejo enzimático  $\beta$ GS está constituido por al menos dos componentes: una subunidad catalítica y una subunidad reguladora (Kang y Cabib, 1986; Ribas *et al.*, 1991).

En *S. pombe* se han identificado cuatro posibles subunidades catalíticas del complejo  $\beta$ GS denominadas Bgs (de beta (1,3)-D-glucan synthesis), codificadas por los genes *bgs1<sup>+</sup>*, *bgs2<sup>+</sup>*, *bgs3<sup>+</sup>* y *bgs4<sup>+</sup>*. Todos estos genes son esenciales para la viabilidad celular durante el crecimiento vegetativo (*bgs1<sup>+</sup>*, *bgs3<sup>+</sup>* y *bgs4<sup>+</sup>*) o durante la fase de diferenciación sexual (*bgs2<sup>+</sup>*) (Liu *et al.*,

1999; 2000a; Martín *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007).

Todas las proteínas Bgs presentan una alta identidad entre sí (52-59%) y está muy conservada en todos los hongos y plantas, presentando una alta identidad (45-55%) con sus homólogas Fks de otros hongos y calosa sintasas CalS de plantas (Mazur *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). Las proteínas Bgs son proteínas integrales de membrana de alto peso molecular, que contienen 15-16 dominios transmembranales, agrupados en dos regiones hidrofóbicas, separadas por una región hidrofílica central. La secuencia de las proteínas  $\beta$ GS no muestra ninguna secuencia consenso que pueda sugerir la existencia de un sitio de unión a UDP-glucosa, como es el caso de la secuencia consenso de unión a UDP-glucosa típica de las celulosas sintasas de plantas y bacterias, aunque si presentan cierta homología con una secuencia conservada en las glucógeno sintasas, RXTG, descrita como posible sitio de unión a la UDP-glucosa (Inoue *et al.*, 1996; Ishiguro *et al.*, 1997) (Figura 10).

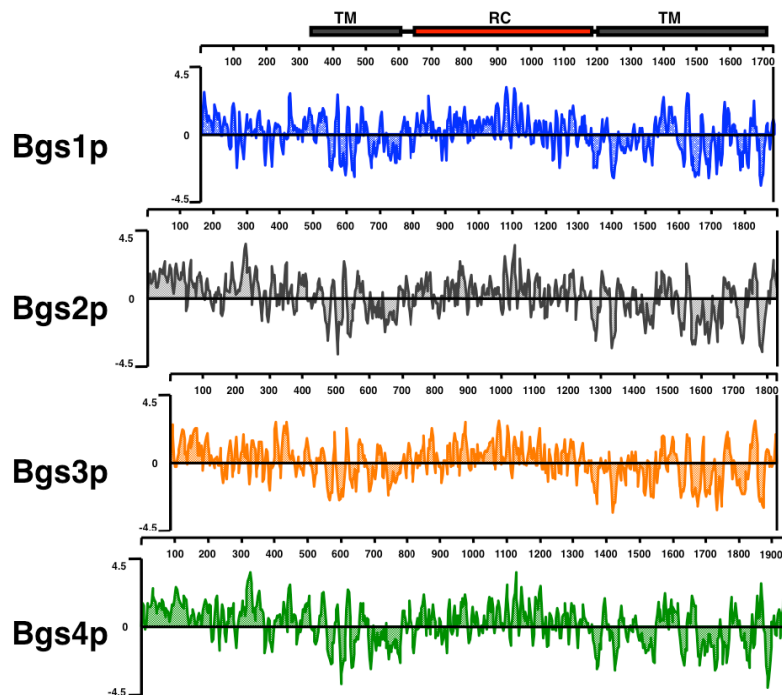


Figura 10. Perfiles hidropáticos de las proteínas Bgs de *S. pombe*. Perfiles obtenidos según las predicciones de (Kyte y Doolittle, 1982), indicando las hipotéticas regiones transmembranales (TM) y la región central hidrofílica (RC).

#### 4.1.1.1 Bgs1p/Cps1p

El gen *bgs1<sup>+</sup>* se clonó por primera vez mediante complementación del mutante termosensible *cps1-12* (clorprofam sensible), descrito como hipersensible al inhibidor del huso mitótico CIPC (isopropil N-3-clorofenil carbamato o clorprofam) y a los antifúngicos inhibidores de la  $\beta$ GS. Este mutante presenta un fenotipo en el que las células se hinchan y se lisan, y en presencia de sorbitol originan estructuras filamentosas ramificadas y con múltiples septos (Ishiguro *et al.*, 1997). Posteriormente también se clonó por complementación de dos

mutantes con distintos defectos en la formación del septo de división: *cps1-N12* y *cps1-191* (Le Goff *et al.*, 1999a; Liu *et al.*, 1999; 2000b).

Bgs1p es una proteína integral de membrana de 1729 aminoácidos con un peso molecular de 200 kDa, que se localiza en todas las zonas de crecimiento activo o remodelación de la pared celular durante el ciclo vegetativo y la diferenciación sexual (Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). A pesar del carácter esencial de *bgs1<sup>+</sup>*, las esporas *bgs1Δ* son capaces de germinar originando células gigantes y ramificadas con septos múltiples aberrantes que carecen de L-BG y de septo primario y además no se tiñen con CW. Estos datos demuestran que Bgs1p es responsable de la síntesis del L-BG, que a su vez es responsable de la formación del septo primario. También demuestran que el L-BG es el componente al que se une de manera específica y con alta afinidad el fluorocromo Calcofluor White (CW) y, por lo tanto, es responsable de la afinidad que presenta este fluorocromo por el septo en *S. pombe*. Sin embargo, el hecho de que en ausencia de Bgs1p existan más septos con L-BG que con septos primarios y que esta diferencia entre septos coincida con la aparición de deposiciones difusas de L-BG, indica que el L-BG es necesario, pero no suficiente para la formación del septo primario (Cortés *et al.*, 2007). Recientemente se ha mostrado que Bgs1p coopera con Pxl1p en la formación del septo de división. Pxl1p es un homólogo de la paxilina de células animales, cuya función es mantener la integridad del CAR durante la citocinesis. En ausencia de Pxl1p se inhibe la formación de los septos aberrantes observados durante la represión de *bgs1<sup>+</sup>*, lo que coincide con un desensamblaje prematuro del CAR y una deslocalización de las GS Ags1p y Bgs4p en la zona de división (Ge *et al.*, 2008; Pinar *et al.*, 2008, Cortés *et al.*, 2015).

La localización de Bgs1p en la zona media durante la citocinesis depende de la correcta formación del CAR y de la señal generada por la ruta de inicio de la septación (SIN, de Septation Initiation Network). Además se ha descrito que Cfh3p, que presenta una identidad significativa con la proteína reguladora Chs4p de la actividad quitín sintasa III de *S. cerevisiae*, participa en la localización de Bgs1p en la zona media en condiciones de estrés (Cortés *et al.*, 2002; Sharifmoghadam y Valdivieso, 2009). Recientemente se ha propuesto que la proteína F-BAR Cdc15p podría ser importante para el transporte de Bgs1p desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática en la zona media. El transporte de Bgs1p a las zonas de crecimiento depende del citoesqueleto de actina (cables de actina), la miosina de tipo V Myo52p y el complejo del exocisto (Mulvihill *et al.*, 2006; Estravís *et al.*, 2011; Bendezú y Martin, 2011; Arasada y Pollard, 2014).

### 4.1.1.2 Bgs2p

Bgs2p es una proteína integral de membrana de 1984 aminoácidos con un peso molecular de 219 kDa. La expresión de *bgs2<sup>+</sup>* se induce durante la esporulación y su proteína Bgs2p se encuentra localizada en la periferia de la ascospora (Martín *et al.*, 2000).

---

La ausencia de Bgs2p no produce ningún defecto en células vegetativas, pero su función es necesaria tanto para la correcta maduración de la pared de las ascosporas como para su viabilidad. Bgs2p es responsable de la actividad  $\beta$ GS de esporulación, ya que las ascas originadas de diploides *bgs2 $\Delta$ /bgs2 $\Delta$*  presentan esporas inviábiles y una actividad  $\beta$ GS reducida (Liu et al., 2000a; Martín *et al.*, 2000).

#### 4.1.1.3 Bgs3p

El gen *bgs3<sup>+</sup>* codifica una proteína integral de membrana de 1826 aminoácidos con un peso molecular de 211 kDa. Este gen se clonó a partir de la supresión del mutante *ehs2-1* (un alelo del gen *rgf3<sup>+</sup>*) hipersensible al antifúngico inhibidor de la  $\beta$ GS equinocandina (Carnero *et al.*, 2000). Bgs3p es esencial y presenta un patrón de localización similar al de Bgs1p, siempre asociada a zonas de crecimiento y formación de nueva pared celular. La represión de *bgs3<sup>+</sup>* origina células ovaladas e hinchadas, pero no afecta a la actividad  $\beta$ GS o los niveles de  $\beta$ -glucano en la pared celular, por lo que aún no se conoce el papel de Bgs3p (Martin *et al.*, 2003).

#### 4.1.1.4 Bgs4p

El gen *bgs4<sup>+</sup>* fue identificado a partir de los datos obtenidos de la secuenciación del genoma de *S. pombe*, donde se pudo identificar un nuevo gen cuya secuencia proteica tenía una alta identidad con las proteínas Bgs/Fks. También contribuyó a su caracterización los estudios de complementación génica realizados con diferentes mutantes de *bgs4<sup>+</sup>*: *cwg1-1* y *cwg1-2* que presentan un defecto en la síntesis del  $\beta$ (1,3)-glucano de la pared celular; *orb11-59* con defectos en la integridad celular y la morfogénesis; y *pbr1-6* y *pbr1-8* que presentan resistencia a antifúngicos inhibidores específicos de la actividad  $\beta$ GS papulacandina B y aculeacina A (Castro *et al.*, 1995; Cortés *et al.*, 2005; Verde *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 2011).

El gen *bgs4<sup>+</sup>* codifica una proteína integral de membrana de 1955 aminoácidos con un peso molecular de 225 kDa. Bgs4p es una proteína esencial y a través del estudio de la represión de *bgs4<sup>+</sup>* se ha comprobado que es el responsable mayoritario de la actividad  $\beta$ GS *in vitro* y del R-BG de la pared celular *in vivo*. Bgs4p también es responsable de la sensibilidad a inhibidores específicos de la actividad  $\beta$ GS *in vivo* e *in vitro*. Bgs4p se localiza en los mismos sitios que Bgs1p, aunque en un momento ligeramente posterior. Su localización depende de la correcta formación del CAR y es independiente de la señal generada por la ruta SIN cuando los septos ya se han iniciado (Ribas *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1995; Cortés *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2011).

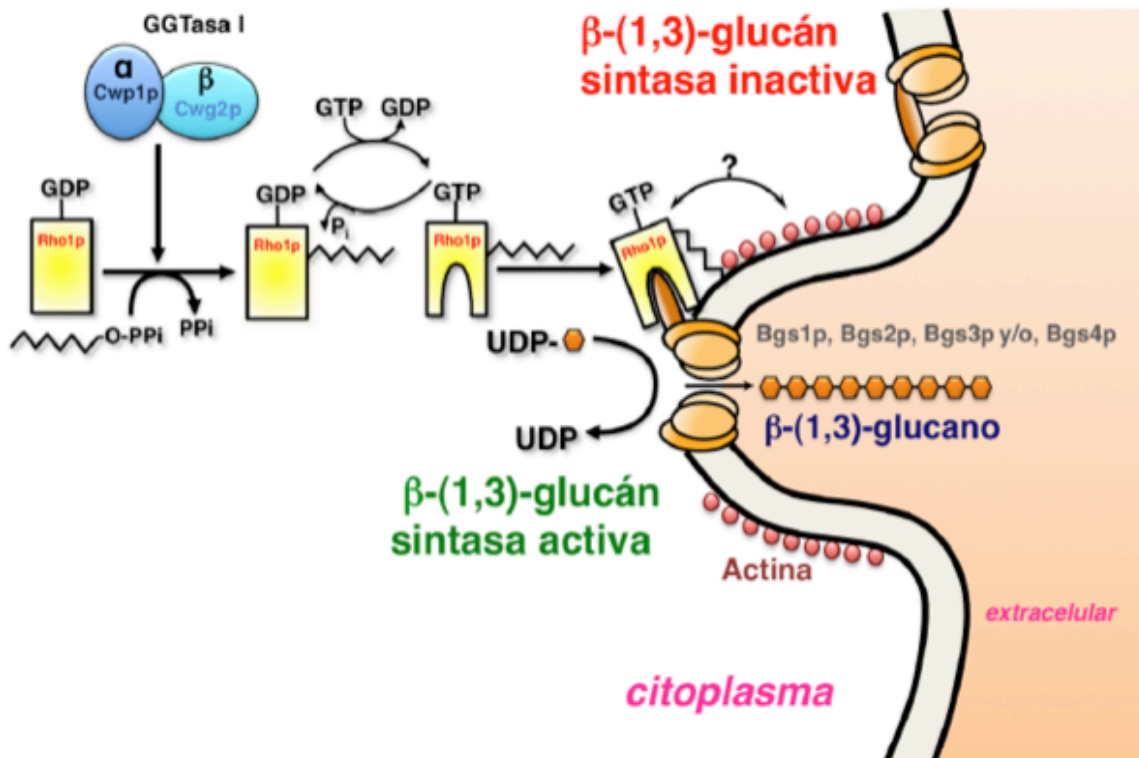
El análisis de células carentes o afectadas en la función de Bgs4p muestra que el R-BG sintetizado por Bgs4p es necesario para anclar y mantener al CAR posicionado en el medio de la célula durante el inicio de la citocinesis, antes de que el CAR empiece a cerrarse y se detecte la síntesis del septo. Además, el R-BG de Bgs4 es necesario para mantener acoplada la síntesis del septo con la contracción del CAR y la deposición de membrana plasmática. En ausencia de Bgs4p se observa que la síntesis del septo está retrasada respecto al cierre del CAR y la membrana plasmática, lo que sugiere que la fuerza de empuje del septo no es necesaria para la contracción del CAR y la invaginación de membrana plasmática. Además, el R-BG también es importante para la correcta formación del septo primario en sus etapas finales (Muñoz *et al.*, 2013).

Las células animales no tienen una pared celular rígida, pero poseen una matriz extracelular externa, que es una estructura funcionalmente análoga a la pared celular. La matriz extracelular está compuesta por proteínas y polisacáridos, algunos de los cuales se han descrito como críticos para la citocinesis, lo que refuerza su similitud funcional con la pared celular y el papel del R-BG en la unión de la pared al CAR (Mizuguchi *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2011; Xu y Vogel, 2011; Muñoz *et al.*, 2013).

Bgs4p y el R-BG que sintetiza son responsables de la formación del septo secundario, lo cual resulta crítico a la hora de mantener la integridad celular durante el proceso de separación celular, además de conferir al septo de división la rigidez necesaria para soportar los cambios en la presión de turgencia que se producen entre las células hermanas. Bgs4 también es esencial para mantener la integridad celular durante el crecimiento polarizado (Muñoz *et al.*, 2013). Recientemente se ha demostrado la participación de Rga7p, una proteína con actividad GAP (GTPase Activating Protein) in vivo para Rho2, en el correcto transporte de Bgs4p desde los polos y desde vesículas del Golgi a la zona media y permitir así la correcta formación del septo de división (Martín-García *et al.*, 2014; Arasada y Pollard, 2015).

### 4.1.2 Regulación de la biosíntesis del $\beta$ -glucano

La subunidad reguladora de la actividad  $\beta$ GS es la GTPasa Rho1p (de “Ras homology”), la cual está conservada en hongos y plantas (Arellano *et al.*, 1996; Mazur y Baginsky, 1996; Qadota *et al.*, 1996). El modelo de activación del complejo  $\beta$ GS implica que Rho1p debe encontrarse en su estado activo, unido a GTP y prenilado, lo que permite su anclaje a la cara interna de la membrana plasmática e interactuar así con la subunidad catalítica de la actividad  $\beta$ GS (Drgonova *et al.*, 1996) (Figura 11). Rho1p se localiza en los sitios de crecimiento activo y la sobreexpresión de *rho1<sup>+</sup>* origina células con paredes engrosadas y defectos en separación celular mientras que su represión provoca una reducción de la actividad  $\beta$ GS (Nakano *et al.*, 1997).



**Figura11. Modelo de la activación del complejo  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa.** 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 enzima en dos componentes: la GTPasa Rho1p, subunidad reguladora encargada de la activación del enzima, y la subunidad catalítica, formada por la familia de proteínas Bgs. La GTPasa Rho1p debe ser prenilada por el heterodímero formado por Cwp1p y Cwg2p, para poder anclarse a la membrana plasmática. Adaptado de (Drgonova *et al.*, 1999).

El complejo  $\beta$ GS también está regulado de manera indirecta por las quinasas Pck1p y Pck2p, que participan en el mantenimiento de la integridad celular, y cuya eliminación genera defectos relacionados con la biosíntesis de la pared celular (Arellano *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 2013; Sanchez-Mir *et al.*, 2014).

Rho1p también regula procesos como la organización del citoesqueleto de actina o el inicio de los sitios de crecimiento celular que determinan la morfología celular (Arellano *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997), por lo que necesita estar altamente regulada en la célula. Como reguladores positivos de esta GTPasa se han descrito los GEFs: Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p (Tajadura *et al.*, 2004; García *et al.*, 2006b; García *et al.*, 2009). Como reguladores negativos o GAPs se han identificado: Rga1p, Rga5p y Rga8p (Nakano *et al.*, 2001; Calonge *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Pérez y Rincón, 2010).



### 4.2.1 Biosíntesis del $\alpha$ -glucano

El  $\alpha$ -glucano, junto con el L-BG, son los dos únicos polímeros que no se encuentran en las paredes de *S. cerevisiae* y otras levaduras de gemación, pero están presentes en *S. pombe* y diversos hongos patógenos dimórficos y filamentosos (Edwards *et al.*, 2011; Henry *et al.*, 2012). Aunque todavía no se ha descrito una actividad enzimática  $\alpha(1,3)$ -glucán sintasa 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  $\alpha$ -glucán sintasas y que se han denominado *ags* (de alpha-glucan synthase) o *mok* (de morphological y kinase inhibitor supersensitive): *ags1<sup>+</sup>/mok1<sup>+</sup>*, *mok11<sup>+</sup>*, *mok12<sup>+</sup>*, *mok13<sup>+</sup>* y *mok14<sup>+</sup>*. De todos estos genes solamente *ags1<sup>+</sup>* sería esencial durante el crecimiento vegetativo. El resto participa en el proceso de esporulación con distinta importancia en cada caso para la correcta maduración de las esporas (García *et al.*, 2006a).

La proteína Ags1p/Mok1p es esencial ya que es responsable de la biosíntesis del  $\alpha$ -glucano durante el crecimiento vegetativo. Codifica una proteína integral de membrana de 2410 aminoácidos y un peso molecular de 271 kDa. Se trata de una proteína esencial para el mantenimiento de la viabilidad y la integridad celular (Hochstenbach *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999). Recientemente se ha descrito que Ags1 se colocaliza con Bgs1 en los sitios de crecimiento activo de la célula: polos, CAR y septo de división, lo que sugiere la colaboración de ambas proteínas desde los estadios iniciales de la síntesis del septo. Se ha demostrado que el  $\alpha(1,3)$ glucano es responsable como el R-BG de la formación del septo secundario. Además, el  $\alpha(1,3)$ glucano también forma parte del septo primario ya que es esencial para dotar al septo primario de la fuerza estructural necesaria para soportar la fuerza generada por la presión de turgencia de la célula durante la separación celular (Cortés *et al.*, 2012).

A pesar de que Ags1p y Bgs1p tienen una función muy ligada durante la formación del septo, algunos requerimientos para su localización en la célula son diferentes. Ambos necesitan un CAR correctamente ensamblado. Sin embargo, a diferencia de Bgs1p, Ags1p no necesita la ruta SIN para su localización en la zona media durante la citocinesis.

### 4.2.2 Regulación de la biosíntesis del $\alpha$ -glucano

La regulación de la función de Ags1p depende de la quinasa Pck2p y la GTPasa Rho2p. Ambas son necesarias para la función y correcta localización de Ags1p (Katayama *et al.*, 1999). La sobreexpresión de cualquiera de ellas provoca un aumento del  $\alpha$ -glucano en la pared celular lo que resulta letal para la célula. Al igual que Rho1p, Rho2p es necesaria para el mantenimiento de la integridad y la morfología celular. Sin embargo, el hecho de que la delección de *ags1<sup>+</sup>/mok1<sup>+</sup>* sea letal, pero no la de sus proteínas reguladoras, sugiere la existencia de mecanismos alternativos para su activación (Arellano *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1993; Calonge

---

*et al.*, 2000; Barba *et al.*, 2008; Sánchez-Mir *et al.*, 2014).

### 4.3 Biosíntesis de las galactomanoproteínas

Las glicoproteínas que son secretadas y se incorporan a la pared celular experimentan durante la ruta secretora un proceso de maduración mediante N- y O-glicosilaciones, iniciándose en el retículo endoplásmico (RE) y completándose en el aparato de Golgi. En el RE se añaden las unidades de manosa, dando lugar a cadenas cortas unidas a residuos de serina o treonina mediante enlaces O-glicosídicos o cadenas más largas unidas a residuos de asparragina mediante enlaces N-glicosídicos. La adición de galactosa y la modificación de las cadenas de manosa, se produce posteriormente en el aparato de Golgi (Ballou *et al.*, 1994; Gemmil y Trimble, 1999; Gemmill y Trimble, 2004).

Mientras que el gen *och1<sup>+</sup>* codifica la enzima N-manosil transferasa, se ha comprobado que existen varios genes *oma* que codifican O-manosil-transferasas en *S. pombe* cuya falta de actividad en la célula origina un descenso de O-manosilación que provoca defectos graves en la pared celular y en la formación del septo (Ohashi *et al.*, 2010; Willer *et al.*, 2005).

### 4.4 Biosíntesis de la quitina

En *S. pombe* se han descrito dos genes, *chs1<sup>+</sup>* y *chs2<sup>+</sup>*, que codifican proteínas con una alta identidad con las quitín sintasas de otros hongos. Chs1p sólo se detecta durante la fase sexual, es responsable de una pequeña actividad quitín sintasa detectada *in vitro* y de la síntesis de la capa de quitina o quitosán necesaria para la maduración de las ascosporas (Arellano *et al.*, 2000).

Chs2p carece de los residuos considerados como el dominio catalítico de la actividad quitín sintasa y la sobreexpresión o delección de *chs2<sup>+</sup>* tampoco afectan a la actividad quitín sintasa *in vitro* (Martín-García *et al.*, 2003). Chs2p interviene en el mantenimiento de la integridad estructural del CAR durante las últimas etapas del proceso de contracción (Martín-García y Valdivieso, 2009).

## 5. La citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe*

La citocinesis es la etapa final del ciclo celular donde, después de la duplicación y segregación del material genético, se construye la barrera física que divide el citoplasma, originando dos células hermanas independientes. La citocinesis en la levadura de fisión, al igual que en el resto de células de hongos y en las células animales, depende del ensamblaje de un CAR. En la célula fúngica la

contracción del CAR está acoplada con la deposición del septo de división y coordinada con la mitosis, comenzando al final de la anafase, cuando se ha producido la segregación del material genético (Sipiczki, 2007; Bathe y Chang, 2010; Laporte *et al.*, 2010; Goyal *et al.*, 2011; Kovar *et al.*, 2011).

Se ha descrito que al menos 70 proteínas participarían en el proceso de formación del septo, entre las que se incluyen las proteínas del CAR, las enzimas encargadas de la síntesis de la pared del septo, GTPasas, las septinas y la proteína Mid2p relacionada con septinas, y toda una batería de proteínas que forman parte de la maquinaria encargada del tráfico de membranas y que contribuyen no solo a la formación del septo sino también a su posterior degradación (Pollard, 2010).

En *S. pombe* la citocinesis se divide en las siguientes etapas: 1) selección del sitio de división, 2) ensamblaje del CAR, 3) contracción del CAR, deposición de material de membrana y síntesis del septo y 4) separación celular.

### 5.1 Selección de sitio de división

La posición del futuro sitio de división depende principalmente de la posición del núcleo a través de Mid1p, una proteína relacionada con la anilina de metazoos (Sohrmann *et al.*, 1996; Paoletti y Chang, 2000; Daga y Chang, 2005). Durante interfase Mid1p se localiza en el núcleo y al final de G<sub>2</sub> y comienzo de la mitosis se moviliza al córtex celular, donde recluta a diferentes componentes del CAR para ensamblar un anillo (Motegi *et al.*, 2004). Plo1p fosforila a Mid1p al comienzo de mitosis, lo que promueve su salida del núcleo (Almonacid *et al.*, 2011; Bähler y Pringle, 1998), mientras que Pom1p, Tea1p y Tea4p evitan la acumulación de Mid1p en los polos de la célula, generando un gradiente de señales negativas que evita la formación de septos ectópicos o desplazados hacia los polos (Celton-Morizur *et al.*, 2006; Padte *et al.*, 2006; Rincón *et al.*, 2014; Oliferenko *et al.*, 2009; Almonacid y Paoletti, 2010).

### 5.2 Ensamblaje del CAR

Se han propuesto dos modelos diferentes de ensamblaje del CAR (Figura 12):

-El modelo de cable líder (Hachet y Simanis, 2008; Huang *et al.*, 2008) se propuso al observar que en ausencia de Mid1p todavía se ensambla el CAR siempre y cuando las células mantengan una ruta SIN funcional. Estos anillos pueden ensamblarse con una localización ectópica y mal orientados, dando lugar a septos aberrantes. Este modelo propone que el CAR se ensambla a partir de un único nodo en el córtex celular de Cdc12p que, a modo de centro organizador, genera uno o dos cables paralelos de actomiosina que crecen perpendicular al eje longitudinal de la célula hasta formar un anillo alrededor de la célula (Chang *et al.*,

1997; Chang, 1999; Kamasaki *et al.*, 2007).

Durante anafase B el CAR madura aumentando la concentración de proteínas como Cdc15p e incorporando otras como la miosina de tipo II Myo3p/Myp2p, la cofilina Adf1p, Acp1p, Acp2p, el complejo Arp2p/3p, Myo1p, Wsp1p, etc. (Wu y Pollard, 2005).

-El modelo de nodos o SCPR (de “search, capture, pull y release”) (Wu *et al.*, 2006; Vavylonis *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012), se basa en la dinámica de aparición de diferentes componentes en la zona media. Antes de la entrada en mitosis la banda cortical de Mid1p en la zona media recluta a diferentes componentes del CAR: la proteína IQGAP Rng2p, necesaria para la organización de los nodos en la zona media; la miosina de tipo II Myo2p y sus cadenas ligera Cdc4 y reguladora Rlc1, el factor Rng3p; la proteína con dominios F-BAR Cdc15p y la formina Cdc12p. Estas proteínas forman una banda cortical de nodos que se va a condensar en un anillo a lo largo de la mitosis gracias a la ayuda de la F-actina, la tropomiosina Cdc8p y la fimbrina Ain1p (Motegi *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003; Gachet *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Coffman *et al.*, 2009; Padmanabhan *et al.*, 2011; Laporte *et al.*, 2011). Después se produce la polimerización de filamentos de actina por la actividad de la formina Cdc12p y la aproximación de los nodos entre sí por la actividad motora de Myo2p. En caso de pérdida de actividad nucleadora de Cdc12, la formina For3p puede llevar a cabo la síntesis de los filamentos de actina necesarios para la formación del CAR y permitir que las células completen la citocinesis (Coffman *et al.*, 2013).

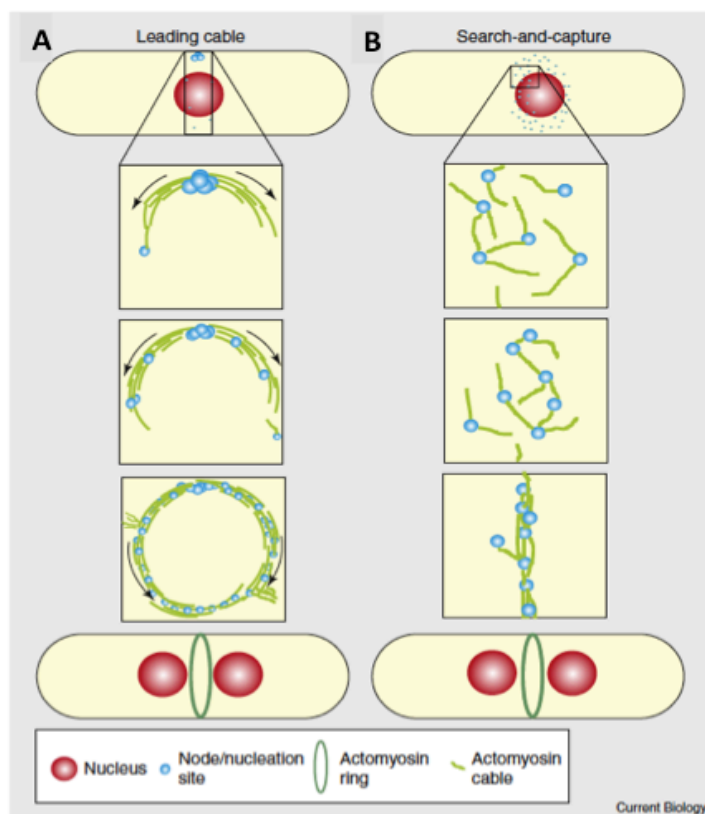


Figura 12. Modelos del mecanismo de ensamblaje del anillo contráctil en *S. pombe*. (A)

El modelo del “cable líder” implica que el anillo se ensambla a partir de un cable de actomiosina que se origina en un sitio de nucleación discreto y se extiende en ambas direcciones. (B) El modelo denominado de “búsqueda y captura” o SCPR (“search capture pull and release”) supone que el ensamblaje tiene lugar en múltiples nodos en la zona media, que se conectan con filamentos de actomiosina hasta condensar un CAR maduro y compacto. Adaptado de (Mishra y Oliferenko,

Cdc15p es esencial para la citocinesis y necesaria para el reclutamiento en la zona media de Cdc12p y Myo1p, en el que el dominio F-BAR del extremo N-terminal juega un papel importante. En ausencia de Cdc15p o en mutantes donde la interacción Cdc15p-Cdc12p está afectada se observa un retraso en la formación del CAR y provoca que las células presenten una mayor sensibilidad a las perturbaciones que afectan a su ensamblaje. (Willet et al., 2015b).

Tanto la forma Cdc12p como el complejo Arp2p/3p regulado por Myo1p promueven la nucleación de actina y participarían en la formación del CAR. Aunque el complejo Arp2p/3p, no es necesario para la formación del anillo *per se*, es necesario para su correcta maduración y procesos posteriores, tales como la contracción del CAR y síntesis de la membrana y pared del septo (Lee et al., 2000; Carnahan y Gould, 2003; Sirotkin et al., 2005; Wu et al., 2006)

### 5.3 Mantenimiento del CAR en la zona media

Recientemente se ha propuesto Cdc15p participa en el mantenimiento del CAR en la zona media a través del transporte de la  $\beta$ GS Bgs1p desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática de la zona media. De acuerdo a esta hipótesis, cuando se reduce la función de Cdc15p se produce un retraso en la aparición de Bgs1p en la zona media, lo que induciría el deslizamiento del CAR por la superficie celular (Arasada y Pollard, 2015). Alternativamente, se ha propuesto que este retraso de Bgs1p se debe a un retraso en la formación del CAR en presencia de una versión de Cdc15p no funcional (Roberts-Galbraith, 2009; Willet et al. 2015a).

Ya que células tratadas con la equinocandina Aculeacina A no se observa desplazamiento del CAR se ha propuesto que la actividad  $\beta$ GS de Bgs1p es dispensable para el mantenimiento del CAR (Arasada y Pollard, 2015). Sin embargo, a parte de que en *S. pombe* existen otras dos  $\beta$ GS, Bgs3p y Bgs4p, que son esenciales para la viabilidad la célula, parece que Bgs1p es intrínsecamente resistente a los inhibidores de la actividad  $\beta$ GS, por lo que un tratamiento con Aculeacina A inhibiría la actividad debida a Bgs4p (Martins et al., 2011)

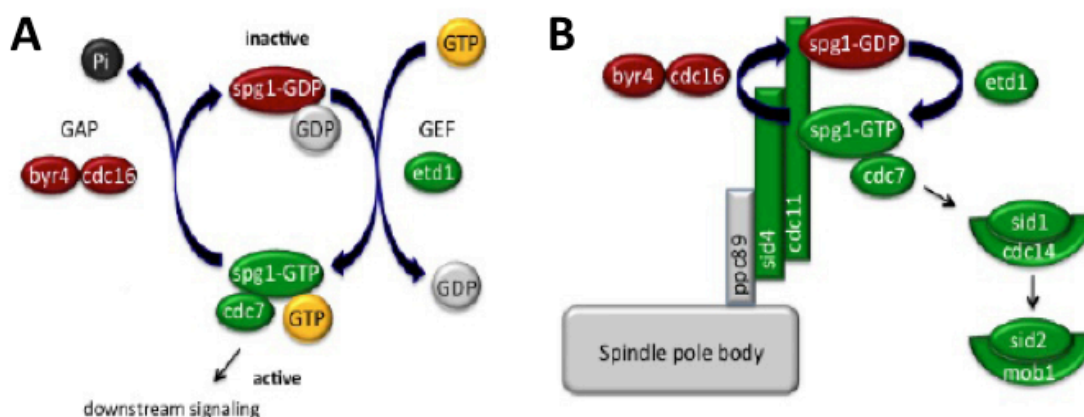
En ausencia de la paxilina Pxl1p, cuya localización en el CAR depende de Cdc15p (Ge et al., 2008; Pinar et al., 2008; Roberts-Galbraith, 2009), se observa que el CAR se desplaza lateralmente incluso en presencia de Bgs1p y Ags1p, deteniéndose a la vez que se detecta por primera vez la síntesis de L-BG del septo primario, lo que sugiere que la actividad de Bgs1p podría ser importante para la estabilización del CAR en la zona media. De acuerdo a esta observación, en el mutante *cps1-191* el CAR tampoco se mantiene de forma estable en el medio de la célula (Arasada y Pollard, 2014; Cortés et al., 2015). De forma similar, el R-BG sintetizado por Bgs4p también es importante para el mantenimiento estable del CAR en la zona media (Muñoz et al., 2013).

## 5.4 La ruta SIN

La coordinación entre la mitosis y el proceso de contracción del anillo y síntesis del septo está regulada por una ruta de señalización denominada ruta de activación de la septación (SIN, de “Septation Initiation Network”) (Simanis V., 2015) (Figura 13). La proteína principal implicada en la señalización de la ruta SIN es una GTPasa de la familia Ras denominada Spg1p (de “Septation promoting GTpase”). Esta proteína es esencial y su ausencia origina células multinucleadas que son incapaces de formar un CAR estable y por tanto, tampoco pueden sintetizar el septo (Schmidt *et al.*, 1997). De acuerdo a esto, la inactivación de la ruta SIN origina células alargadas y multinucleadas sin septos, mientras que su activación ectópica origina células con múltiples septos sin las correspondientes divisiones nucleares (Nurse *et al.*, 1976; Minet *et al.*, 1979; Fankhauser y Simanis, 1994; Schmidt *et al.*, 1997).

Los elementos centrales de la ruta SIN consisten en una cascada de proteínas quinasa y sus subunidades reguladoras: la quinasa Cdc7p (de “Cell división cycle”) de la familia STE11/MEKK (Fankhauser y Simanis, 1994; Schmidt *et al.*, 1997; Mehta y Gould, 2006), la quinasa Sid1p (de “Septum initiation defective”) de tipo GCK de la familia Ste20, su subunidad reguladora Cdc14p (Fankhauser y Simanis, 1993; Guertin *et al.*, 2000; Guertin y McCollum, 2001), la quinasa Sid2p de la familia NDR, y su subunidad reguladora Mob1p (de “Mps one binder”) (Sparks *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2000; Salimova *et al.*, 2000).

La señal que desencadena el inicio de la septación está mediada por la GTPasa Spg1p (Schmidt *et al.*, 1997). Se ha descrito que el complejo formado por Cdc16p y Byr4p actúa como un GAP regulando el estado de activación de Spg1p



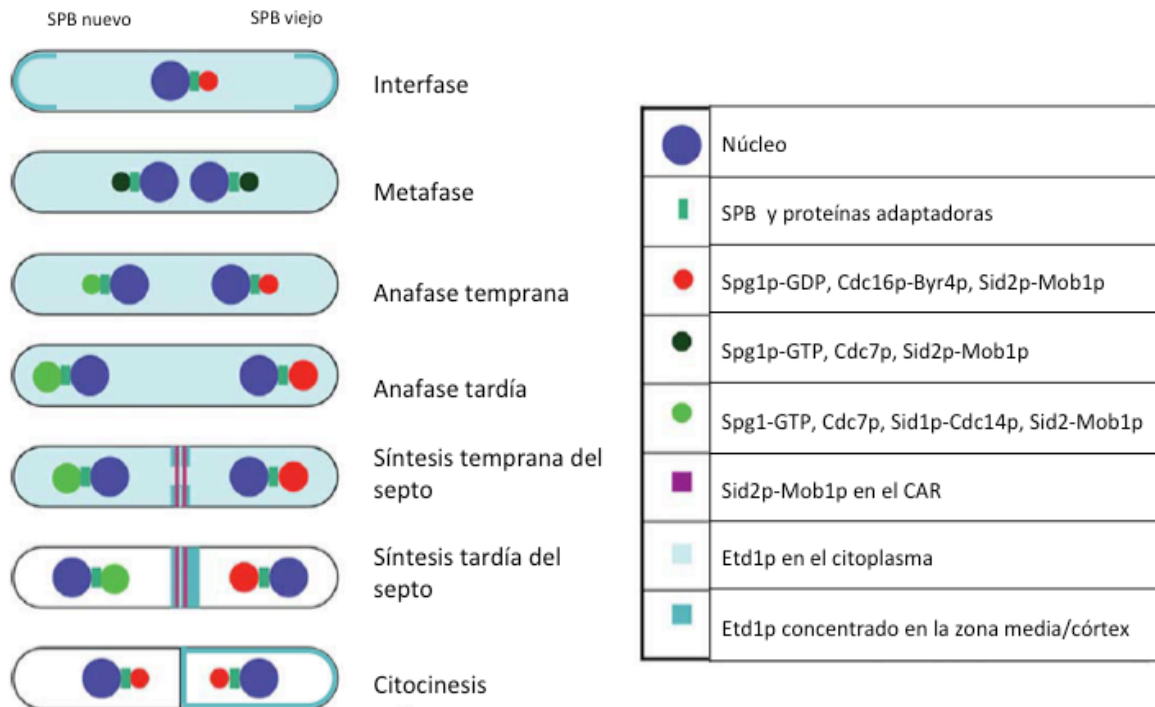
**Figura 13. Ruta de inicio de la septación o SIN (Septation Initiation Network).** (A) Regulación de Spg1p. La GTPasa Spg1p es activa unida a GTP, y está regulada por el complejo GAP Byr4p-Cdc16p y el probable GEF Etd1p. (B) El núcleo central de la ruta se ancla al SPB gracias al complejo de proteínas adaptadoras Pcp89p-Sid4p-Cdc11p. En el esquema se muestran los reguladores esenciales, en verde los activadores y en rojo los represores. Adaptado de (Goyal *et al.*, 2011).

(Song *et al.*, 1996; Furge *et al.*, 1998; Furge *et al.*, 1999; Cerutti y Simanis, 1999; Krapp *et al.*, 2008). Etd1p es un regulador positivo de la actividad de Spg1, por lo que se ha sugerido que puede ser el GEF de esta GTPasa (Daga *et al.*, 2005; García-Cortés y McCollum, 2009). Un conjunto de proteínas de tipo coiled-coil forman un complejo adaptador que facilita la localización de los componentes del SIN en el SPB: Ppc89p (de "*pombe pole component*"), Sid4p y Cdc11p (Chang y Gould, 2000; Krapp *et al.*, 2001; Tomlin *et al.*, 2002; Morrell *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2006).

### 5.4.1 Localización de los componente de la ruta SIN

El SPB sirve de punto de asociación para los componentes de la ruta SIN (excepto Etd1p), bien de manera constitutiva o transitoria a lo largo ciclo celular (Balasubramanian *et al.*, 2004a; Wolfe y Gould, 2005; Krapp y Simanis, 2008; Lattmann *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2011). Basándose en relaciones de epistasia, localización y ensayos de fosforilación, se ha establecido una activación lineal de la ruta SIN: La ruta es activada por el regulador mitótico Plo1p probablemente inhibiendo el complejo GAP Cdc16p-Byr4p, lo que permite la activación de la GTPasa Spg1p (Tanaka *et al.*, 2001). Cdc7p es el efector de Spg1p, al que se une en su forma unida a GTP y lo recluta al SPB (Fankhauser y Simanis, 1994). Cdc7p activa al complejo Sid1p-Cdc14p y éste a Sid2p-Mob1p (Guertin *et al.*, 2000). Las subunidades reguladoras Cdc14p y Mob1p son esenciales para la correcta localización de las quinasas y en el caso de Sid2p, también para regular su actividad quinasa. Finalmente, Sid2p es la encargada de transmitir la señal para iniciar la contracción del CAR y la síntesis del septo. Entre los efectores de Sid2p se encuentran: el adaptador de la ruta SIN Cdc11p, la fosfatasa Flp1p/Clp1p implicada en controlar la dinámica de Cdc15p y Myo2p en el CAR (Chen *et al.*, 2008; Clifford *et al.*, 2008; Feoktistova *et al.*, 2012), la quinasa NDR Nak1p y su proteína adaptadora Sog2p de la ruta de morfogénesis (MOR) (Gupta *et al.*, 2013) y el GEF Rgf1p de Rho1p, implicado en la coordinación de la biosíntesis de la pared celular y el establecimiento del crecimiento bipolar (NETO) (Mutoh *et al.*, 2005; García *et al.*, 2006b; Gupta *et al.*, 2013) (Figura 14).

La distribución de algunas proteínas de la ruta SIN a lo largo del ciclo celular no es constante en ambos SPB sino que se establece de manera asimétrica (Johnson *et al.*, 2012b). Dicha asimetría se establece durante la anafase B y se cree que la inactivación de la quinasa Cdc2p mediada por el complejo GAP Cdc16p-Byr4p es determinante. Recientemente se ha descrito que la actividad Cdc2p regula también la localización de Byr4 en el SPB mediante fosforilación (Dischinger *et al.*, 2008; Guertin *et al.*, 2000; Rachfall *et al.*, 2014). Sid2p también es necesaria para la asimetría fosforilando a la proteína adaptadora Cdc11p, y regulando a otros componentes como Cdc7p o la propia Sid2p, a modo de retroalimentación positiva de la ruta (Feoktistova *et al.*, 2012).



**Figura 14. Esquema de la localización de las proteínas de la ruta SIN durante la mitosis y citocinesis.** Todas las proteínas de la ruta SIN excepto Etd1p se localizan en el SPB en alguna etapa del ciclo celular. El tamaño de los círculos asociados al SPB representa la intensidad de la proteína correspondiente. No se muestran las proteínas reguladoras. Adaptado de (García-Cortés y McCollum, 2009; Lattmann *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2011).

El posible GEF de la ruta SIN Etd1p tiene un papel dual activando la ruta SIN durante la anafase e inactivándola al final de la septación. Debido a su localización en la zona media durante la citocinesis, inicialmente se propuso que Etd1p comunica el CAR con la ruta SIN. Sin embargo, esta proteína presenta un patrón de localización complejo: en interfase se encuentra en los polos, pero durante la anafase desaparece del córtex celular, aumentando en el citoplasma y el sitio de división. Coincidiendo con el cierre del septo, Etd1p adopta una localización asimétrica, desapareciendo de la célula que presenta la ruta SIN activa (Cdc7 presente en el SPB) y aumentando en la que tiene la ruta inactiva (Cdc7 ausente del SPB). Debido a estas observaciones y la inactivación defectuosa de la ruta SIN en células con Cdc7p en los dos SPBs o con niveles más altos de Etd1p se ha propuesto que la distribución asimétrica de las proteínas de la ruta SIN es importante para inactivar la ruta una vez que se ha completado la citocinesis y prevenir así nuevas rondas de septación (Daga *et al.*, 2005; García-Cortés y McCollum, 2009) (**Figura 14**).



### 5.4.2 Funciones de la ruta SIN

Las principales funciones de la ruta SIN son las siguientes:

1) Activación de la contracción del CAR y formación del septo (Gould y Simanis, 1997; Jin *et al.*, 2006). Hasta ahora no se han identificado dianas directas de la ruta que puedan activar la contracción del anillo. Un posible candidato es la  $\beta$ GS Bgs1p, ya que su localización en la zona media depende de la actividad de la ruta (Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Del mismo modo la subunidad reguladora de la  $\beta$ GS Rho1p o su GEF específico de citocinesis, Rgf3p también dependen de la ruta (Tajadura *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2006).

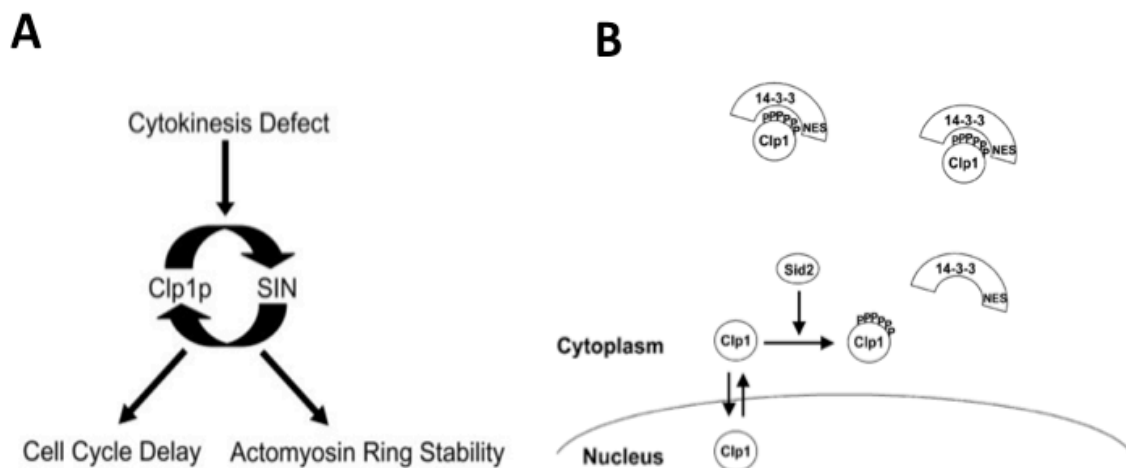
2) Ensamblaje y estabilización del CAR junto con la anilina Mid1p. Cdc15p es una posible diana de la ruta SIN ya que su reclutamiento, que es esencial para la estabilidad del CAR en la zona media, está muy afectado cuando se inactiva la ruta (Hachet y Simanis, 2008). Por otro lado, la ausencia de Cdc15p origina el fenotipo clásico de inactivación de la ruta SIN (Fankhauser *et al.*, 1995; Carnahan y Gould, 2003; Roberts-Galbraith *et al.*, 2010).

3) Regulación negativa de la ruta MOR. La relación antagónica entre ambas rutas controla los patrones de crecimiento y la reorganización del citoesqueleto de actina durante la mitosis y la interfase. Así, las quinasas de la ruta SIN Cdc7p y Sid1p regulan la localización de Pmo25 y la actividad de Nak1p, lo que afecta a su capacidad para interactuar con la quinasa Orb6p, bloqueando la señal de la ruta MOR (Kanai *et al.*, 2005; Kume *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2010). De esta forma, la inactivación de la ruta MOR provoca una inhibición del crecimiento bipolar en la célula durante la citocinesis.

### 5.4.3 Checkpoint de citocinesis

El ciclo celular es un proceso finamente regulado, por lo que para asegurar su correcto funcionamiento la célula ha desarrollado unos mecanismos de vigilancia que aseguran una transición eficiente entre sus diferentes etapas. Dichos mecanismos se han denominado “checkpoints” o “puntos de control”. Estos mecanismos de control permiten asegurar que un proceso celular determinado no se ejecutará en la célula hasta que no se haya completado el proceso anterior (Hartwell y Weinert, 1989).

En *S. pombe* un checkpoint de citocinesis controla que la septación se realice correctamente (**Figura 15**). En condiciones normales de crecimiento el checkpoint no está activo. Sin embargo, cuando la maquinaria responsable de la citocinesis sufre una perturbación o retraso, como resultado de la adición de drogas o por efecto de mutaciones que afectan al CAR, el checkpoint se convierte en esencial provocando un bloqueo de la contracción del CAR y por tanto, de la entrada de las células en nuevas rondas de mitosis (Liu *et al.*, 1999; Mishra *et al.*, 2004).



**Figura 15. Checkpoint de citocinesis.** (A) Esquema del funcionamiento del checkpoint de citocinesis. Pequeñas perturbaciones en la maquinaria de división celular activan el checkpoint provocando un retraso del ciclo celular y al mismo tiempo proporcionando más tiempo para conseguir la estabilidad del CAR. Adaptado de (Karagiannis *et al.*, 2005). (B) Regulación de Sid2p por Flp1p/Clp1p y Rad24p. Adaptado de (Chen *et al.*, 2008).

Gracias a la utilización del mutante de Bgs1p *cps1-191* y drogas que despolimerizan la actina (Latrunculina A) se sabe que una septación defectuosa activa el checkpoint. Para su correcto funcionamiento el checkpoint necesita un CAR funcional, la ruta SIN, y la fosfatasa Flp1p/Clp1p (Le Goff *et al.*, 1999a; Liu *et al.*, 2000b; Cueille *et al.*, 2001; Trautmann *et al.*, 2001). Flp1p se localiza en el nucléolo durante interfase y se traslada al citoplasma al comienzo de mitosis, donde es fosforilada por Sid2p, lo que promueve su unión a la proteína 14-3-3 Rad24p y su retención en el citoplasma hasta que la citocinesis se ha completado. Cuando se producen perturbaciones del CAR Flp1p permanece en el citoplasma como resultado de la actividad de la ruta SIN, permitiendo así el retraso en el ciclo celular (Cueille *et al.*, 2001; Trautmann *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008; Mishra y Oliferenko, 2008).

#### 5.4.4 Reguladores de la ruta SIN

La progresión del ciclo celular está regulada por la actividad de la quinasa CDK (de “Cyclin dependent kinase”) Cdc2p y su interacción con la ciclina Cdc13p. La salida de mitosis e inicio de la septación necesita la inactivación del complejo CDK Cdc2p/Cdc13p (Guertin *et al.*, 2000; Balasubramanian *et al.*, 2004a). La asociación de la ciclina Cdc13p con Cdc11p facilita la activación de la ruta SIN. Por otro lado, el complejo Sid1p-Cdc14p puede actuar como un sensor del estado de la actividad CDK, reprimiendo la ruta hasta que se complete la segregación nuclear. Recientemente se ha descrito que Cdc2p también puede regular la función de la ruta SIN a través de inhibidor Byr4p, provocando su deslocalización del SPB y activando la ruta (Chang, 2001; Morrell *et al.*, 2004; Dischinger *et al.*, 2008; Rachfall *et al.*, 2014). Aparte de los activadores Plo1p y Etd1p existen otros reguladores de la ruta SIN que se mencionan en esta memoria:

-Dma1p es un supresor multicopia de *cdc16-116* (Murone y Simanis, 1996). Inhibe la actividad de la ruta ubiquitinando a Sid4p en el SPB, lo que conduce a su degradación, impidiendo la localización de Plo1p en el SPB y la activación de la ruta (Guertin *et al.*, 2002; Johnson y Gould, 2010; Johnson *et al.*, 2012a).

-La fosfoproteína fosfatasa Flp1p/Clp1p citoplásmica activa la ruta SIN y a su vez la ruta SIN, a través de Sid2p, es necesaria para mantener a Flp1p en el citoplasma. Flp1p crea un bucle de retroalimentación positiva que mantiene activa la ruta hasta completar la citocinesis (Mishra *et al.*, 2004). Flp1p forma parte del checkpoint de citocinesis y es esencial cuando se producen perturbaciones del anillo (Mishra *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008).

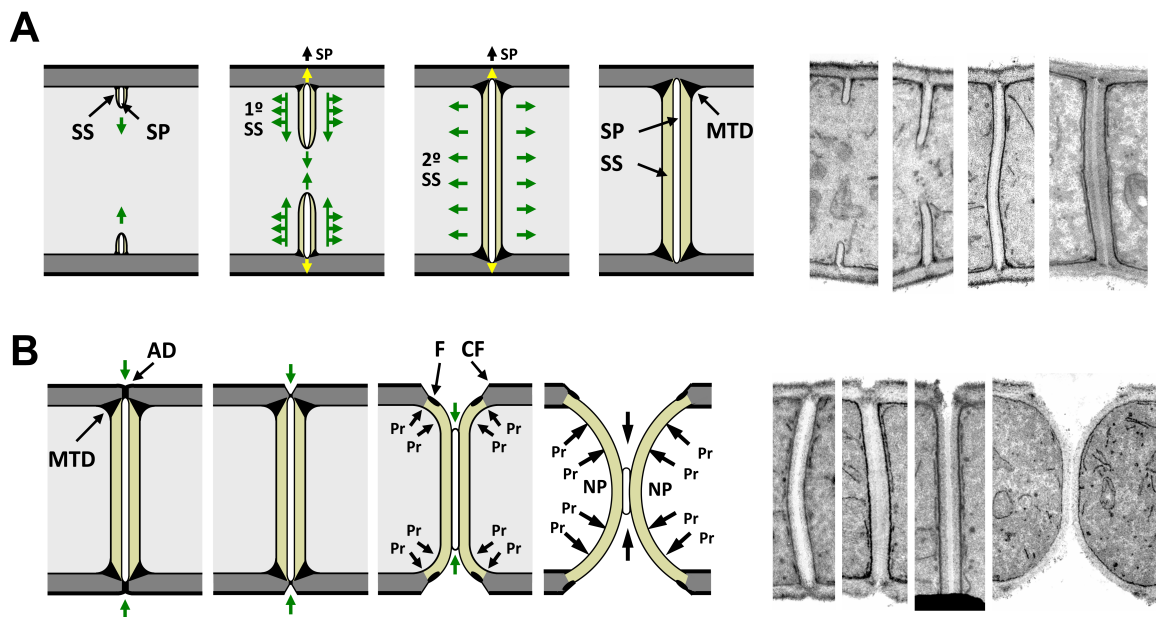
-Rho1p es un activador de Spg1p y es esencial para mantener la ruta SIN activa durante la contracción del CAR. Rho1 también interacciona con Etd1p, sugiriendo que podría existir un bucle de retroalimentación positiva entre la septación y la ruta SIN (Alcaide-Gavilán *et al.*, 2014).

### 5.5 Deposición del material de membrana y síntesis del septo de división

Una vez que se ha completado la división nuclear, el CAR se contrae íntimamente coordinado con la adición de nueva membrana plasmática y la deposición simultánea de un septo de división, compuesto por al menos L-BG, R-BG,  $\beta(1,6)$ -glucano y  $\alpha(1,3)$ -glucano. Bgs1p es la subunidad catalítica responsable de síntesis del L-BG del septo primario y Bgs4p, que sintetiza el R-BG que es el glucano mayoritario de la pared, es responsable de la síntesis del septo secundario y necesario en las últimas etapas de síntesis del septo primario. Ags1p sintetiza el  $\alpha(1,3)$ -glucano que también es esencial para la formación del septo secundario y para proporcionar al septo primario la rigidez necesaria para soportar la presión de turgencia que se genera durante la separación celular (Balasubramanian y McCollum, 2004b; Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007; Cortés *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2013).

Los dominios de membrana ricos en esfingolípidos y esteroides denominados “lipid rafts”, participan en los procesos de secreción polarizada en las zonas de crecimiento. Su formación depende de Cdc15p y la miosina de tipo I Myo1p. Estos dominios son necesarios para restringir la maquinaria de división celular en la zona media durante la citocinesis y para dirigir el anclaje de las vesículas secretoras encargadas de la adición de nueva membrana (Rajagopalan *et al.*, 2003; Wachtler *et al.*, 2003; Takeda y Chang, 2005; Wachtler y Balasubramanian, 2006).

Estudios de microscopía electrónica de transmisión han mostrado que la formación del septo comienza con la aparición en la zona media de una pequeña invaginación denominada rudimento anular, que constituye el inicio del septo



**Figura 16. Esquema de la síntesis y degradación del septo de división.** (A) Esquema de la formación del septo (izquierda). La síntesis coordinada y simultánea (flecha) del septo primario (perpendicular a la pared celular) y 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 una segunda ronda de síntesis de septo secundario. Imágenes de MET de la progresión de la síntesis del septo (derecha). (B) Degradación del septo y separación celular (izquierda). La separación celular comienza con la degradación de la pared lateral adyacente al septo, originando la cicatriz de fisión. La degradación de la pared se realiza a través del anillo denso (prolongación del MTD desde la base del septo primario hasta la superficie de la pared celular) y continúa con la degradación específica del septo primario. Durante este proceso, el material triangular denso (estructura densa a los electrones que conecta la membrana en la base del septo con el extremo del septo primario) da lugar a una estructura residual denominada fuscanel. A medida que avanza la degradación del septo primario y debido a la presión interna de la célula, el septo secundario va curvándose para adoptar en cada momento la conformación esférica más estable, asegurando la integridad de la separación celular. Imágenes de MET de la progresión de la degradación del septo (derecha). AD, anillo denso; CF, cicatriz de fisión; F, fuscanel (anillo fosco); MTD, material triangular denso; NP, nuevo polo; Pr, presión interna de turgencia; SP: septo primario; SS: septo secundario. Adaptado de (Muñoz et al., 2013).

primario rodeado de membrana plasmática. Según progresa la síntesis centrípeta del septo primario se deposita a ambos lados nuevo material de pared 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. Finalmente, una vez que el septo se cierra por completo, el septo secundario se hace más grueso en un proceso adicional de maduración (Johnson *et al.*, 1973; Dekker *et al.*, 2004; Cortés *et al.*, 2007; Sipiczki, 2007; Muñoz *et al.*, 2013) (Figura 16)

## 5.6 Separación celular

La pared celular está compuesta mayoritariamente por  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucanos por lo que debe existir en la pared celular proteínas con actividad  $\alpha$ - y  $\beta$ - glucanasa localizadas de manera muy específica para conseguir la degradación controlada del anillo de pared celular que rodea al septo y la posterior degradación específica del septo primario, permitiendo que las células se separen de una forma segura y controlada para dar lugar a dos entidades independientes.

La existencia de defectos en el proceso de separación celular es un fenotipo pleiotrópico en *S. pombe* que puede originarse como resultado de la alteración de diferentes proteínas y procesos celulares, como la calcineurina o la ruta de MAPK de integridad celular, cuyas dianas finales son las enzimas implicadas en la degradación del septo (Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sengar *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 2002; Alonso-Nuñez *et al.*, 2005; Sipiczki, 2007).

### 5.6.1 $\alpha$ - y $\beta$ - glucanasas

Hasta el momento se han descrito dos  $\alpha$ -glucanasas, Agn1p es responsable de la degradación del  $\alpha(1,3)$ -glucano de la pared celular alrededor del septo primario (Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005; Sipiczki, 2007). Ya que el septo primario también contiene  $\alpha(1,3)$ -glucano (Cortés *et al.*, 2012), Agn1p también podría participar la degradación del el septo primario. Agn2p está implicada en la degradación de la pared del asca una vez que se ha completado la esporulación (Dekker *et al.*, 2007).

También se han descrito dos  $\beta(1,3)$ -endoglucanasas, Eng1p es responsable de la degradación controlada del anillo de  $\beta(1,3)$ -glucano de la pared celular que rodea al septo y del L-BG del septo primario, una vez que ha quedado expuesto como resultado de la degradación hidrolítica de la pared celular que rodea al septo (Sipiczki y Bozsik, 2000; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2013). Eng2p tiene una función hidrolítica esencial sobre la pared del asca, permitiendo la liberación de las ascosporas (Encinar del Dedo *et al.*, 2009). Aparte, Exg1p es una  $\beta(1,6)$ -endoglucanasa relacionada con la separación celular que podría estar implicada en la degradación específica del  $\beta(1,6)$ -glucano del septo (Dueñas-Santero *et al.*, 2010). Todas estas enzimas son secretadas y llevan a cabo su acción hidrolítica en la pared celular externa a la célula.

### 5.6.2 Septinas, anilina Mid2p y complejo del exocisto

La correcta localización de las enzimas Agn1p y Eng1p en la zona de división requiere las septinas, la anilina Mid2p relacionada con septinas, y un complejo del exocisto funcional. La proteína Mid2p homóloga de la anilina es necesaria para la organización y mantenimiento del anillo de septinas. Este anillo

aparece en la zona media durante la anafase B, desdoblándose en dos a ambos lados del septo durante la contracción del CAR (Berlin *et al.*, 2003; Tasto *et al.*, 2003; An *et al.*, 2004)

El exocisto es un complejo multiproteico que dirige el anclaje de vesículas desde el Golgi a la membrana plasmática (Guo *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2004), jugando un papel esencial tanto en el transporte de vesículas con las proteínas hidrolíticas de degradación del septo, como en el crecimiento polarizado (Martín-Cuadrado *et al.*, 2005; Bendezú y Martín, 2011; Nakano *et al.*, 2011; Snaith *et al.*, 2011). Forma un complejo octamérico conservado en todas las células eucariotas y en *S. pombe* está compuesto por Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p y Exo84p. Se ha propuesto que Exo70p y Sec3p son necesarias para la correcta localización y anclaje del exocisto en la membrana plasmática (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003a; Bendezú y Martín, 2011). La localización del exocisto es independiente, tanto de los cables de actina como de Myo51p y Myo52p, aunque Sec3p, Sec5p y Exo70p son transportados en vesículas por Myo52p, lo que pone de manifiesto la estrecha colaboración entre ambos módulos en el crecimiento polarizado (Bendezú *et al.*, 2012). El exocisto se organiza en la zona media en forma de un anillo no contráctil de manera casi simultánea a la formación del CAR y se desdobra en dos durante la formación del septo. Los mutantes del exocisto muestran defectos en separación, acumulando un gran número de vesículas intracelulares que podrían contener las enzimas hidrolíticas (Wang *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005).

El anillo de septinas funciona como un marcador posicional del exocisto para transportar y secretar las enzimas hidrolíticas. Las enzimas hidrolíticas forman un anillo en la base del septo para degradar de forma controlada, tanto el anillo oscuro de pared celular que rodea al septo como el septo primario, lo que permitirá la separación física de las dos células hermanas (Dekker *et al.*, 2004; Bilokapic y Schwartz, 2012). La ausencia de septinas o Mid2p causa la desorganización del anillo de septinas restante, lo que altera la localización de las enzimas hidrolíticas, resultando en un defecto en la separación celular (Martín-Cuadrado *et al.*, 2005) (Figura 17).

A pesar de que la separación celular es la etapa más crítica del ciclo de vida, ni las septinas ni Mid2p son esenciales para la viabilidad celular, aunque se ha descrito que la represión de *bgs4<sup>+</sup>* causa la lisis celular en el inicio de la separación

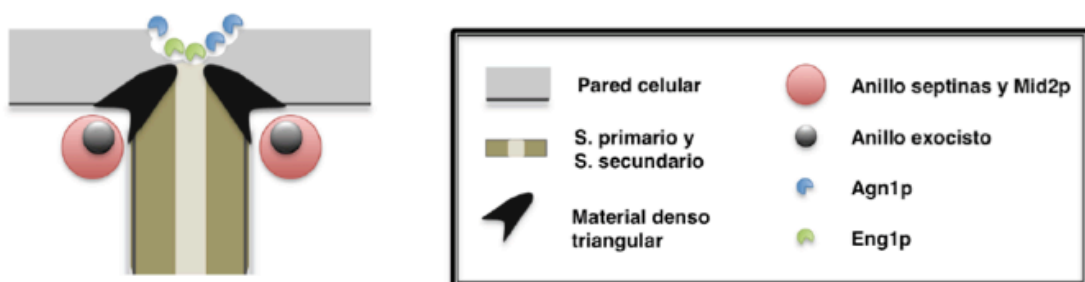


Figura 17. Esquema de la maquinaria de separación celular. Adaptado de (Sipiczki, 2007).

celular debido a una degradación descontrolada de la pared lateral al septo y de la base del septo. Esta alteración de Agn1p y Eng1p podría estar causada por una inestabilidad del anillo de septinas o del complejo del exocisto (Muñoz *et al.*, 2012).

### 5.6.3 GTPasas Rho3p y Rho4p

La actividad del exocisto está controlada por varios miembros de la superfamilia Ras de proteínas G. No se conocen los mecanismos que regulan la secreción de vesículas exocíticas en *S. pombe*, aunque se ha descrito que las GTPasa Rho3p y Rho4p son importantes para su función.

Rho3p muestra una fuerte interacción genética con mutantes del exocisto y su ausencia causa la acumulación de vesículas secretoras en el citoplasma y en las zonas próximas al septo, por lo que se le ha atribuido un papel en la modulación de la función del exocisto (Wang *et al.*, 2003b; Pérez y Rincón, 2010).

Rho4p regula la degradación del septo controlando la secreción de las glucanasas Agn1p y Eng1p. En su ausencia también se produce una acumulación de vesículas en la zona del septo y las glucanasas no se secretan al medio. Se ha propuesto que la interacción de Rho4p con el exocisto y las septinas es importante para regular espacial y temporalmente la división celular (Nakano *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2015).

## 6. La ruta MOR

La caracterización de mutantes de *S. pombe* con fenotipo redondeado condujo a la identificación de una ruta de señalización conocida como MOR (de "**M**orphogenesis Orb6p Network"). Esta ruta es esencial para el control de la polaridad y la separación celular al final de la citocinesis (Hou *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2005; Hergovich *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006; Verde y Willey, 2008).

La ruta MOR es, igual que la ruta SIN, una ruta de quinasas tipo NDR (nuclear Dbf2-related), que se encuentra conservada desde células animales hasta levaduras y hongos filamentosos (Saputo *et al.*, 2012). En la levadura de gemación *S. cerevisiae* se denomina ruta RAM (de "**R**egulation of **A**ce2 and **M**orphogenesis") (Nelson *et al.*, 2003), donde es esencial para la separación celular a través de la quinasa Cbk1p, la cual regula la acumulación en la célula hija del factor de transcripción Ace2p (Mazanka *et al.*, 2008).

En *S. pombe* la ruta MOR también regula la separación celular, sin embargo, todavía no se ha encontrado una relación funcional entre la ruta MOR y

---

Ace2p (Alonso-Núñez *et al.*, 2005). Los estudios realizados en esta levadura sugieren que la ruta MOR controla la relocalización de los elementos del citoesqueleto de actina (parches y cables) en los polos celulares (Huang *et al.*, 2005; Leonhard y Nurse, 2005; Das *et al.*, 2009).

### **6.1 Componentes, localización y mecanismo de acción de la ruta MOR.**

La ruta MOR está compuesta por una serie de proteínas esenciales: la proteína reguladora Pmo25p, el complejo quinasa Nak1p-Sog2p, la proteína adaptadora Mor2p, y el complejo quinasa Orb6p-Mob2p. Pmo25p y Nak1p son importantes para activar la actividad quinasa de Orb6p, a través del adaptador Mor2p (Hirata *et al.*, 2002; Kanai *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2005; Kume *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2013; Kume *et al.*, 2013). De acuerdo a su papel en el control de la polaridad celular durante la interfase, todos los componentes de la ruta MOR se localizan en uno o ambos polos celulares (**Figura 18**). Orb6p regula la polaridad celular restringiendo la localización y actividad de Cdc42p y la organización del citoesqueleto de actina en los polos. En su ausencia Cdc42p activo y sus efectores For3p y Gef1p se extienden por el lateral de la célula (Das *et al.*, 2009).

Durante la mitosis, cuando se produce la parada del crecimiento polarizado, todos los componentes de la ruta desaparecen de los polos, apareciendo secuencialmente, primero Nak1p-Sog2p y después Pmo25p, en uno de los dos SPBs y después en el septo, excepto Orb6p-Mob2p que únicamente se localiza en el septo durante su síntesis (Kanai *et al.*, 2005; Leonhard y Nurse, 2005). Se ha sugerido que esta localización diferencial de Pmo25p y Nak1p en el SPB, y de Orb6p en el septo, permite mantener inactiva a la ruta e inhibir el crecimiento polar hasta que no finalice la citocinesis. La localización de Orb6p en el septo también podría regular la separación celular al acabar la septación e inactivarse la ruta SIN. Al acabar la separación, todos los componentes de la ruta MOR se localizan de nuevo en el polo viejo, donde la célula reinicia su crecimiento (Ray *et al.*, 2010) (**Figura 18**).

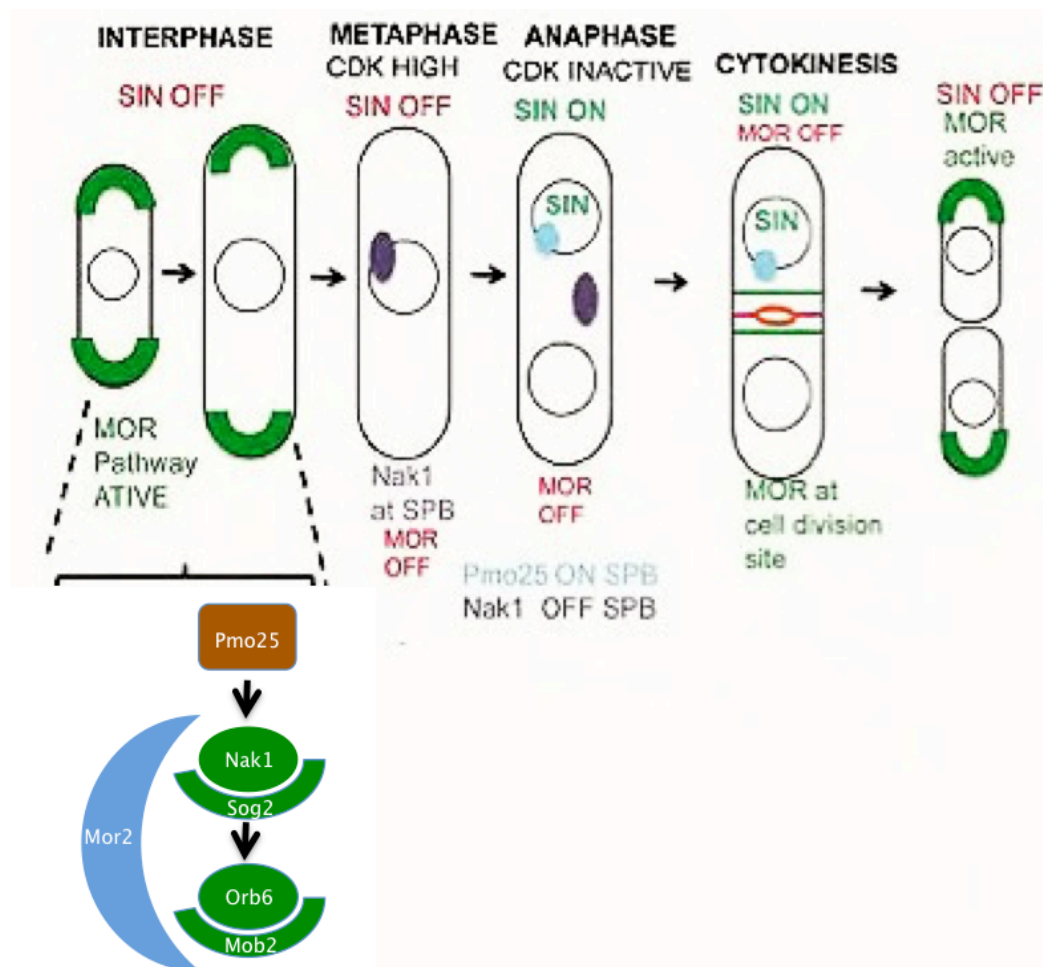
### **6.2 Comunicación entre la ruta SIN y la ruta MOR**

La inhibición de la ruta MOR durante la citocinesis permite que la ruta SIN regule el mantenimiento y contracción del CAR, y la formación del septo de división. Una ruta SIN activa tras la citocinesis origina la formación de múltiples septos ectópicos. Del mismo modo, una ruta MOR activa durante la citocinesis causa la lisis celular en la zona media, probablemente debido una degradación excesiva de la pared celular que rodea al septo (Minet *et al.*, 1974; Ray *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2014). La inactivación de la ruta SIN durante la mitosis no sólo provoca un fallo en el mantenimiento de la citocinesis, sino que permite una redistribución del citoesqueleto de actina hacia los polos favoreciendo un



crecimiento apical similar al que se produce en interfase (Mishra *et al.*, 2004). La señalización de las rutas SIN y MOR implica la activación de las quinasas NDR Sid2p y Orb6p de cada ruta. Ambas son Ser/Thr que regulan el crecimiento polarizado y la citocinesis en una gran variedad de organismos eucariotas desde levaduras hasta animales (Hergovich *et al.*, 2006 y 2009). Pmo25p es importante en la comunicación entre ambas rutas, interaccionando funcionalmente con Sid1p y Nak1. Además, la ruta SIN inhibe la actividad de Orb6p durante la citocinesis a través Sid2p (Kanai *et al.*, 2005; Kume *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2010).

La relación antagonica entre las rutas SIN y MOR es clave para coordinar la organización del citoesqueleto de actina durante la transición mitosis-interfase. La inhibición de la ruta MOR por parte de la ruta SIN bloquea la separación celular y el crecimiento polarizado hasta que no se haya completado la septación, por lo que se considera que la ruta SIN inactiva la ruta MOR durante la citocinesis (Ray *et al.*, 2010; Gupta y McCollum, 2011).



**Figura 18.** Esquema de los componentes de la ruta MOR y su localización durante la interfase y citocinesis de *S. pombe*. La ruta MOR es esencial durante el crecimiento polarizado. En mitosis Pmo25p y Nak1p se localizan primero en el SPB y después, junto con Orb6p, en el septo. Los componentes de la ruta MOR se localizan en los polos celulares durante interfase y en la zona media durante la citocinesis. Adaptado de (Ray, S., 2010).



# Objetivos



### Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio de Bgs1p más allá de su papel en la biosíntesis de la pared celular como subunidad catalítica responsable de la síntesis de un  $\beta$ -GL lineal esencial para la célula. En este trabajo se pretende estudiar el control que ejerce Bgs1p sobre el crecimiento polarizado. Para llevar a cabo este objetivo nos planteamos:

1. Estudio del papel Bgs1p en la conexión entre la ruta de activación de la septación (SIN) y el establecimiento del crecimiento polarizado.
2. Caracterización de los dominios de Bgs1p necesarios y específicos para su localización y función en los polos, el septo o el anillo.



# Bibliografía





- Alcaide-Gavilán, M., Lahoz, A., Daga, R. R., y Jiménez, J. (2014). Feedback Regulation of SIN by Etd1 and Rho1 in fission yeast. *Genetics*. **196**, 455-470.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. y Warbrick, E. (1993). In *Experiments with fission yeast: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, New York.
- Almonacid, M. y Paoletti, A. (2010). Mechanisms controlling division-plane positioning. *Semin Cell Dev Biol*. **21**, 874-880.
- Almonacid, M., Celton-Morizur, S., Jakubowski, J.L., Dingli, F., Loew, D., Mayeux, A., Chen, J.S., Gould, K.L., Clifford, D.M. y Paoletti, A. (2011). Temporal control of contractile ring assembly by Plo1 regulation of myosin II recruitment by Mid1/anillin. *Curr Biol*. **21**, 473-479.
- Alonso-Núñez, M.L., An, H., Martín-Cuadrado, A. B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., del Rey, F., Gould, K. L. y de Aldana, C.R.V. (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. **16**, 2003-2017.
- Amoah-Buahin, E., Bone, N. y Armstrong, J. (2005). Hyphal Growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. **4**, 1287-1297.
- An, H., Morrell, J.L., Jennings, J.L., Link, A.J. y Gould, K.L. (2004). Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization, and function. *Mol Biol Cell*. **15**, 5551-5564.
- Arasada, R. y Pollard, T.D. (2014). Contractile ring stability in *S. pombe* depends on F-BAR protein Cdc15p and Bgs1p transport from the Golgi Complex. *Cell Reports*. **8**, 1533-1544.
- Arasada, R. y Pollard, T.D. (2015). A role for F-BAR protein Rga7p during cytokinesis in *S. pombe*. *J. Cell. Sci.* **128**, 2259-2268.
- Arellano, M., Durán, A. y Pérez, P. (1996). Rho1 GTPase activates the (1-3) $\beta$ -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J.* **15**, 4584-4591.
- Arellano, M., Durán, A. y Pérez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* **110**, 2547-2555.
- Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Durán, A. y Pérez, P. (1999). *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.
- Arellano, M., Cartagena-Lirola, H., Nasser Hajibagheri, M. A., Durán, A. y Henar Valdivieso, M. (2000). Proper ascospore maturation requires the chs1+ chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol.* **35**, 79-89.

- Arellano, M., Niccoli, T. y Nurse, P.** (2002). Tea3p is a cell end marker activating polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol.* **12**, 751–756.
- Attanapola, S.L., Alexander, C.J. y Mulvihill, D.P.** (2009). 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**, 3856–3861.
- Balasubramanian, M.K., Bi, E. y Glotzer, M.** (2004a). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* **14**, R806–R818.
- Balasubramanian M. y McCollum, D.** (2004b). Regulation of cytokinesis. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond*, pp. 243-254. Edited by R. Egel, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ballou, C.E., Ballou, L. y Ball, G.** (1994). *Schizosaccharomyces pombe* glycosylation mutant with altered cell surface properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**, 9327–9331.
- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto, M. y Cansado, J.** (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell. Signal.* **20**, 748–757.
- Bähler, J. y Pringle, J. R.** (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* **12**, 1356–1370.
- Bardin, A.J. y Amon, A.** (2001). Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 815–826.
- Basi, G., Schmid, E., y Maundrell K.** (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene.* **123**, 131–136.
- Basu, R., Munteanu, E.L. y Chang, F.** (2014). Role of turgor pressure in endocytosis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* **25**, 679–687.
- Bathe, M. y Chang, F.** (2010). Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast: towards a systems-level understanding. *Trends Microbiol.* **18**, 38–45.
- Bedhomme, M.,S. Jouannic, A. Champion, V. Simanis y Henry, Y.** (2008). Plants, MEN and SIN. *Plant Physiol Biochem.* **46**, 1–10.
- Behrens, R. y Nurse, P.** (2002). Roles of fission yeast tea1p in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **157**, 783–793.
- Beltraminelli, N., Murone M. y Simanis V.** (1999). The *S. pombe zfs1* gene is required to prevent septation if mitotic progression is inhibited. *J Cell Sci.*

112, 3103–3114.

- Bendezú, F.O. y Martin, S.G.** (2011). Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol Biol Cell*. **22**, 44–53.
- Bendezú, F.O. y Martin, S.G.** (2012). Cdc42 oscillations in yeasts. *Sci Signal*. **5**, pe53.
- Berlin, A., Paoletti, A. y Chang, F.** (2003). Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J Cell Biol*. **160**, 1083–1092.
- Bilokapic, S. y Schwartz, T.U.** (2012). Molecular basis for Nup37 and ELY5/ELYS recruitment to the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. **109**, 15241–15246.
- Bitton, D.A., Wood, V., Scutt, P.J., Grallert, A., Yates, T., Smith, D.L., Hagan, I.M. y Miller, C.J.** (2011). Augmented annotation of the *Schizosaccharomyces pombe* genome reveals additional genes required for growth and viability. *Genetics*. **187**, 1207–1217.
- Bloom, J. y Cross, F.R.** (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 149–160.
- Bloom, J., Cristea, I.M., Procko, A.L., Lubkov, V., Chait, B.T., Snyder, M. y Cross, F.R.** (2011). Global analysis of Cdc14 phosphatase reveals diverse roles in mitotic processes. *J Biol Chem*. **286**, 5434–5445.
- Bohnert, K.A. y Gould, K.L.** (2012). Cytokinesis-based constraints on polarized cell growth in fission yeast. *PLoS Genet*. **8**, 1003004–1003004.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Brunner, D. y Nurse, P.** (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*. **102**, 695–704.
- Bush, D.A., Horisberger, M., Horman, I. y Wursch, P.** (1974). The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol*. **81**, 199–206.
- Cabib, E. y Arroyo, J.** (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat. Rev. Microbiol*. **11**, 648–655.
- Calonge, T.M., Arellano, M., Coll, P.M. y Pérez, P.** (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol*. **47**, 507–518.
- Calonge, T.M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I. y Pérez, P.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall  $\alpha$ -glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol Biol Cell*. **11**, 4393–4401.

- Carnahan, R.H. y Gould, K.L.** (2003). 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.
- Carnero, E., Ribas, J.C., García, B., Durán, A. y Sánchez, Y.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol Gen Genet.* **264**, 173–183.
- Castro, C., Ribas, J.C., Valdivieso, M.H., Varona, R., del Rey, F. y Durán, A.** (1995). Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3) $\beta$ -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **177**, 5732–5739.
- Celton-Morizur, S., Racine, V., Sibarita, J.B. y Paoletti, A.** (2006). Pom1 kinase links division plane position to cell polarity by regulating Mid1p cortical distribution. *J Cell Sci* **119**, 4710–4718.
- Cerutti, L. y Simanis, V.** (1999). Asymmetry of the spindle pole bodies and spg1p GAP segregation during mitosis in fission yeast. *J Cell Sci.* **112**, 2313–2321.
- Chang, F.** (1999). Movement of a cytokinesis factor cdc12p to the site of cell division. *Curr Biol.* **9**, 849–852.
- Chang, F.** (2001). Establishment of a cellular axis in fission yeast. *Trends Genet.* **17**, 273–278.
- Chang, F. y Martin, S.G.** (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **1**, a001347.
- Chang, F. y Verde, F.** (2004). Control of cell polarity and morphogenesis in fission yeast. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond*, pp. 255-268. Edited by R. Egel, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg.
- Chang, F., Woollard, A. y Nurse, P.** (1996). Isolation and characterization of fission yeast mutants defective in the assembly and placement of the contractile actin ring. *Journal of cell science*, **109**, 131–142.
- Chang, F., Drubin, D. y Nurse, P.** (1997). 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.
- Chang, L. y Gould, K.L.** (2000). Sid4p is required to localize components of the septation initiation pathway to the spindle pole body in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 5249–5254.
- Chen, C.T., Feoktistova, A., Chen, J.S., Shim, Y.S., Clifford, D.M., Gould, K.L. y McCollum, D.** (2008). The SIN kinase Sid2 regulates cytoplasmic retention of the *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1. *Curr Biol.* **18**, 1594–1599.

- Chin, C.F., Bennett, A.M., Ma, W.K., Hall, M.C. y Yeong, F.M. (2011). Dependence of Chs2 ER export on dephosphorylation by cytoplasmic Cdc14 ensures that septum formation follows mitosis. *Mol Biol Cell*. **23**, 45–58.
- Chitu, V. y Stanley, E.R. (2007). Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane-cytoskeletal interactions. *Trends Cell Biol*. **17**, 145–156.
- Ciobanasu, C., Faivre B., y Le Clainche, C. (2013). Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur. J. Cell Biol*. **92**, 339–348.
- Clifford, D.M., Wolfe, B.A., Roberts-Galbraith, R.H., McDonald, W.H., Yates, J. R. y Gould, K. L. (2008). The Clp1/Cdc14 phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related Mid1. *J Cell Biol*. **181**, 79–88.
- Coffman, V. C., Nile, A.H., Lee, I.J., Liu, H. y Wu, J.Q. (2009). Roles of formin nodes and myosin motor activity in Mid1p-dependent contractile-ring assembly during fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell*. **20**, 5195–5210.
- Coffman, V. C., Sees, J.A., Kovar, D.R. y Wu, J.Q. (2013). The formins Cdc12 and For3 cooperate during contractile ring assembly in cytokinesis. *J Cell Biol*. **203**, 101–114.
- Coll, P.M., Rincón, S.A., Izquierdo, R.A. y Pérez, P. (2007). Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *EMBO J*. **26**, 1865–1877.
- Coll, P.M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. y Pérez, P. (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. **14**, 313–323.
- Cortés, J.C.G., (2006). *Estudio de Bgs1p y Bgs4p: dos proteínas esenciales implicadas en la biosíntesis del  $\beta(1-3)$ -D-glucano de *Schizosaccharomyces pombe**. Tesis doctoral impresa. Dirigida por Juan Carlos Ribas Elcorobarrutia y Ángel Durán Bravo. Universidad de Salamanca.
- Cortés, J.C.G., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A. y Ribas, J. C. (2005). The novel fission yeast (1,3) $\beta$ -D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci*. **118**, 157–174.
- Cortés, J.C.G., Ishiguro, J., Durán, A. y Ribas, J.C. (2002). Localization of the (1,3) $\beta$ -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.
- Cortés, J.C.G., Konomi, M., Martins, I.M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Osumi, M., Durán, A. y Ribas, J.C. (2007). The (1,3) $\beta$ -d-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation.

- Cortés, J.C.G., Sato, M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Clemente-Ramos, J. A., Ramos, M., Okada, H., Osumi, M., Durán, A. y Ribas, J.C. (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol.* **198**, 637–656.
- Cortés, J.C.G., Pujol, N., Sato, M., Pinar, M., Ramos, M., Moreno, B., Osumi, M., Ribas, J.C. y Pérez, P. (2015). Cooperation between Paxillin-like protein Pxl1 and glucan synthase Bgs1 is essential for actomyosin ring stability and septum formation in fission yeast. *PLoS Genet.* **11**:e1005358. doi:10.1371/journal.pgen.1005358.
- Cueille, N., Salimova, E., Esteban, V., Blanco, M., Moreno, S., Bueno, A. y Simanis, V. (2001). *Flp1*, a fission yeast orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae CDC14* gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J Cell Sci.* **114**, 2649–2664.
- Cui, X., Shin, H., Song, C., Laosinchai, W., Amano, Y. y Brown, R.M. (2001). A putative plant homolog of the yeast  $\beta$ -1,3-glucan synthase subunit *FKS1* from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers. *Planta.* **213**, 223–230.
- Cuthbertson, B.J., Liao, Y., Birnbaumer, L. y Blackshear, P.J. (2008). Characterization of *zfs1* as an mRNA-binding and -destabilizing protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* **283**, 2586–2594.
- Daga, R.R. y Chang, F. (2005). Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**, 8228–8232.
- Daga, R.R., Lahoz, A., Muñoz, M. J., Moreno, S. y Jiménez, J. (2005). Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *EMBO J.* **24**, 2436–2446.
- Das, M., Wiley, D.J., Medina, S., Vincent, H.A., Larrea, M., Oriolo, A. y Verde, F. (2007). Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Mol Biol Cell* **18**, 2090–2101.
- Das, M., Wiley, D.J., Chen, X., Shah, K. y Verde, F. (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol.* **19**, 1314–1319.
- Das, M., Drake, T., Wiley, D.J., Buchwald, P., Vavylonis, D. y Verde, F. (2012). Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science.* **337**, 239–243.
- Das, M. y Verde, F. (2013). Role of Cdc42 dynamics in the control of fission yeast cell polarization. *Biochem Soc Trans.* **41**, 1745–1749.
- Demeter, J. y Sazer, S. (1998). Imp2, a new component of the actin ring in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol.* **143**, 415–427.
- Dekker, N., Speijer, D., Grün, C.H., van den Berg, M., de Haan, A. y Hochstenbach, F. (2004). Role of the  $\alpha$ -glucanase Agn1p in fission-yeast

- cell separation. *Mol Biol Cell* **15**, 3903–3914.
- Dekker, N., van Rijssel, J., Distel, B. y Hochstenbach, F.** (2007). Role of the  $\alpha$ -glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast* **24**, 279–288.
- Dischinger, S., Krapp, A., Xie, L., Paulson, J.R. y Simanis, V.** (2008). Chemical genetic analysis of the regulatory role of Cdc2p in the *S. pombe* septation initiation network. *J Cell Sci.* **121**, 843–853.
- Dorée, M. y Hunt, T.** (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci.* **115**, 2461–2464.
- Drgonová, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G. C., Ford, R.A., Chan, C.S., Takai, Y. y Cabib, E.** (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* **272**, 277–279.
- Drummond, D.R. y Cross, R.A.** (2000). Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol.* **10**, 766–775.
- Dueñas-Santero, E., Martín-Cuadrado, A.B., Fontaine, T., Latgé, J.P., del Rey, F. y Vázquez de Aldana, C.R.** (2010). Characterization of glycoside hydrolase family 5 proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* **9**, 1650–1660.
- Durán, A. y P. Pérez.** (2004). Cell Wall synthesis. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond*, pp. 269–279. Edited by R. Egel, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg.
- Edwards, J.A., Alore, E.A. y Rappleye, C.A.** (2011). The yeast-phase virulence requirement for  $\alpha$ -glucan synthase differs among *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot Cell.* **10**, 87–97.
- Egel, R. y Egel-Mitani, M.** (1974). Premeiotic DNA synthesis in fission yeast. *Exp Cell Res.* **88**, 127–134.
- Egel, R.** (1984). Two tightly linked silent cassettes in the mating-type region of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **8**, 199–203.
- Egel, R.** (1994). Regulation of meiosis and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In *The Mycota. Vol I. Growth, Differentiation and Sexuality*, pp. 251–265. Edited by J.G.H. Wessels and F. Meinhardt. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg.
- Encinar del Dedo, J., Dueñas, E., Arnáiz, Y., del Rey, F. y Vázquez de Aldana, C.R.** (2009).  $\beta$ -glucanase Eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell.* **8**, 1278–1286.
- Estravís, M., Rincón, S.A., Santos, B. y Pérez, P.** (2011). Cdc42 regulates multiple membrane traffic events in fission yeast. *Traffic.* **12**, 1744–1758.

- Fankhauser, C. y Simanis, V.** (1993). The *Schizosaccharomyces cdc14* gene is required for septum formation and can also inhibit nuclear division. *Mol Biol Cell.* **4**, 531–539.
- Fankhauser, C. y Simanis, V.** (1994). The *cdc7* protein kinase is a dosage dependent regulator of septum formation in fission yeast. *EMBO J.* **13**, 3011–3019.
- Fankhauser, C., Marks, J., Reymond, A. y Simanis, V.** (1993). The *Schizosaccharomyces pombe cdc16* gene is required both for maintenance of p34cdc2 kinase activity and regulation of septum formation: a link between mitosis and cytokinesis? *EMBO J.* **12**, 2697–2704.
- Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K. y Simanis, V.** (1995). The *S. pombe cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell.* **82**, 435–444.
- Feierbach, B. y Chang, F.** (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol.* **11**, 1656–1665.
- Feoktistova, A., Morrell-Falvey, J., Chen, J.S., Singh, N.S., Balasubramanian, M.K. y Gould, K.L.** (2012). The fission yeast SIN kinase, Sid2, is required for SIN asymmetry and regulates the SIN scaffold, Cdc11. *Mol Biol Cell.* **23**, 1636–1645.
- Forsburg, S. L.** (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* **21**, 2955–2956.
- Forsburg, S. L.** (2003). Overview of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Protoc Mol Biol.* **64**, 13.14.1–13.14.3
- Furge, K.A., Cheng, Q.C., Jwa, M., Shin, S., Song, K. y Albright, C.F.** (1999). Regions of Byr4, a regulator of septation in fission yeast, that bind Spg1 or Cdc16 and form a two-component GTPase-activating protein with Cdc16. *J Biol Chem.* **274**, 11339–11343.
- Furge, K.A., Wong, K., Armstrong, J., Balasubramanian, M. y Albright, C. F.** (1998). Byr4 and Cdc16 form a two-component GTPase-activating protein for the Spg1 GTPase that controls septation in fission yeast. *Curr Biol.* **8**, 947–954.
- Gachet, Y. y Hyams, J.S.** (2005). Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci.* **118**, 4231–4242.
- Gachet, A., Mulvihill, D.P. y Hyams, J.S.** (2004). The fission yeast actomyosin cytoskeleton. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond*, pp. 226–242. Edited by R. Egel, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg.
- García, I., Jiménez, D., Martín, V., Durán, A. y Sánchez, Y.** (2005). The  $\alpha$ -



- glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell*. **97**, 569–576.
- García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T. y Sánchez, Y. (2006a). Synthesis of  $\alpha$ -glucans in fission yeast spores is carried out by three  $\alpha$ -glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol*. **59**, 836–853.
- García, P., Tajadura, V., García, I. y Sánchez, Y. (2006b). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell*. **17**, 1620–1631.
- García, P., García, I., Marcos, F., de Garibay, G.R. y Sánchez, Y. (2009). Fission yeast rgf2p is a rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of rgf1p. *Genetics*. **181**, 1321–1334.
- García-Cortés, J.C. y McCollum, D. (2009). Proper timing of cytokinesis is regulated by *Schizosaccharomyces pombe* Etd1. *J Cell Biol*. **186**, 739–753.
- Gemmill, T.R. y Trimble, R.B. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* produces novel Gal<sub>0-2</sub>Man<sub>1-3</sub> O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*. **9**, 507–515.
- Gietz, R.D., Schiestl, R. H., Willems, A.R. y Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355–360.
- Gladfelter, A.S. (2010). Guides to the final frontier of the cytoskeleton: septins in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol*. **13**, 720–726.
- Goshima, T., Kume K., Koyano T., Ohya Y., Toda T. y Hirata D. (2010). Fission yeast germinal center (GC) kinase Ppk11 interacts with Pmo25 and plays an auxiliary role in concert with the morphogenesis Orb6 network (MOR) in cell morphogenesis. *J Biol Chem*. **285**, 35196–35205.
- Gould, K. L. y Simanis, V. (1997). The control of septum formation in fission yeast. *Genes Dev*. **11**, 2939–2951.
- Goyal, A., Takaine, M., Simanis, V. y Nakano, K. (2011). Dividing the spoils of growth and the cell cycle: The fission yeast as a model for the study of cytokinesis. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **68**, 69–88.
- Grallert, A., Connolly, Y., Smith, D.L., Simanis, V. y Hagan, I.M. (2012). The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1. *Nat. Cell Biol*. **14**, 738–745.
- Grün, C.H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F.M., Kamerling, J. P. y Vliegenthart, J.F.G. (2005). The structure of cell wall  $\alpha$ -glucan from fission yeast. *Glycobiology*. **15**, 245–257.
- Gu, Y., Kaplinsky, N., Bringmann, M., Cobb, A., Carroll, A., Sampathkumar A., Baskin, T.I., Persson, S. y Somerville, C.R. (2010).

- Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12866–12871.
- Guarente, L.** (1983). Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expressions of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 181-191.
- Guertin, D.A. y McCollum, D.** (2001). Interaction between the noncatalytic region of Sid1p kinase and Cdc14p is required for full catalytic activity and localization of Sid1p. *J Biol Chem.* **276**, 28185–28189.
- Guertin, D.A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K.L. y McCollum, D.** (2000). The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *EMBO J.* **19**, 1803–1815.
- Guertin, D.A., Venkatram, S., Gould, K.L. y McCollum, D.** (2002). Dma1 prevents mitotic exit and cytokinesis by inhibiting the septation initiation network (SIN). *Dev Cell.* **3**, 779–790.
- Guo, W., Sacher, M., Barrowman, J., Ferro-Novick, S. y Novick, P.** (2000). Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol.* **10**, 251–255.
- Gupta, S. y McCollum, D.** (2011). Crosstalk between NDR kinase pathways coordinates cell cycle dependent actin rearrangements. *Cell Div.* **6**, e19.
- Gupta, S., Mana-Capelli, S., McLean, J. R., Chen, C.T., Ray, S., Gould, K. L. y McCollum, D.** (2013). Identification of SIN Pathway Targets Reveals Mechanisms of Crosstalk between NDR Kinase Pathways. *Curr Biol.* **23**, 333-338.
- Gupta, S., Govindaraghavan, M., y McCollum, D.** (2014). Crosstalk between NDR kinase pathways co-ordinates cytokinesis with cell separation in *S. pombe*. *Eukaryotic Cell.* doi:10.1128/EC.00129-14
- Hacet, O. y Simanis, V.** (2008). Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev.* **22**, 3205–3216.
- Hagan, I.M.** (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci.* **111**, 1603–1612.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hartwell, L.H. y Weinert, T.A.** (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* **246**, 629–634.
- Hayes, C.E. y Goldstein, I.J.** (1974). An  $\alpha$ -D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J Biol Chem.* **249**, 1904–1914.
- Hayles, J. y Nurse, P.** (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 647–656.

- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N.L. y Hedges, S.B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*. **293**, 1129–1133.
- Hedges, S.B. (2002). The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet*. **3**, 838–849.
- Heitz, M.J., Petersen, J., Valovin, S. y Hagan, I.M. (2001). MTOC formation during mitotic exit in fission yeast. *J Cell Sci*. **114**, 4521–4532.
- Henry, C., Latgé, J.P. y Beauvais, A. (2012).  $\alpha$ 1,3 glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. **11**, 26–29.
- Hergovich, A., M.R. Stegert, D. Schmitz y Hemmings B.A. (2006). NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**, 253–264.
- Hergovich, A. y Hemmings B.A. (2012). Hippo signalling in the G2/M cell cycle phase: Lessons learned from the yeast MEN and SIN pathways. *Semin Cell Dev Biol*. **23**, 794–802.
- Hirata, D., Kishimoto, N., Suda, M., Sogabe, Y., Nakagawa, S., Yoshida, Y., Sakai, K., Mizunuma, M., Miyakawa, T., Ishiguro, J., et al. (2002). Fission yeast Mor2/Cps12, a protein similar to Drosophila Furry, is essential for cell morphogenesis and its mutation induces Wee1-dependent G<sub>2</sub> delay. *EMBO J*. **21**, 4863–4874.
- Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. y Yamamoto, M. (2003). 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.
- Hochstenbach, F., Klis, F.M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J. y Klausner, R. D. (1998). Identification of a putative  $\alpha$ -glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 9161–9166.
- Hong, Z., Delauney, A. J. y Verma, D.P. (2001). A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell*. **13**, 755–768.
- Horisberger, M., Vonlanthen, M. y Rosset, J. (1978). Localization of  $\alpha$ -galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol*. **119**, 107–111.
- Hou, M.C. (2003). Mob2p interacts with the protein kinase Orb6p to promote coordination of cell polarity with cell cycle progression. *J Cell Sci*. **116**, 125–135.
- Hou, M.C., Salek, J. y McCollum, D. (2000). Mob1p interacts with the Sid2p kinase and is required for cytokinesis in fission yeast. *Curr Biol*. **10**, 619–622.
- Hsu, S.C., TerBush, D., Abraham, M. y Guo, W. (2004). The Exocyst

---

Complex in Polarized Exocytosis. *Int Rev Cytol.* **233**, 243–265. Elsevier.

- Huang, T.Y., Markley, N.A. y Young D.** (2003). Nak1, an essential germinal center (GC) kinase regulates cell morphology and growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **278**, 991–997.
- Huang, T.Y., Renaud-Young, M. y Young, D.** (2005). Nak1 interacts with Hob1 and Wsp1 to regulate cell growth and polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* **118**, 199–210.
- Huang, Y., Yan, H. y Balasubramanian, M.K.** (2008). Assembly of normal actomyosin rings in the absence of Mid1p and cortical nodes in fission yeast. *J Cell Biol.* **183**, 979–988.
- Huisman, S. y Brunner, D.** (2011). Cell polarity in fission yeast: A matter of confining, positioning, and switching growth zones. *Semin Cell Dev Biol.* **22**, 799–805.
- Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S.A. y Osumi, M.** (2001). In situ localization of  $\beta$ -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* **18**, 433–444.
- Inoue, S.B., Qadota, H., Arisawa, M., Anraku, Y., Watanabe, T. y Ohya, Y.** (1996). Signaling toward yeast 1,3- $\beta$ -glucan synthesis. *Cell Struct Funct.* **21**, 395–402.
- Ishiguro, J., Saitou, A., Durán, A. y Ribas, J.C.** (1997). *cps1<sup>+</sup>*, 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.
- Ishiguro, J.** (1998). 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.
- Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H. y De Camilli, P.** (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell.* **9**, 791–804.
- Jiang, W. y Hallberg, R.L.** (2001). Correct regulation of the septation initiation network in *Schizosaccharomyces pombe* requires the activities of par1 and par2. *Genetics.* **158**, 1413–1429.
- Jin, Q.W. y McCollum, D.** (2003). Scw1p antagonizes the septation initiation network to regulate septum formation and cell separation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryo Cell.* **2**, 510–520.
- Jin, Q.W., Ray, S., Choi, S.H. y McCollum, D.** (2007). The nucleolar Net1/Cfi1-related protein Dnt1 antagonizes the septation initiation network in fission yeast. *Mol Biol Cell.* **18**, 2924–2934.
- Jin, Q.W., Zhou, M., Bimbo, A., Balasubramanian, M.K. y McCollum, D.**

- (2006). A role for the septation initiation network in septum assembly revealed by genetic analysis of *sid2-250* suppressors. *Genetics*. **172**, 2101–2112.
- Johnson, A.E. y Gould, K.L.** (2010). Dma1 ubiquitinates the SIN scaffold, Sid4, to impede the mitotic localization of Plo1 kinase. *EMBO J.* **30**, 341–354.
- Johnson, A.E., Collier, S.E., Ohi, M.D. y Gould, K.L.** (2012a). Fission yeast Dma1 requires RING domain dimerization for its ubiquitin ligase activity and mitotic checkpoint function. *J Biol Chem.* **287**, 25741–25748.
- Johnson, A.E., McCollum, D. y Gould, K.L.** (2012b). Polar opposites: Fine-tuning cytokinesis through SIN asymmetry. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **69**, 686–99.
- Johnson, B.F., Yoo, B.Y. y Calleja, G.B.** (1973). Cell division in yeasts: movement of organelles associated with cell plate growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* **115**, 358–366.
- Jordan, S.N., Olson, S. y Canman, J.C.** (2011). Cytokinesis: thinking outside the cell. *Curr Biol.* **21**, R119–R121.
- Kaksonen, M., Sun, Y. y Drubin, D.G.** (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell.* **115**, 475–487.
- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. y Mabuchi, I.** (2005). Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol.* **7**, 916–917.
- Kamasaki, T., Osumi, M. y Mabuchi, I.** (2007). Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol.* **178**, 765–771.
- Kanai, M., Kume, K., Miyahara, K., Sakai, K., Nakamura, K., Leonhard, K., Wiley, D.J., Verde, F., Toda, T. y Hirata, D.** (2005). Fission yeast MO25 protein is localized at SPB and septum and is essential for cell morphogenesis. *EMBO J.* **24**, 3012–3025.
- Kang, M.S. y Cabib, E.** (1986). Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**, 5808–5812.
- Karagiannis, J., Oulton R. y Young P.G.** (2002). The Scw1 RNA-binding domain protein regulates septation and cell-wall structure in fission yeast. *Genetics.* **162**, 45–58.
- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P. y Toda, T.** (1999). Fission yeast  $\alpha$ -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.
- Keeney, J.B. y Boeke, J.D.** (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32*

---

and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**, 849-856.

- Kelly, F.D. y Nurse, P. (2011). De Novo growth zone formation from fission yeast spheroplasts. *PLoS ONE*. **6**, e27977.
- Kim, H., Yang, P., Catanuto, P., Verde, F., Lai, H., Du, H., Chang, F. y Marcus, S. (2003). 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.
- Kitayama, C., Sugimoto, A. y Yamamoto, M. (1997). 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.
- Kobori, H., Yamada, N., Taki, A. y Osumi, M. (1989). 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.
- Kokkoris, K., Gallo Castro, D., y Martin, S.G. (2014). The Tea4-PP1 landmark promotes local growth by dual Cdc42 GEF recruitment and GAP exclusion. *J. Cell Sci.* **127**, 2005-2016.
- Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T. y Osumi, M. (2003). Characterization and behaviour of alpha-glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast*. **20**, 427-438.
- Kopecká, M., Fleet, G.H. y Phaff, H.J. (1995). Ultrastructure of the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe* following treatment with various glucanases. *J Struct Biol.* **114**, 140-152.
- Kovar, D.R. (2003). The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol.* **161**, 875-887.
- Kovar, D.R. (2006). Cell polarity: formin on the move. *Curr Biol.* **16**, R535-538.
- Kovar, D.R., Sirotkin, V. y Lord, M. (2011). Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **21**, 177-187.
- Krapp, A. y Simanis, V. (2008). An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). *Biochem Soc Trans.* **36**, 411-415.
- Krapp, A., Collin, P., Cano Del Rosario, E. y Simanis, V. (2008). Homeostasis between the GTPase Spg1p and its GAP in the regulation of cytokinesis in *S. pombe*. *J Cell Sci.* **121**, 601-608.
- Krapp, A., Collin, P., Cokoja, A., Dischinger, S., Cano, E. y Simanis, V. (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* septation initiation network (SIN) is required for spore formation in meiosis. *J Cell Sci.* **119**, 2882-2891.
- Krapp, A., Schmidt, S., Cano, E. y Simanis, V. (2001). *Schizosaccharomyces pombe* *cdc11p*, together with *sid4p*, provides an anchor for septation initiation network proteins on the spindle pole body. *Curr Biol.* **11**, 1559-1568.

- Kume, K., Kubota, S., Koyano, T., Kanai, M., Mizunuma, M., Toda, T. e Hirata, D. (2013). Fission yeast leucine-rich repeat protein Lrp1 is essential for cell morphogenesis as a component of the Morphogenesis Orb6 Network (MOR). *Biosci Biotechnol Biochem.* **77**, 130064-1-6.
- Kume, K., T. Goshima, K. Miyahara, T. Toda e Hirata D. (2007). A method for Pmo25-Associated kinase assay in fission yeast: the activity is dependent on two GC kinases Nak1 and Sid1. *Biosci. Biotechnol Biochem.* **71**, 615–617.
- Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 488-492.
- Kushner, R.S. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. In *Genetic Engineering*, (ed HW a N Boyer, S (ed)), 17-24.
- La Carbona, S., Le Goff, C. y Le Goff, X. (2006). Fission yeast cytoskeletons and cell polarity factors: connecting at the cortex. *Biol Cell.* **98**, 619–631.
- Laporte, D., Zhao, R. y Wu, J.Q. (2010). Mechanisms of contractile-ring assembly in fission yeast and beyond. *Semin Cell Dev Biol.* **21**, 892–898.
- Laporte D., Coffman V.C., Lee I.J., y Wu, J.Q. (2011). Assembly and architecture of precursor nodes during fission yeast cytokinesis. *The J Cell Biol.* **192**, 1005–1021.
- Lattmann, E., Krapp, A. y Simanis, V. (2009). Cytokinesis: Closure resets your SIN. *Curr Biol.* **19**, R1040–R1042.
- Le Goff, X., Utzig, S. y Simanis, V. (1999a). Controlling septation in fission yeast: finding the middle, and timing it right. *Curr Genet.* **35**, 571–584.
- Le Goff, X., Woollard, A. y Simanis, V. (1999b). Analysis of the *cps1* gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet.* **262**, 163–172.
- Lee, I.J., Coffman, V.C. y Wu, J.Q. (2012). Contractile-ring assembly in fission yeast cytokinesis: Recent advances and new perspectives. *Cytoskeleton (Hoboken).* **69**, 751–763.
- Lee, W.L., Bezanilla, M. y Pollard, T.D. (2000). Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *J Cell Biol.* **151**, 789–800.
- Leonhard, K. y Nurse, P. (2005). Ste20/GCK kinase Nak1/Orb3 polarizes the actin cytoskeleton in fission yeast during the cell cycle. *J Cell Sci.* **118**, 1033–1044.
- Leupold, U. (1950). Die Verebung von homothalie und heterothalie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Compt Rend Lab Carlsberg.* **24**, 359-364.
- Lei, L., Li, S. y Gu, Y. (2012). Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1)

---

mediates the intimate relationship between cellulose microfibrils and cortical microtubules. *Plant Signal Behav.* 7, 714–718.

- Lei, L., Li, S., Bashline, L. y Gu, Y. (2014). Dissecting the molecular mechanism underlying the intimate relationship between cellulose microfibrils and cortical microtubules. *Front Plant Sci.* 5, 90.
- Li, C., Furge, K. A., Cheng, Q.C. y Albright, C.F. (2000). Byr4 localizes to spindle-pole bodies in a cell cycle-regulated manner to control Cdc7 localization and septation in fission yeast. *J Biol Chem.* 275, 14381–14387.
- Li, S., Lei, L., Somerville, C.R., y Gu, Y. (2012). Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 185–190.
- Lichius, A., Berepiki, A. y Read, N. D. (2011). Form follows function — The versatile fungal cytoskeleton. *Fungal Biol.* 115, 518–540.
- Liu, J., Wang, H., McCollum, D. y Balasubramanian, M.K. (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3- $\beta$ -glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* 153, 1193–1203.
- Liu, J., Tang, X., Wang, H. y Balasubramanian, M. (2000a). Bgs2p, a 1,3- $\beta$ -glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 478, 105–108.
- Liu, J., Wang, H. y Balasubramanian, M.K. (2000b). A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 113, 1223–1230.
- Liu, J., Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S. y Balasubramanian, M.K. (2002). The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 13, 989–1000.
- Loewith, R., Hubberstey, A. y Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 113, 153–160.
- Loo, T.H. y Balasubramanian, M. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pak-related protein, Pak1p/Orb2p, phosphorylates myosin regulatory light chain to inhibit cytokinesis. *J Cell Biol.* 183, 785–793.
- Lord, M., Sladewski, T.E. y Pollard, T.D. (2008). Yeast UCS proteins promote actomyosin interactions and limit myosin turnover in cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 8014–8019.
- Lu, Y., Sugiura, R., Yada, T., Cheng, H., Sio, S.O., Shuntoh, H. y Kuno, T. (2002). Calcineurin is implicated in the regulation of the septation initiation network in fission yeast. *Genes Cells.* 7, 1009–1019.
- Magnelli, P.E., Cipollo, J.F. y Robbins, P.W. (2005). A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall



- composition and structure: assignment of diglucan. *Anal Biochem.* **336**, 202–212.
- Manners, D.J. y Meyer, M.T.** (1977). The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydr Res.* **57**, 189-203.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M.H. y Wigler, M. H.** (1995). Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 6180–6184.
- Marks, J. y Hyams, J.S.** (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol.* **39**, 27-32.
- Marks, J., Hagan, I.M. y Hyams, J.S.** (1986). Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci.* **5**, 229-241.
- Martin, S.G.** (2009). Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends Cell Biol.* **19**, 447–454.
- Martin, S.G. y Berthelot-Grosjean, M.** (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature.* **459**, 852–856.
- Martin, S.G. y Chang, F.** (2003). Cell polarity: a new mod(e) of anchoring. *Curr Biol.* **13**, R711–R713.
- Martin, S.G. y Chang, F.** (2005). New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle.* **4**, 1046–1049.
- Martin, S.G. y Chang, F.** (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol.* **16**, 1161–1170.
- Martin, S.G., Rincón, S.A., Basu, R., Pérez, P. y Chang, F.** (2007). Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell.* **18**, 4155–4167.
- Martin, V., García, B., Carnero, E., Durán, A. y Sánchez, Y.** (2003). Bgs3p, a putative 1,3- $\beta$ -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell.* **2**, 159–169.
- Martins, I.M., Cortés, J.C.G., Muñoz, J., Moreno, M.B., Ramos, M., Clemente-Ramos, J.A., Durán, A. y Ribas, J.C.** (2011). 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.
- Martín, V., Ribas, J.C., Carnero, E., Durán, A. y Sánchez, Y.** (2000). *bgs2<sup>+</sup>*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol.* **38**, 308–321.
- Martín-Cuadrado, A.B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Vázquez de Aldana, C.**

- R. y del Rey, F. (2003). The endo- $\beta$ -1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* **116**, 1689–1698.
- Martín-Cuadrado, A.B., Morrell, J.L., Konomi, M., An, H., Petit, C., Osumi, M., Balasubramanian, M., Gould, K.L., del Rey, F. y de Aldana, C.R.V. (2005). 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.
- Martín-García, R. y Valdivieso, M.H. (2006). 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.
- Martín-García, R., Coll, P.M. y Pérez, P. (2014). F-BAR domain protein Rga7 collaborates with Cdc15 and Imp2 to ensure proper cytokinesis in fission yeast. *J Cell Sci.* doi:10.1242/jcs.146233
- Maudrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130.
- May, K.M., Watts, F.Z., Jones, N. y Hyams, J.S. (1997). Type II myosin involved in cytokinesis in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton.* **38**, 385-396.
- Mazanka, E., Alexander J., Yeh B.J., Charoenpong, D.M. Lowery, Yaffe M. y Weiss E.L. (2008). The NDR/LATS family kinase P. e Cbk1 directly controls transcriptional asymmetry. *PLoS Biol.* **6**, 1778-1790.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., y Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5671–5681.
- Mazur, P. y Baginsky, W. (1996). In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* **271**, 14604–14609.
- Nielsen, J. B. y Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* **15**, 5671–5681.
- Mehta, S. y Gould, K. L. (2006). Identification of functional domains within the septation initiation network kinase, Cdc7. *J Biol Chem.* **281**, 9935–9941.
- Meitinger, F. Palani, S. y Pereira, G. (2012). The power of MEN in cytokinesis. *Cell Cycle.* **11**, 219–228.
- Meitinger, F., Petrova, B., Lombardi, I.M., Bertazzi, D.T., Hub, B., Zentgraf, H. y Pereira, G. (2010). Targeted localization of Inn1, Cyk3 and Chs2 by the mitotic-exit network regulates cytokinesis in budding yeast. *J Cell Sci.* **123**, 1851–1861.

- Mendoza, M., Redemann, S. y Brunner, D. (2005). The fission yeast MO25 protein functions in polar growth and cell separation. *Eur J Cell Biol.* **84**, 915–926.
- Minet, M., Nurse, P., Thuriaux, P. y Mitchison, J. M. (1979). Uncontrolled septation in a cell division cycle mutant of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* **137**, 440–446.
- Mishra, M. y Oliferenko, S. (2008). Cytokinesis: catch and drag. *Curr Biol.* **18**, R247–R250.
- Mishra, M., Huang, J. y Balasubramanian, M.K. (2014). The yeast actin cytoskeleton. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 213–227.
- Mishra, M., Karagiannis, J., Sevugan, M., Singh, P. y Balasubramanian, M. K. (2005). The 14-3-3 protein rad24p modulates function of the cdc14p family phosphatase clp1p/flp1p in fission yeast. *Curr Biol.* **15**, 1376–1383.
- Mishra, M., Karagiannis, J., Trautmann, S., Wang, H., McCollum, D. y Balasubramanian, M.K. (2004). The Clp1p/Flp1p phosphatase ensures completion of cytokinesis in response to minor perturbation of the cell division machinery in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* **117**, 3897–3910.
- Mitchison, J.M. (1957). The growth of single cells. I. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res.* **13**, 244–262.
- Mitchison, J. M. y Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* **75**, 357–376.
- Mizuguchi, S., Uyama, T., Kitagawa, H., Nomura, K.H., Dejima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Sugahara, K. y Nomura, K. (2003). Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **423**, 443–448.
- Moreau, V., Madania, A., Martin, R.P. y Winson, B. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* **134**, 117–132.
- Moreno, M.B., Durán, A. y Ribas, J.C. (2000). A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* **16**, 861–872.
- Moreno, S., Klar, A. y Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795–823.
- Morrell, J.L., Tomlin, G.C., Rajagopalan, S., Venkatram, S., Feoktistova, A.S., Tasto, J.J., Mehta, S., Jennings, J.L., Link, A., Balasubramanian, M.K., et al. (2004). Sid4p-Cdc11p assembles the septation initiation network and its regulators at the *Schizosaccharomyces pombe* SPB. *Curr Biol.* **14**, 579–584.
- Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A. y Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature.* **459**, 857–860.

- Motegi, F., Arai, R. y Mabuchi, I.** (2001). 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.
- Motegi, F., Nakano, K. y Mabuchi, I.** (2000). Molecular mechanism of myosin-II assembly at the division site in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* **113**, 1813–1825.
- Motegi, F., Mishra, M., Balasubramanian, M.K. y Mabuchi, I.** (2004). Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by Mid1 in fission yeast. *The J Cell Biol.* **165**, 685–695.
- Mulvihill, D.P., Edwards, S.R. y Hyams, J. S.** (2006). 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.
- Mulvihill, D.P., Pollard, P.J., Win, T.Z. y Hyams, J.S.** (2001). Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast. *Curr Biol.* **11**, 1124–1127.
- Muñoz, J., Cortés, J.C.G., Sipiczki, M., Ramos, M., Clemente-Ramos, J. A., Moreno, M.B., et al.** (2013). Extracellular cell wall  $\beta(1,3)$ glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J Cell Biol.* **203**, 265–282.
- Muñoz, J.,** (2012). *Funciones esenciales de la  $\beta$ -glucán sintasa Bgs4p en la integridad celular y la citocinesis Schizosaccharomyces pombe.* Tesis doctoral impresa. Dirigida por Juan Carlos Ribas Elcorobarrutia y Juan Carlos García Cortés. Universidad de Salamanca.
- Muñoz, S., Manjón, E. y Sánchez, Y.** (2014). The putative exchange factor Gef3p interacts with Rho3p GTPase and the septin ring during cytokinesis in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **289**, 21995–22007.
- Murone, M. y Simanis, V.** (1996). The fission yeast *dma1* gene is a component of the spindle assembly checkpoint, required to prevent septum formation and premature exit from mitosis if spindle function is compromised. *EMBO J.* **15**, 6605–6616.
- Mutoh, T. K., Nakano y Mabuchi, I.** (2005). 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**, 1189–1202.
- Nakano, K., Arai, R. y Mabuchi, I.** (1997). 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.
- Nakano, K., Mutoh, T. y Mabuchi, I.** (2001). Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells.* **6**, 1031–1042.

- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. y Mabuchi, I. (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells*. **8**, 357–370.
- Nakano, K., Toya, M., Yoneda, A., Asami, Y., Yamashita, A., Kamasawa, N., Osumi, M. y Yamamoto, M. (2011). Pob1 Ensures Cylindrical Cell Shape by Coupling Two Distinct Rho Signaling Events During Secretory Vesicle Targeting. *Traffic*. **12**, 726–739.
- Nelson, B., Kurischko, C., Horecka, J., Mody, M., Nair, P., Pratt, L., Zougman, A., McBroom, L.D.B., Hughes, T.R., Boone, C., et al. (2003). RAM: a conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Mol Biol Cell*. **14**, 3782–3803.
- Nicolson, G.L., Blaustein, J. y Etzler, M.E. (1974). Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry*. **13**, 196–204.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. **256**, 547–551.
- Nurse, P., Thuriaux, P. y Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. **146**, 167–178.
- Nurse, P. y Bissett, Y. (1981). Gene required in G<sub>1</sub> for commitment to cell cycle and in G<sub>2</sub> for control of mitosis in fission yeast. *Nature*. **292**, 558–560.
- Oh, Y., Chang K.-J., Orlean P., Wloka, C., Deshaies, R. y Bi, E. (2012). Mitotic exit kinase Dbf2 directly phosphorylates chitin synthase Chs2 to regulate cytokinesis in budding yeast. *Mol Biol Cell*. **23**, 2445–2456.
- Ohashi, T., Nakakita, S. I., Sumiyoshi, W. y Takegawa, K. (2010). Production of heterologous glycoproteins by a glycosylation-defective alg3och1 mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biotechnol*. **150**, 348–356.
- Oliferenko, S., Chew, T. G. y Balasubramanian, M. K. (2009). Positioning cytokinesis. *Genes Dev*. **23**, 660–674.
- Orlean, P. (2012). Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*. **192**, 775–818.
- Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*. **29**, 207–233.
- Ottillie, S., Miller, P. J., Johnson, D. I., Creasy, C. L., Sells, M. A., Bagrodia, S., Forsburg, S. L. y Chernoff, J. (1995). Fission yeast *pak1<sup>+</sup>* encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *EMBO J*. **14**, 5908–5919.
- Padmanabhan, A., Bakka, K., Sevugan, M., Naqvi, N. I., D'souza, V.,

- Tang, X., Mishra, M. y Balasubramanian, M. K.** (2011). IQGAP-related Rng2p organizes cortical nodes and ensures position of cell division in fission yeast. *Curr Biol.* **21**, 467–472.
- Padte, N.N., Martin, S.G., Howard, M. y Chang, F.** (2006). The cell-end factor pom1p inhibits mid1p in specification of the cell division plane in fission yeast. *Curr Biol.* **16**, 2480–2487.
- Paoletti, A. y Chang, F.** (2000). Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell.* **11**, 2757–2773.
- Papadopoulou, K., S.S. Ng, H., Ohkura, M. Geymonat, S.G. Sedgwick y McInerney, C.J.** (2008). Regulation of gene expression during M-G1-phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors. *J Cell Sci* **121**, 38–47.
- Petersen, J. y Nurse, P.** (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol.* **9**, 1263–1272.
- Pérez, P. y Rincón, S.A.** (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J.* **426**, 243–253.
- Pérez, P., Portales, E. y Santos, B.** (2015). Rho4 interaction with exocyst and septins regulates cell separation in fission yeast. *Microbiology (Reading, England)*. doi:10.1099/mic.0.000062
- Petersen, J., Weilguny D., Egel, R. y Nielsen, O.** (1995). Characterization of fus1 of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3697–3707.
- Petersen, J., Nielsen O., Egel, R. y Hagan I.M.** (1998). FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J. Cell Biol.* **141**, 1217–1228.
- Pichova, A., Kohlwein, S.D., y Yamamoto, M.** (1995). New arrays of cytoplasmic microtubules in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Protoplasma.* **188**, 252–257.
- Piel, M. y Tran, P.T.** (2009). Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr Biol.* **19**, R823–R827.
- Pinar, M., Coll, P.M., Rincón, S.A. y Pérez, P.** (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell.* **19**, 1727–1738.
- Pittet, M., y Conzelmann, A.** (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1771**, 405–420.
- Pollard, L.W., Onishi, M., Pringle, J.R. y Lord, M.** (2012). Fission yeast Cyk3p is a transglutaminase-like protein that participates in cytokinesis and

- cell morphogenesis. *Mol Biol Cell*. **23**, 2433–2444.
- Pollard, T.D. (2010). Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol*. **22**, 50–56.
- Proctor, S.A., Minc, N., Boudaoud, A. y Chang, F. (2012). Contributions of turgor pressure, the contractile ring, and septum assembly to forces in cytokinesis in fission yeast. *Curr Biol*. **22**, 1601–1608.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E. y Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*. **272**, 279–281.
- Rachfall, N., Johnson, A.E., Mehta, S., Chen, J.S., y Gould, K.L. (2014). Cdk1 promotes cytokinesis in fission yeast through activation of the septation initiation network. *Mol. Biol. Cell*. **25**, 2250–2259.
- Rajagopalan, S., Wachtler, V. y Balasubramanian, M. (2003). Cytokinesis in fission yeast: a story of rings, rafts and walls. *Trends Genet*. **19**, 403–408.
- Ramos, M., (2014). *La  $\beta(1,3)$ Glucán sintasa Bgs1 es esencial en el control de la polaridad celular y la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe**. Tesis doctoral impresa. Dirigida por Juan Carlos Ribas Elcorobarrutia y Juan Carlos García Cortés. Universidad de Salamanca
- Ray, S., Kume, K., Gupta, S., Ge, W., Balasubramanian, M., Hirata, D. y McCollum, D. (2010). The mitosis-to-interphase transition is coordinated by cross talk between the SIN and MOR pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol*. **190**, 793–805.
- Ray, S., (2010). *Elucidation of the Multi-Faceted Roles of the SIN (Septation Initiation Network); Understanding How the SIN Promotes Cytokinesis and Inhibits Interphase Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*: A Dissertation*. University of Massachusetts Medical School. GSBS Dissertations and Theses. Paper 482.
- Ribas, J.C., Diaz, M., Durán, A. y Pérez, P. (1991). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3) $\beta$ -D-glucan. *J Bacteriol*. **173**, 3456–3462.
- Rincón, S.A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M.A., Santos, B., Martin, S.G. y Pérez, P. (2009). Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **20**, 4390–4399.
- Rincón, S.A., Estravís, M. y Pérez, P. (2014). Cdc42 regulates polarized growth and cell integrity in fission yeast. *Biochem Soc Trans*. **42**, 201–205.
- Roberts-Galbraith, R.H., Chen, J.S., Wang, J. y Gould, K.L. (2009). The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *J Cell Biol*. **184**, 113–127.
- Roberts-Galbraith, R.H., y Gould, K. L. (2010). Setting the F-BAR: functions

---

and regulation of the F-BAR protein family. *Cell Cycle*. **9**, 4091–4097.

- Roberts-Galbraith, R.H., Ohi, M.D., Ballif, B.A., Chen, J.S., McLeod, I., McDonald, W.H., Gygi, S.P., Yates, J.R. y Gould, K.L.** (2010). Dephosphorylation of F-BAR protein Cdc15 modulates its conformation and stimulates its scaffolding activity at the cell division site. *Mol Cell*. **39**, 86–99.
- Rosenberg, J.A., Tomlin, G.C., McDonald, W.H., Snyderman, B.E., Muller, E.G., Yates, J.R. y Gould, K.L.** (2006). Ppc89 links multiple proteins, including the septation initiation network, to the core of the fission yeast spindle-pole body. *Mol Biol Cell*. **17**, 3793–3805.
- Ruiz-Herrera, J. y Ortiz-Castellanos, L.** (2010). Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res*. **10**, 225–243.
- Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lió, P., Penkett, C. J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P. y Bähler, J.** (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet*. **36**, 809–817.
- Salimova, E., Sohrmann, M., Fournier, N. y Simanis, V.** (2000). The *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* *mob1* gene is essential and functions in signalling the onset of septum formation. *J Cell Sci*. **113**, 1695–1704.
- Sambrook, J. y Russell, D.W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Madrid, M., Viana, R.A., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P. y Cansado, J.** (2014). Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS ONE*. **9**:e88020.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463–5467.
- Santos, B., Gutiérrez, J., Calonge, T.M. y Pérez, P.** (2003). Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. **2**, 521–533.
- Santos, B., Martín-Cuadrado, A.B., Vázquez de Aldana, C.R., del Rey, F. y Pérez, P.** (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell*. **4**, 1639–1645.
- Saputo, S., Chabrier-Rosello, Y., Luca, F.C., Kumar, A. y Krysan, D.J.** (2012). The RAM network in pathogenic fungi. *Eukaryot Cell*. **11**, 708–717.
- Sawin, K.E.** (1999). Some thoughts about microtubules and cell polarity in fission yeast. *Fungal Genet Biol*. **27**, 224–230.
- Sawin, K.E. y Nurse, P.** (1998). Regulation of cell polarity by microtubules in fission yeast. *J. Cell Biol*. **142**, 457–471.



- Sawin, K.E. y Snaith, H.A. (2004). Role of microtubules and tea1p in establishment and maintenance of fission yeast cell polarity. *J. Cell. Sci.* **117**, 689–700.
- Schmidt, M., Bowers, B., Varma, A., Roh, D.H. y Cabib, E. (2002). In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J Cell Sci.* **115**, 293–302.
- Schmidt, S., Sohrmann, M., Hofmann, K., Woollard, A. y Simanis, V. (1997). The Spg1p GTPase is an essential, dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **11**, 1519–1534.
- Sells, M. A., Barratt, J.T., Caviston, J., Otilie, S., Leberer, E. y Chernoff, J. (1998). Characterization of Pak2p, a pleckstrin homology domain-containing, p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem.* **273**, 18490–18498.
- Sengar, A. S., Markley, N. A., Marini, N. J. y Young, D. (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* **17**, 3508–3519.
- Seshan, A. y Amon, A. (2004). Linked for life: temporal and spatial coordination of late mitotic events. *Curr Opin Cell Biol.* **16**, 41–48.
- Sharifmoghadam, M.R. y Valdivieso, M.H. (2009). 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.
- Sietsma, J.H. y Wessels, JG. (1990). The occurrence of glucosaminoglycan in the wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol.* **136**, 2261–2265.
- Simanis, V. (2003). Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J Cell Sci.* **116**, 4263–4275.
- Simanis, V. (2015). Pombe's thirteen - control of fission yeast cell division by the septation initiation network. *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.094821
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* **1**, 1011.1–1011.4
- Sipiczki, M. (2007). Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Res.* **7**, 761–770.
- Sipiczki, M. y Bozsik, A. (2000). The use of morphomutants to investigate septum formation and cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol.* **174**, 386–392.
- Sirotkin, V., Beltzner, C.C., Pollard, T.D. (2005). Interactions of WASp,

- myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J Cell Biol.* **170**, 637–648.
- Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L. y Pollard, T.D.** (2010). Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Mol Biol Cell.* **21**, 2894–2904.
- Skau, C.T., Neidt, E.M. y Kovar, D.R.** (2009). Role of tropomyosin in formin-mediated contractile ring assembly in fission yeast. *Mol Biol Cell.* **20**, 2160–2173.
- Snaith, H.A. y Sawin, K.E.** (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature.* **423**, 647–651.
- Snaith, H.A. y Sawin, K.E.** (2005). Tea for three: control of fission yeast polarity. *Nat Cell Biol.* **7**, 450–451.
- Snaith, H.A., Thompson, J., Yates, J.R. y Sawin, K.E.** (2011). Characterization of Mug33 reveals complementary roles for actin cable-dependent transport and exocyst regulators in fission yeast exocytosis. *J Cell Sci.* **124**, 2187–2199.
- Sohrmann, M., Fankhauser, C., Brodbeck, C. y Simanis, V.** (1996). The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev.* **10**, 2707–2719.
- Sohrmann, M., Schmidt, S., Hagan, I. y Simanis, V.** (1998). Asymmetric segregation on spindle poles of the *Schizosaccharomyces pombe* septum-inducing protein kinase Cdc7p. *Genes Dev.* **12**, 84–94.
- Song, K., Mach, K.E., Chen, C.Y., Reynolds, T. y Albright, C.F.** (1996). A novel suppressor of *ras1* in fission yeast, *byr4*, is a dosage-dependent inhibitor of cytokinesis. *J Cell Biol.* **133**, 1307–1319.
- Sparks, C.A., Morphew, M. y McCollum, D.** (1999). Sid2p, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis. *J Cell Biol.* **146**, 777–790.
- Streiblova, E., Hasek, J. y Jelke, E.** (1984). Septum pattern in ts mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in genes *cdc3*, *cdc4*, *cdc8* and *cdc12*. *J Cell Sci.* **69**, 47–65.
- Sugawara, T., Sato, M., Takagi, T., Kamasaki, T., Ohno, N. y Osumi, M.** (2003). In situ localization of cell wall alpha-1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc.* **52**, 237–242.
- Sugawara, T., Takahashi, S., Osumi, M. y Ohno, N.** (2004). Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* **339**, 2255–2265.
- Sugiura, R., Sio, S. O., Shuntoh, H. y Kuno, T.** (2002). Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells.* **7**, 619–627.

- Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H. y Kuno, T. (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*. **399**, 479–483.
- Tajadura, V., García, B., García, I., García, P. y Sánchez, Y. (2004). *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall  $\beta$ -glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J Cell Sci.* **117**, 6163–6174.
- Takeda, T. y Chang, F. (2005). Role of fission yeast myosin I in organization of sterol-rich membrane domains. *Curr Biol.* **15**, 1331–1336.
- Tanaka, K., Petersen, J., MacIver, F., Mulvihill, D.P., Glover, D.M. y Hagan, I.M. (2001). The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **20**, 1259–1270.
- Tasto, J. J., Morrell, J. L. y Gould, K. L. (2003). An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol.* **160**, 1093–1103.
- Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R. y Shiozaki, K. (2008). Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr Biol.* **18**, 322–330.
- Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. y Kuno, T. (1996). The fission yeast *pmk1<sup>+</sup>* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol* **16**, 6752–6764.
- Toda, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M. (1993). 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.
- Tomlin, G. C., Morrell, J.L. y Gould, K.L. (2002). The spindle pole body protein Cdc11p links Sid4p to the fission yeast septation initiation network. *Mol Biol Cell.* **13**, 1203–1214.
- Tran, P.T., Marsh, L., Doye, V., Inoué, S. y Chang, F. (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol.* **153**, 397–411.
- Trautmann, S., Wolfe, B. A., Jorgensen, P., Tyers, M., Gould, K.L. y McCollum, D. (2001). Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G<sub>2</sub>/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Curr Biol.* **11**, 931–940.
- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T. y Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol.* **153**, 269–279.
- Valdivieso, M. H., Durán, A. y Roncero, C. (2004). Chitin biosynthesis and

---

morphogenetic processes. In *The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd Edition, R. Brambl, and G.A. Marzluf, eds. (Berlin-Heidelberg, Springer Verlag), 269-279.

- Vavylonis, D., Wu, J.Q., Hao, S., O'Shaughnessy, B. y Pollard, T.D. (2008). Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science*. **319**, 97-100.
- Verde, F. y Wiley, D. (1998). Fission yeast *orb6*, a ser/thr protein kinase related to mammalian rho kinase and myotonic dystrophy kinase, is required for maintenance of cell polarity and coordinates cell morphogenesis with the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 7526-7531.
- Verde, F., Mata, J. y Nurse, P. (1995). Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *J Cell Biol*. **131**, 1529-1538.
- Viana, R. A., Pinar, M., Soto, T., Coll, P. M., Cansado, J. y Pérez, P. (2013). Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics*. **195**, 421-432.
- Wachtler, V. y Balasubramanian, M. K. (2006). Yeast lipid rafts? — an emerging view. *Trends Cell Biol*. **16**, 1-4.
- Wachtler, V., Huang, Y., Karagiannis, J. y Balasubramanian, M. K. (2006). Cell cycle-dependent roles for the FCH-domain protein Cdc15p in formation of the actomyosin ring in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. **17**, 3254-3266.
- Wachtler, V., Rajagopalan, S. y Balasubramanian, M. K. (2003). Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*. **116**, 867-874.
- Wang, H., Oliferenko, S. y Balasubramanian, M. K. (2003a). Cytokinesis: relative alignment of the cell division apparatus and the mitotic spindle. *Curr Opin Cell Biol*. **15**, 82-87.
- Wang, H., Tang, X. y Balasubramanian, M. K. (2003b). Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. **164**, 1323-1331.
- Wang, H., Tang, X., Liu, J., Trautmann, S., Balasundaram, D., McCollum, D. y Balasubramanian, M. K. (2002). The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. **13**, 515-529.
- Wang, N., Wang, M., Zhu, Y.H., Grosel, T.W., Sun, D., Kudryashov, D.S. y Wu J.Q. (2015). The Rho-GEF Gef3 interacts with the septin complex and activates the GTPase Rho4 during fission yeast cytokinesis. *Mol. Biol. Cell*. **26**, 238-255.
- Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. y Strahl, S. (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission

- yeast. *Mol Microbiol.* **57**, 156–170.
- Willet, A.H., McDonald, N.A. y Gould, K.L. (2015a). Regulation of contractile ring formation and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Opin. Microbiol.* **28**, 46–52.
- Willet, A.H., McDonald, N.A., Bohnert, K.A., Baird, M.A., Allen, J.R., Davidson, M.W. y Gould, K.L. (2015b). The F-BAR Cdc15 promotes contractile ring formation through the direct recruitment of the formin Cdc12. *J. Cell Biol.* **208**, 391–399.
- Win, T. Z., Gachet, Y., Mulvihill, D. P., May, K. M. y Hyams, J. S. (2001). 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.
- Winter, D., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. y Li, R. (1997). The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol.* **7**, 519–529.
- Wolfe, B. A. y Gould, K. L. (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G<sub>2</sub>/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *EMBO J.* **23**, 919–929.
- Wolfe, B. A. y Gould, K. L. (2005). Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol.* **15**, 10–18.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* **415**, 871–880.
- Wu, J.Q. y Pollard, T. D. (2005). Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science.* **310**, 310–314.
- Wu, J.Q., Kuhn, J. R., Kovar, D.R. y Pollard, T.D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell.* **5**, 723–734.
- Wu, J.Q., Sirotkin, V., Kovar, D.R., Lord, M., Beltzner, C.C., Kuhn, J.R. y Pollard, T.D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol.* **174**, 391–402.
- Xu, X. y Vogel, B. E. (2011). A secreted protein promotes cleavage furrow maturation during cytokinesis. *Curr Biol.* **21**, 114–119.
- Yanagida, M. (2002). The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* **3**, 2003.1–2003.4
- Yang, P., Kansra, S., Pimental, R. A., Gilbreth, M. y Marcus, S. (1998). Cloning and characterization of *shk2*, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem.* **273**, 18481–18489.

- 
- Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X. y Marcus, S. (2003).** The novel Rho GTPase-activating protein family protein, Rga8, provides a potential link between Cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* **278**, 48821–48830.
- Zaitsevskaya-Carter, T. y Cooper, J.A. (1997).** Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **16**, 1318–1331.