



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Regulación de la citoquinesis por Rgf1 y la ruta de integridad

TESIS DOCTORAL

Tomás Edreira González

2019



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y GENÓMICA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



Yolanda Sánchez Martín, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **Regulación de la citoquinesis por Rgf1 y la ruta de integridad** presentada por D. Tomás Edreira González para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, dentro del programa de Doctorado en Biología Funcional y Genómica, ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca (USAL) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expido el presente certificado en Salamanca, a 21 de octubre de 2019.

Dra. Yolanda Sánchez Martín

ÍNDICE

Introducción	1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> : organismo modelo para el estudio del ciclo y la morfogénesis celular	1
Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	2
Ciclo celular y ciclo morfogénético de <i>S. pombe</i>	3
Citoquinesis	4
Establecimiento del plano de división.....	5
Ensamblaje del anillo contráctil.....	7
Maduración del CAR	9
Constricción del anillo	10
Síntesis del septo	12
Separación celular.....	15
Ruta de inicio de septación, SIN	15
Checkpoint de citoquinesis	18
GTPasas de la familia Rho	19
Regulación de las GTPasas de la familia Rho	20
La GTPasa Rho1	21
Regulación de Rho1.....	23
GEFs de Rho1	23
Rgf3.....	25
Rgf2.....	26
Rgf1, principal GEF de la GTPasa Rho1.....	26
Rgf1 es necesario en el mantenimiento de la integridad celular y crecimiento bipolar	27
Rgf1 participa en la tolerancia al estrés replicativo.....	28
Rgf1 está involucrado en la reparación de daño en el DNA.....	29
Rgf1 es un activador de la ruta de integridad celular	30
Respuesta celular a estrés: Rutas de MAPK.....	31
Ruta de integridad celular, CIP	33
Sensores y reguladores positivos	34
Vías de activación de Pmk1	36

Efectores y reguladores negativos	37
Ruta de respuesta a estrés, SAPK	39
Objetivos	43
Resultados	45
Rgf1 se localiza junto al anillo contráctil de actomiosina	45
La localización de Rgf1 en el septo depende de su interacción con los componentes del CAR.....	48
El blankophor produce un retraso de la citoquinesis ausente en parte en el mutante <i>rgf1Δ</i>	52
El inicio de la septación y de la constricción del CAR están desacoplados en presencia de blankophor	57
El blankophor retrasa específicamente el inicio de la constricción del CAR	59
La ruta de integridad celular es necesaria para retrasar la constricción del CAR en respuesta a blankophor.....	64
componentes de la ruta CIP que participan en la respuesta a blankophor.....	67
Otros estreses que activan la ruta CIP también retrasan la constricción del CAR	68
El blankophor, la caspofungina, la cafeína y el KCl inducen defectos de separación celular en el mutante <i>pmk1Δ</i>	72
Relación de la miosina con el retraso causado por el estrés en septación.....	75
Relación de la actina con el retraso causado por el estrés en septación.....	77
Clp1 y el <i>checkpoint</i> de citoquinesis frente al bloqueo por blankophor	79
La ruta SIN como mediador del bloqueo del CAR frente al estrés en septación	83
Discusión	91
Conclusiones	101
Materiales y Métodos	103
Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	103
Métodos genéticos.....	106
Conjugación.....	106
Aislamiento de ascosporas al azar.....	107
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	107
Condiciones de cultivo	108
Inducción de estrés	109
Ensayo de crecimiento en gota	109

Microscopía de fluorescencia.....	110
Tinción de blankophor.....	110
Time-Lapse	111
Análisis y presentación de datos.....	112
Análisis de imágenes	112
Representación gráfica y análisis de datos	113
Bibliografía	115

ACRÓNIMOS

AMP	Adenosín monofosfato
BP	Blankophor
CAR	Anillo contráctil de actomiosina (<i>Contractile actomyosin ring</i>)
CDK	Kinasa Dependiente de Ciclina (<i>Cyclin dependent kinase</i>)
CIP	Ruta de integridad celular (<i>Cell integrity pathway</i>)
CNH	Dominio con homología a la kinasa Citron (<i>Citron kinase homology</i>)
CPT	Camptotecina
Csp	Caspofungina
DEM	Malonato de dietilo (<i>Diethyl maleate</i>)
DEP	Dominio con homología a <i>Dishevelled</i> , <i>Egl-10</i> y <i>Pleckstrin</i>
DH	Dominio con homología a <i>Dbl</i> (<i>Dbl homology</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad Óptica
DSB	Roturas de doble cadena (<i>Double-strand break</i>)
F-BAR	<i>Fes/CIP4 homology-Bin/Amphiphysin/Rvs</i>
FH2	Dominio con homología a formina (<i>Formin homology 2</i>)
GAP	Activador de la actividad GTPasa (<i>GTPase activating protein</i>)
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP (<i>GDP dissociation inhibitor</i>)
GEF	Factor intercambiador de guanina (<i>Guanine exchange factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Guanina 5' trifosfato
HR	Recombinación Homóloga (<i>Homologous recombination</i>)
HU	Hidroxiurea
IQGAP	Proteína con motivo IQ (Iso/Leu y Gln) y dominio GAP
LatA	Latrunculina A
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKK	MAP kinasa kinasa
MAPKKK	MAP kinasa kinasa kinasa

MBC	Metil benzimidazol-2-ilcarbamato
MEA	Medio agar extracto de malta (<i>Malt extract agar</i>)
miRNA	Micro RNA
MM	Medio Mínimo
MOR	Ruta de morfogénesis (<i>Morphogenesis Orb6 network</i>)
mRNA	RNA mensajero
NES	Secuencia de Exporte Nuclear (<i>Nuclear export signal</i>)
NETO	Inicio del crecimiento por el polo nuevo (<i>New end take off</i>)
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (<i>Non homologous end joining</i>)
NLS	Secuencia de localización nuclear (<i>Nuclear localization sequence</i>)
OETO	Inicio del crecimiento por el polo viejo (<i>Old end take off</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PH	Dominio con homología a <i>Pleckstrin</i> (<i>Pleckstrin homology</i>)
Phl	Fleomicina
PKC	Proteína kinasa C (<i>Protein kinase C</i>)
PDK	Kinasa dependiente de fosfoinosítidos (<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
SAPK	Ruta de respuesta a estrés (<i>Stress activated protein kinase</i>)
SCPR	Modelo de búsqueda, captura, tirón y liberación (<i>Search, capture, pull and release</i>)
SD	Desviación estándar (<i>Standard deviation</i>)
SH3	Dominio con homología a Src (<i>Src homology domain 3</i>)
SIN	Ruta de inicio de la septación (<i>Septation initiation network</i>)
SPB	Cuerpo polar del huso (<i>Spindle Pole Body</i>)
β GS	β -Glucán sintasa
t-BOOH	Hidroperóxido de terc-butilo (<i>tert-butyl hydroperoxide</i>)
TOR	Ruta diana de rapamicina (<i>Target of rapamycin</i>)
UV	Ultravioleta
vic	Viable en presencia de inmunosopresor e iones cloruro (<i>viable in the presence of immunosuppressant and chlorine ion</i>)
YES	Medio rico para <i>S. pombe</i> (<i>Yeast extract supplemented</i>)

INTRODUCCIÓN

***Schizosaccharomyces pombe*: ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL CICLO Y LA MORFOGÉNESIS CELULAR**

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* es un hongo unicelular perteneciente al filo Ascomycota, que se definen por la presencia de un asca o saco que contiene las esporas de germinación en su interior. Fue descrita por primera vez por P. Lindner en 1893, quién la aisló de una cerveza de mijo del este de África. Su nombre taxonómico para el género hace referencia a que se trata de una levadura (-saccharomyces) y que se divide por fisión (schizo-) (**Figura 1**). En cuanto a la especie, la palabra *pombe* proviene del vocablo suajili para cerveza. La mayoría de cepas, tanto silvestres como mutantes, empleadas hoy en día en el laboratorio derivan de una especie homotálica h^{90} aislada en Francia en 1921 por A. Ostewalder a partir de mosto, de la que se obtuvieron posteriormente cepas heterotálicas con dos tipos sexuales opuestos, h^+ y h^- (Egel 2013). En la década de 1940 Urs Leupold caracterizó genéticamente a *S. pombe*, gracias al aislamiento de mutantes en diversos procesos y la elaboración de los primeros mapas cromosómicos.

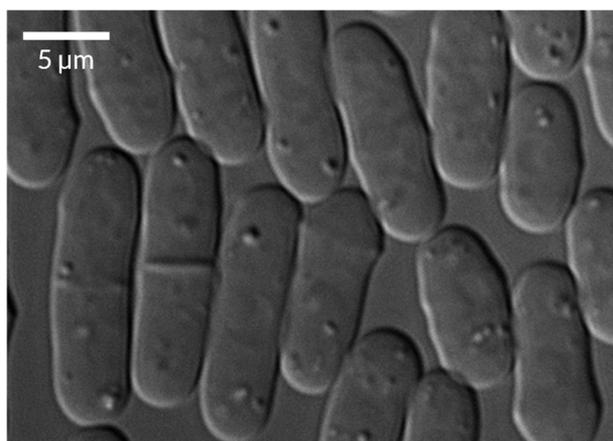


Figura 1 Imagen de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* obtenida por microscopía Nomarski.

Entre los años 1950 y 1970 Murdoch Mitchison identificó en la fisiología de *S. pombe* un buen modelo para desarrollar sus estudios sobre el crecimiento y la división celular (Fantes & Hoffman 2016). Ya en la década de 1970 Paul Nurse combinó el empleo de los métodos genéticos de Leupold con el trabajo sobre crecimiento de Mitchison para describir el control del ciclo celular y la existencia de un mecanismo de control universal en eucariotas (Nurse 1990). *S. pombe* es fácil de manipular en el laboratorio, no es patógeno, presenta un ciclo de vida y un ciclo sexual de corta duración y es susceptible de análisis genético clásico y molecular (Hoffman *et al.* 2015; Lock *et al.* 2019).

Ciclo de vida de *S. pombe*

S. pombe es un organismo con un ciclo de vida haplodiplonte (Figura 2). Durante la fase haploide las células presentan una forma cilíndrica, y al nacer tienen un tamaño aproximado de 4 μm de diámetro y 7-8 μm de longitud. Durante el crecimiento las células mantienen un diámetro constante y aumentan en longitud hasta alcanzar 14 μm , que es el tamaño al que se dividen.

La reproducción vegetativa se produce por fisión transversal mediante la formación de un septo perpendicular al eje mayor de la célula, que tras la citoquinesis se disuelve dando lugar a dos células hijas de idéntico tamaño. Las cepas de *S. pombe* utilizadas en el laboratorio se pueden mantener de forma continua en estado haploide, distinguiendo dos tipos sexuales, h^+ y h^- (Leupold 1949).

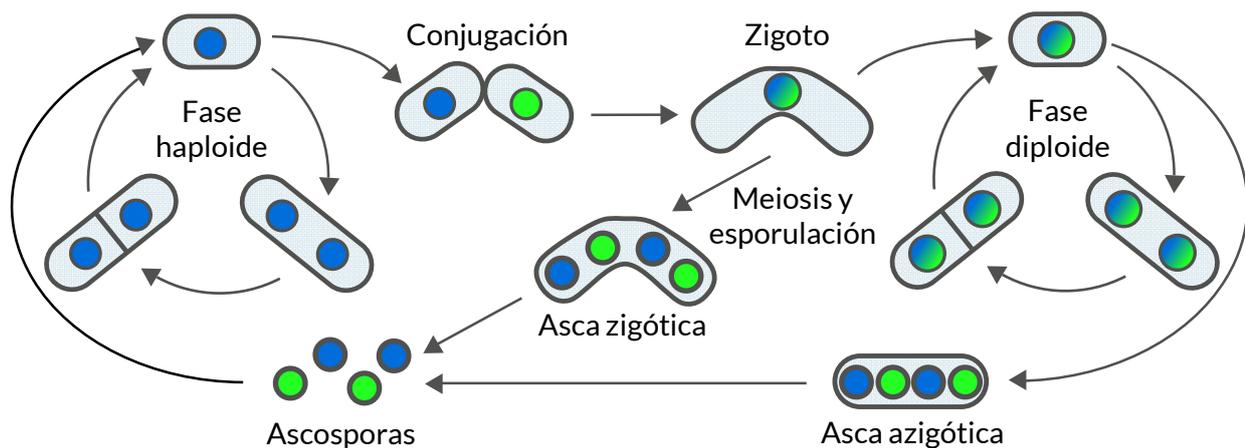


Figura 2 Ciclo de vida haplodiplonte de *Schizosaccharomyces pombe*. Adaptada de (Sabatinos & Forsburg 2010).

En medios desfavorables, especialmente carentes de nitrógeno, las células haploides secretan feromonas características de su tipo sexual y producen receptores para la hormona del tipo sexual complementario, cuya unión, de haber células de ambos tipos sexuales, desencadena el proceso de conjugación. Éste comienza con la formación de una proyección denominada *shmoo* en un extremo de la célula hacia la célula de tipo sexual complementario hasta que ambas entran en contacto y se fusionan para formar un cigoto diploide (Merlini *et al.* 2013).

Estos cigotos son células inestables que en medios pobres entran en meiosis, aunque pueden ser mantenidos como células diploides si se reinoculan inmediatamente en un medio rico; estas células diploides presentan un tamaño mayor que las haploides, siendo de 11-14 μm de longitud al formarse y de 20-25 μm antes de la división. Si no se mantienen como células diploides se desencadena el proceso meiótico que da lugar a cuatro núcleos haploides, cada uno de los cuales quedará incluido en el interior de una espora, y éstas a su vez en el interior de un asca zigótica. Finalmente, la pared del asca se rompe liberando las cuatro esporas haploides, que permanecerán latentes hasta encontrar las condiciones favorables para germinar, reiniciando así el ciclo (Yamashita *et al.* 2017).

Ciclo celular y ciclo morfogénico de *S. pombe*

En *S. pombe* el crecimiento se produce de forma polarizada y asimétrica, y está coordinado temporalmente con la progresión del ciclo celular. En condiciones normales de crecimiento las células de *S. pombe* presentan un ciclo celular eucariota típico que comprende las fases G₁, S, G₂ y la fase M.

La fase G₁ es muy corta y supone un intervalo entre la mitosis y la replicación de los cromosomas caracterizado por la síntesis de RNA y proteínas necesarias para la duplicación del DNA. En este punto, si la disponibilidad de nutrientes es limitada, las células pueden iniciar el ciclo sexual; en caso contrario entran en fase S, comenzando la replicación del DNA de forma simultánea en varios puntos del genoma (Harigaya & Yamamoto 2007).

La fase G₂ es la más amplia dentro del ciclo celular y llega a abarcar hasta el 70% del ciclo. Tras la división celular, las células inician el crecimiento por el polo viejo, aquel que ya existía en la célula madre antes de la división. A este momento en el que las células crecen por un único polo se le conoce con el nombre de OETO (*Old End Take Off*). El crecimiento monopolar continúa hasta un punto de la fase G₂ en el que se activa el crecimiento por el polo nuevo (aquel generado durante la división celular). Tras esta transición conocida como NETO (*New End Take Off*) la célula incrementa su tamaño mediante la extensión de ambos polos por igual (Mitchison & Nurse 1985) (**Figura 3**).

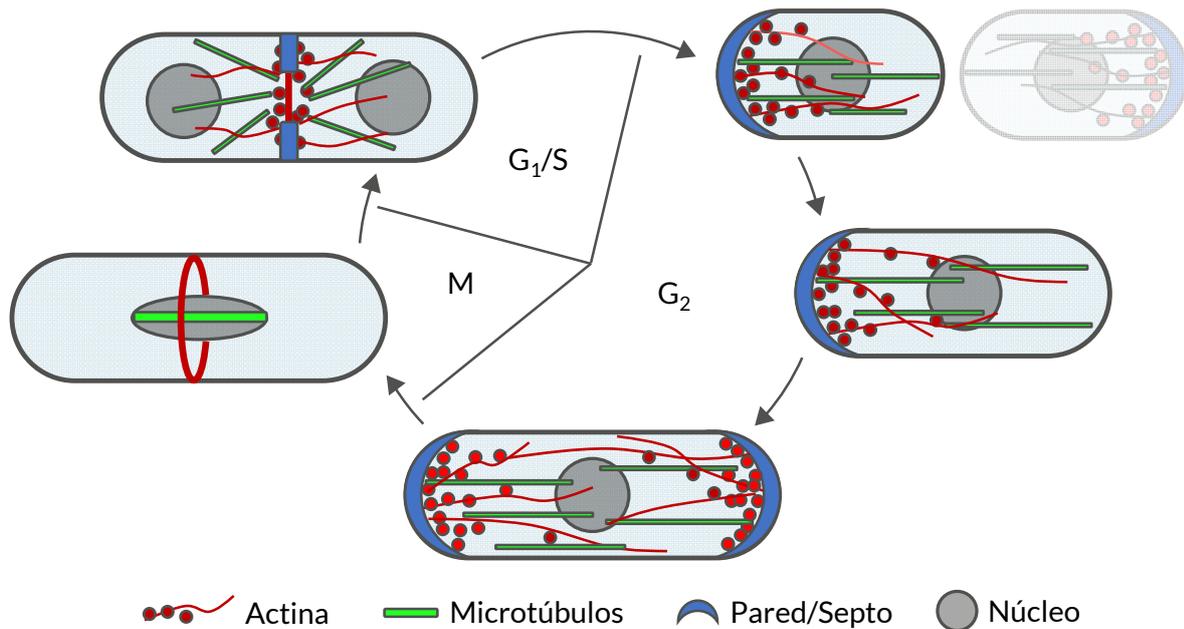


Figura 3 Ciclo celular y morfogénico de *S. pombe*. Adaptada de (Chang & Martin 2009)

El crecimiento bipolar en G₂ prosigue hasta que la célula alcanza un tamaño crítico y entra en mitosis (fase M) (Wood & Nurse 2015). En esta etapa se produce la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la segregación de las cromátidas hermanas a ambos polos celulares. La mitosis de *S. pombe* es cerrada en tanto que se conserva la integridad de la envuelta nuclear (Gu & Oliferenko 2015) y va seguida por la citocinesis.

CITOQUINESIS

La citocinesis es la parte del proceso de división celular que produce la separación física del citoplasma de una célula madre para originar dos células hijas. Esta división tiene lugar en las últimas etapas de la segregación nuclear y se basa en la formación previa de un anillo constituido por actina y miosina, que al contraerse sirve de guía para la placa de división (Glotzer 2017).

Esto es cierto al menos de forma general en amebas, hongos y animales, ya que otras ramas de los eucariotas como las plantas utilizan mecanismos diferentes debido a que carecen de miosina II (Pollard 2017); incluso *S. pombe* emplea un segundo proceso de división celular, la esporulación, que no involucra la contracción de un anillo (Shimoda 2004). Sin embargo, este mecanismo aparece únicamente tras la división meiótica y queda fuera del alcance de este trabajo en el que estudiamos la citocinesis vegetativa o mitótica de *S. pombe*, que sí emplea un anillo contráctil de actomiosina además de la formación del septo de división (Balasubramanian *et al.* 2004; Roncero & Sánchez 2010; Cortés *et al.* 2016a).

La maquinaria de división se ensambla con la entrada en mitosis a través de la señalización por la kinasa **Plo1** (Bähler *et al.* 1998; Tanaka *et al.* 2001). Una serie de nodos coalescen durante prometafase hasta formar el anillo contráctil de actomiosina (CAR) en el plano medio de la célula (revisado en (Willet *et al.* 2015; Cheffings *et al.* 2016; Rincon & Paoletti 2016)). Este posicionamiento integra señales de la geometría celular y la localización del núcleo para asegurar la segregación correcta del material genético y la distribución equitativa de material citoplasmático. Al final de anafase, cuando se produce la segregación nuclear con la elongación del huso mitótico, ensamblado desde los SPBs (*Spindle Pole Bodies*), comienza la constricción del anillo, que va acompañada de la síntesis del septo (Figura 4) (revisado en (Hercyk *et al.* 2019; Salas-Pino & Daga 2019)).

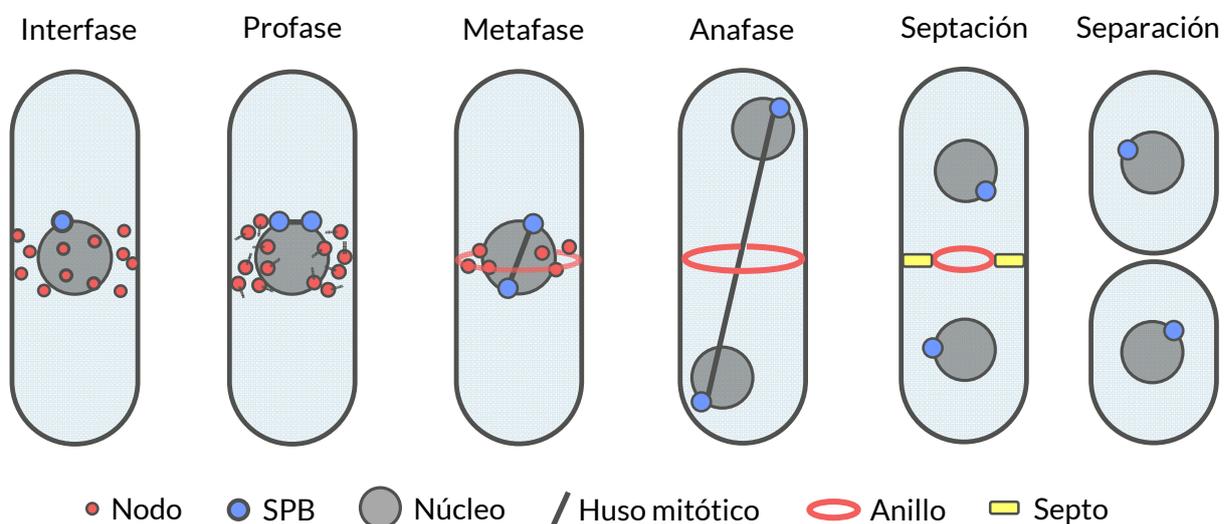


Figura 4 Ensamblaje y constricción de la maquinaria citoquinética referidas a las etapas mitóticas. Adaptada de (Simanis 2015)

Establecimiento del plano de división

En *S. pombe* el plano de división se establece de forma transversal en el centro de la célula. Un primer mecanismo determina esta región durante la fase G2 a través del posicionamiento de los precursores del anillo contráctil en la zona media de la célula. Estos precursores son agrupaciones de proteínas conocidas como nodos que se unen a la membrana plasmática. El componente principal de estos nodos es la kinasa **Cdr2**, que sirve de organizador gracias a su capacidad para unirse a membranas y formar complejos. Durante interfase una fracción de **Mid1**, quien también se une a membranas y oligomeriza, interacciona con **Cdr2** y juntos promueven el reclutamiento de otros componentes a los nodos. Aquí se incluyen las kinasas de ciclo **Wee1** y su

inhibidor **Cdr1**, que contribuyen al control del tamaño celular (Moseley *et al.* 2009), y otros nodos interfásicos que permanecen tras la separación celular (Akamatsu *et al.* 2014) formados por la proteína de unión a membrana **Blt1** (Guzman-Vendrell *et al.* 2013), la kinesina **Klp8** (Kashiwazaki *et al.* 2019), el Rho-GEF **Gef2** (Ye *et al.* 2012) y la proteína asociada **Nod1** (Jourdain *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2013).

El posicionamiento de estos nodos, y por tanto finalmente del anillo, está restringido a la región media de la célula gracias a señales que emanan de los dos polos y que inhiben su formación fuera del centro celular, donde esta señal es menor. La kinasa **Pom1** genera parte de esta señal de inhibición (Celton-Morizur *et al.* 2006; Padte *et al.* 2006) (Figura 5A). **Pom1** establece un gradiente de concentración desde la membrana de los polos, donde está más concentrada, hacia el centro celular gracias al transporte polarizado mediado por los factores de polaridad **Tea1** y **Tea4**. **Pom1** se asocia a la membrana de los polos después de ser desfosforilada por el complejo fosfatasa **Tea4-Dis2**, y se va desprendiendo de la membrana mediante un mecanismo de autofosforilación (Hachet *et al.* 2011; Hersch *et al.* 2015).

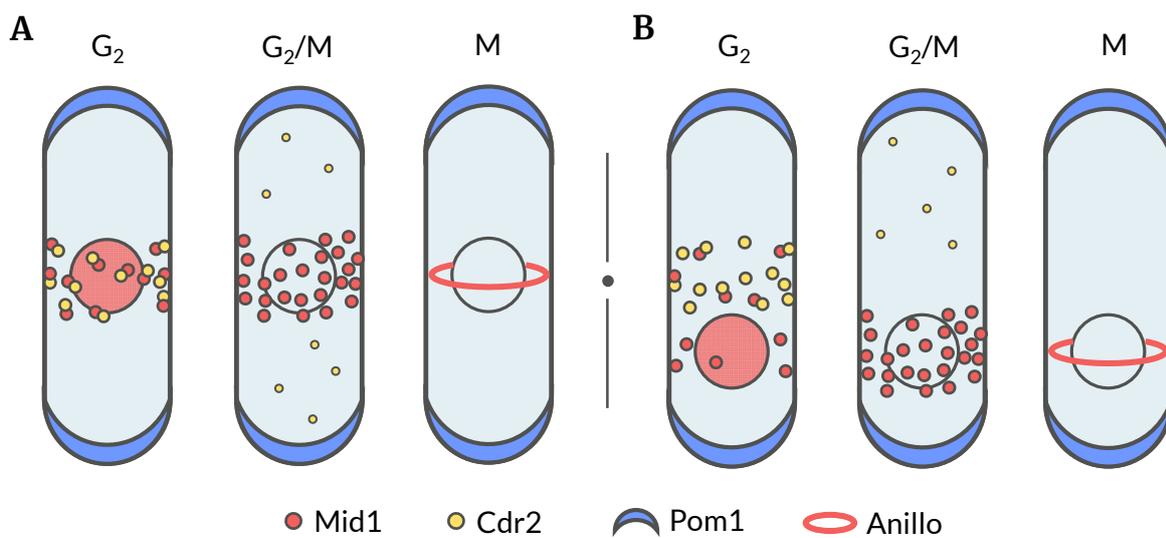


Figura 5 Modelos de establecimiento del plano de división. (A) El gradiente de Pom1 desde los polos restringe la formación de los nodos de Cdr2 al centro celular. (B) Mid1 se asocia a la membrana en la zona circundante al núcleo, incluso si este se encuentra desplazado. Adaptada de (Almonacid *et al.* 2009)

Pom1 bloquea la formación de los nodos citoquinéticos mediante la fosforilación de **Cdr2** (Moseley *et al.* 2009; Hachet *et al.* 2011), lo que reduce la asociación de esta kinasa con la membrana y también con **Mid1**, y afecta a su capacidad de formar nodos estables (Rincon *et al.* 2014). En los polos de la célula la concentración de **Pom1**, y por tanto su actividad inhibitoria, es alta, lo que favorece el posicionamiento de los precursores del anillo en la zona central. A pesar

de este mecanismo las células *pom1Δ* siguen excluyendo la formación de los nodos en el polo de crecimiento (son monopolares), indicando la existencia de otros factores que restringen esta distribución (Celton-Morizur *et al.* 2006; Moseley *et al.* 2009).

El segundo aspecto que establece la localización del plano de división es la posición del núcleo en el interior celular (Figura 5B). Generalmente este mecanismo pasa desapercibido ya que los microtúbulos longitudinales anclados a la envuelta nuclear ejercen fuerzas de empuje desde los polos de la célula, que se equilibran colocando el núcleo en el medio, donde se localizan los nodos. Sin embargo, se puede desplazar la posición del núcleo empleando fuerzas de centrifugación, y esto modifica el establecimiento del anillo, que se ensambla allá donde se ha movido el núcleo (Daga & Chang 2005).

Este mecanismo depende de la fracción nuclear de *Midi*. Aunque *Midi* se encuentra en nodos durante la fase G2 también se acumula en el núcleo; con la entrada en mitosis la kinasa *Plo1* induce la liberación masiva de *Midi* del núcleo y su acumulación en forma de nodos en la región de membrana plasmática próxima al núcleo en ese momento (Almonacid *et al.* 2009, 2011). Este mecanismo de posicionamiento es dominante sobre el de exclusión de los polos en tanto que el desplazamiento del núcleo es suficiente para modificar el establecimiento del plano de división.

Ensamblaje del anillo contráctil

En la transición G2/M, *Plo1* fosforila a la fracción nuclear de *Midi* e induce su liberación, así como la formación de nodos en la membrana y el reclutamiento del resto de componentes del anillo de manera ordenada. En este proceso también participa *Gef2*. *Midi* recluta por un lado a la proteína IQGAP de andamiaje *Rng2* y a la cadena ligera de la miosina II, *Cdc4*, la cual a su vez promueve el reclutamiento de las subunidades pesada, *Myo2*, y reguladora, *Rlc1*, de la miosina II. Esto ocurre 10 minutos antes de la separación de los SPBs, evento que se emplea de referencia como el punto cero de la entrada en mitosis.

A continuación, *Midi* recluta a *Cdc15*, proteína F-BAR de unión a membrana, y a otras proteínas del anillo que interactúan con *Blt1* y *Rng1* (Wu *et al.* 2006; Vavylonis *et al.* 2008; Laporte *et al.* 2011). *Cdc15* y el módulo de la miosina II reclutan a la formina *Cdc12*, el principal nucleador de actina, que ensambla filamentos lineales de actina desde los nodos citoquinéticos. La formina *For3* también es reclutada al sitio de división por *Cdc15* y, aunque su actividad es prescindible e insuficiente para la formación del anillo, podría servir como un mecanismo de refuerzo (Willet *et al.* 2015).

La formación de filamentos de actina es una de las dos partes implicadas en el modelo de ensamblaje del anillo SCPR (*Search, Capture, Pull and Release*). Según este modelo los filamentos

de actina nucleados desde un nodo por la formina **Cdc12** serían capturados por las miosinas II de otros nodos próximos. La formina sirve además de anclaje del filamento al nodo mientras la actividad motriz de la miosina tira de estos filamentos, generando la fuerza que mueve los nodos y los aproxima unos a otros (Vavylonis *et al.* 2008). Seguidamente, los filamentos de actina son liberados de la miosina por distintos mecanismos que implican a la cofilina **Adf1**, que corta los filamentos de actina estocásticamente permitiendo la nucleación de nuevos filamentos (Chen & Pollard 2011), la disociación de la miosina del filamento, o el recambio de forminas y miosinas de los nodos (**Figura 6**).

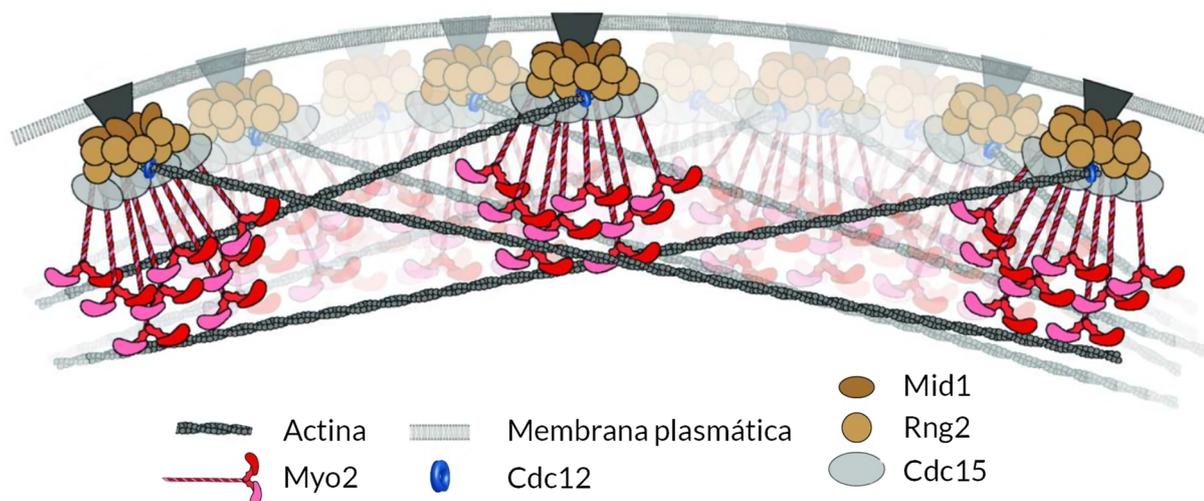


Figura 6 Modelo de organización de los nodos en el anillo contráctil. Cada nodo ensambla y ancla un filamento de actina a través de su formina. Traducida de (O'Shaughnessy & Thiyagarajan 2018).

Finalmente, proteínas como **Ain1** y **Fim1**, que refuerzan las estructuras de actina, son reclutadas al comienzo de la condensación de los nodos y contribuyen a la formación del anillo (Laporte *et al.* 2012). También son importantes la tropomiosina **Cdc8**, que estabiliza los filamentos de actina y su asociación con **Myo2**, y la miosina V **Myo51**, que se localiza en los nodos y aumenta la fuerza producida por **Myo2** (Stark *et al.* 2010; Laplante *et al.* 2015). Aun siendo **Mid1** el principal reclutador de los componentes del anillo las células **mid1Δ** siguen siendo capaces de formar anillos. Estos anillos se forman a través de un mecanismo diferente al SCPR que depende de la activación de la ruta SIN (*Septation Initiation Network*) y de **Cdc15** (Hachet & Simanis 2008; Huang *et al.* 2008). Durante el ensamblaje, **Cdr2** se disocia de los nodos. Su disociación está

controlada por la ruta SIN, que de esta forma podría borrar la información posicional de la célula madre para permitir su reposicionamiento de acuerdo con la nueva geometría de las células hijas (Pu *et al.* 2015; Rincon *et al.* 2017).

Maduración del CAR

Después del ensamblaje viene un periodo de maduración en el que, a pesar de no haber cambio en la forma ni en el tamaño del anillo, se reclutan algunas proteínas y se liberan otras antes de que se inicie la constricción (Pelham & Chang 2002; Roberts-Galbraith *et al.* 2009). Durante la etapa de maduración llega más **Cdc15** al anillo, así como otras dos proteínas con dominio F-BAR, **Imp2** y **Rga7** (Roberts-Galbraith *et al.* 2009; Martín-García *et al.* 2014). **Imp2** y **Cdc15** reclutan otras proteínas como **Fic1**, **Pxl1** y **Rgf3**.

La paxilina **Pxl1** participa en la estabilidad y la constricción del CAR y coopera con la glucán sintasa **Bgs1** en la formación del septo (Cortés *et al.* 2015; Martín-García *et al.* 2018). La localización de **Bgs1** en la zona de división durante maduración depende, entre otras, de **Cdc15** (Arasada & Pollard 2014) y de **Sbg1**, proteína integral de membrana que también llega en esta etapa (Davidson *et al.* 2016; Sethi *et al.* 2016). **Rgf3** es el principal activador de la GTPasa **Rho1** durante la síntesis del β -glucano del septo (Tajadura *et al.* 2004) e interacciona con el dominio SH3 de **Cdc15** y de **Imp2** (Ren *et al.* 2015). La localización de **Rgf3** también depende de la arrestina **Art1**, con quien interactúa físicamente y en cuyo mutante la maduración y constricción son más lentas (Davidson *et al.* 2015). **Rga7** es reclutado a la membrana por la proteína *coiled-coil* **Rng10** también en esta etapa, y ambas regulan la localización de la β -glucán sintasa **Bgs4** durante la septación (Liu *et al.* 2016, 2019).

La miosina II no convencional **Myp2** también aparece en el anillo durante la maduración (Laplante *et al.* 2015). **Myp2** no es tan importante para la constricción como **Myo2** (Palani *et al.* 2017; Zambon *et al.* 2017), pero contribuye a la estabilidad y constricción del anillo, especialmente bajo situaciones de estrés (O'Shaughnessy & Thiyagarajan 2018; Okada *et al.* 2019). Finalmente, **Mid1** se disocia del anillo antes de iniciar la constricción en un proceso mediado por la fosforilación por la kinasa **Sid2** (Willet *et al.* 2019). Tanto **Mid1** como **Cdr2** dejarían el anillo para eliminar la información posicional marcada en la célula madre que ya está en citoquinesis (ver apartado anterior).

La duración de la etapa de maduración es variable y puede ser acortada o alargada de acuerdo a variaciones en la etapa previa de ensamblaje o formación. Por ejemplo, los mutantes **myo2-E1** (Coffman *et al.* 2009), **cdc8-27** (Stark *et al.* 2010), o el apagado de **rng2⁺** (Tebbs & Pollard 2013) tardan más tiempo en ensamblar el anillo y pasan seguidamente por una fase de

maduración corta antes de la contracción. Por el contrario, las células con dos copias de *myo2⁺* forman el CAR de forma prematura y alargan la fase de maduración (Stark *et al.* 2010).

Otras proteínas cuya función es menos conocida también aparecen en el anillo durante maduración. *Cyk3* llega al CAR al comienzo de maduración y se mantiene en el septo después de la constricción (Pollard *et al.* 2012). *Cyk3* interacciona con *Cdc15* (Roberts-Galbraith *et al.* 2010) y con *Fic1* (Bohnert & Gould 2012), mientras que el mutante *cyk3Δ* presenta retraso en el inicio de la constricción del anillo y defectos en la separación celular (Pollard *et al.* 2012). *Spa2* y *Pos1* aparecen en el anillo hacia el final de la etapa de maduración. *Spa2* interacciona con el dominio SH3 de *Cdc15* y es necesaria para el reclutamiento de *Pos1*. Sus respectivas deleciones originan leves defectos en septación y de pérdida de polaridad (Ren *et al.* 2015). Recientemente se ha descrito que *Pkd2*, un receptor de potencial transitorio putativo, aparecería en la zona de división en la transición maduración/constricción y cuyo mutante tiene una constricción más rápida, presumiblemente por una reducida presión de turgencia (Morris *et al.* 2019).

Constricción del anillo

Tras la formación y maduración el anillo está listo para iniciar la constricción. El CAR presenta entonces una estructura en contacto con la membrana plasmática que se extiende con una circunferencia de unos 11 μm (3.5 μm de diámetro) y 125 nm de ancho de sección (Swulius *et al.* 2018). La composición del anillo no es uniforme, sino que se estructura en capas (Figura 7). En la sección próxima a la membrana (entre los 0 y 80 nm) se encuentran las proteínas de andamiaje que se unen a la membrana incluyendo las proteínas F-BAR *Cdc15*, *Imp2* y *Rga7*, las septinas, la formina *Cdc12* y el extremo C-terminal de la miosina *Myo2*.

A continuación (80-160 nm) se localizan proteínas de señalización (GTPasas y sus reguladores, kinasas y fosfatasa) como *Sid2*, *Clp1* y *Rgf3* y otras proteínas accesorias de andamiaje, o que se unen a través de los dominios SH3 de las proteínas de anclaje y que son críticas para la integridad del anillo como *Rng2*, *Pxl1* y *Fic1*. En la región más distante de la membrana (200 nm) están los filamentos de actina y las proteínas de unión a actina incluyendo los dominios motores de las miosinas *Myo2*, *Myp2* y *Myo51* (McDonald *et al.* 2017).

Mientras que las proteínas en las secciones medias y distales a la membrana tienen una distribución más homogénea (McDonald *et al.* 2017), con los filamentos de actina dispuestos de forma relativamente empaquetada y paralelos a la membrana (Swulius *et al.* 2018), las proteínas en la zona proximal a la membrana plasmática se agrupan en estructuras que recuerdan a los nodos y que se van aproximando entre sí a medida que se cierra el anillo (Swulius *et al.* 2018).

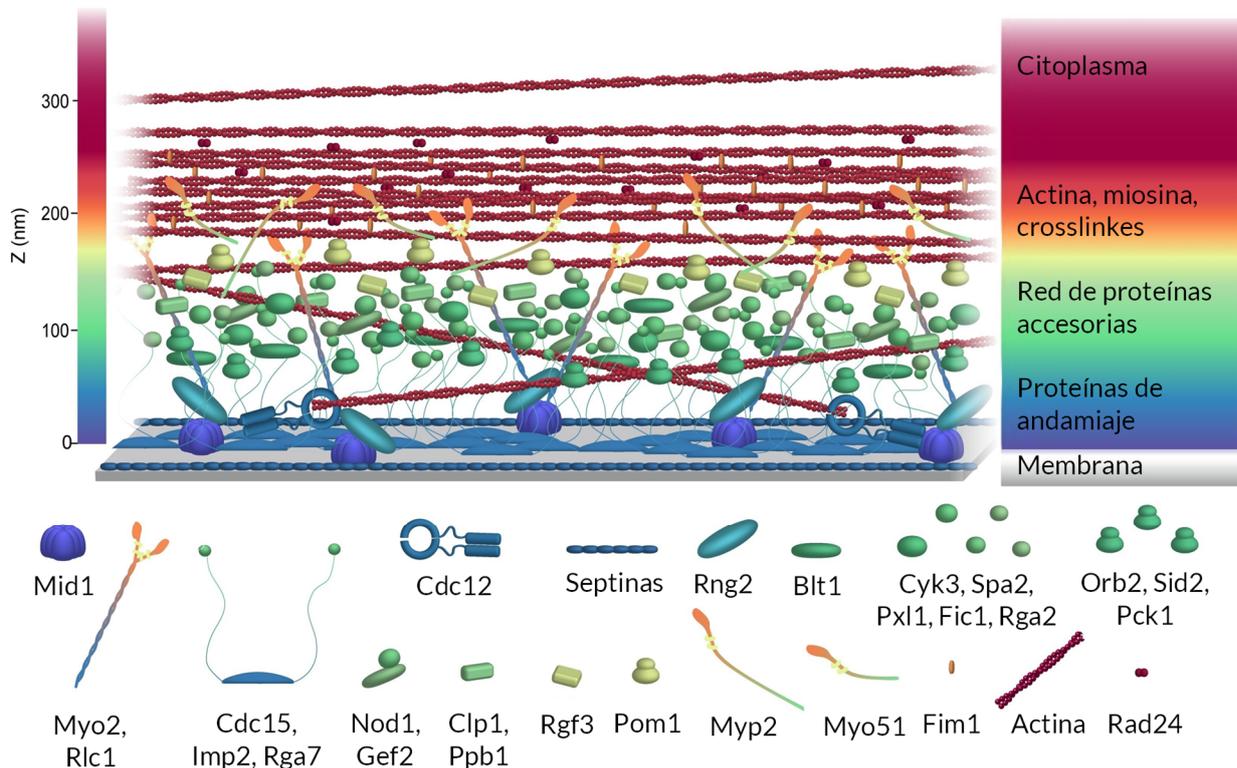


Figura 7 Modelo de la arquitectura molecular del anillo contráctil. Las proteínas están coloreadas en base a su localización en Z. Traducida de (McDonald *et al.* 2017).

El CAR, lejos de ser una estructura estática, sufre una remodelación constante. Sus componentes como **Cdc15**, **Myo2**, **Myp2** y **Cdc12** tienen tiempos de recambio muy rápidos y la actina está siendo constantemente polimerizada por la actividad de las forminas y la profilina **Cdc3**, y despolimerizada por la actividad de la cofilina (O'Shaughnessy & Thiyagarajan 2018). A medida que se contrae, el anillo se vuelve más pequeño y se va despojando de sus componentes. El número de moléculas de actina y formina cae de forma proporcional a la circunferencia del anillo, por lo que su concentración permanece constante (Courtemanche *et al.* 2016), mientras que la liberación de **Myo2** y **Myp2** es menor y su densidad va aumentando a medida que avanza la constricción (Wu & Pollard 2005). Esta remodelación es necesaria para asegurar la homeostasis del anillo y evitar la agregación de sus componentes (Chew *et al.* 2017).

La constricción del CAR está íntimamente ligada a la síntesis del septo; el análisis del papel individual del anillo de actomiosina en este proceso y su mecanismo de constricción ha sido posible gracias al empleo de protoplastos y los sistemas semi-*in vitro*. Los protoplastos son células a las que se les elimina la pared celular mediante digestión enzimática (Stachowiak *et al.* 2014). Los sistemas semi-*in vitro* conocidos como “fantasmas celulares” utilizan protoplastos permeabilizados para eliminar el material citoplásmico (Mangione & Gould 2019). La pérdida de la pared vuelve a las células redondeadas, y el anillo, al no tener anclaje, se desliza por la

membrana durante la constricción. Aun con sus particularidades no fisiológicas estos métodos han permitido medir la tensión ejercida por el CAR (O'Shaughnessy & Thiyagarajan 2018; Pollard & O'Shaughnessy 2019).

Las medidas de tensión junto los números de moléculas de los principales componentes del anillo, su velocidad de recambio, su localización y sus propiedades conocidas, son incorporados en simulaciones matemáticas que buscan predecir los mecanismos moleculares que permitan alcanzar dicha tensión (Stachowiak *et al.* 2014; O'Shaughnessy & Thiyagarajan 2018; Pollard & O'Shaughnessy 2019). De acuerdo a estos modelos, las forminas nuclean cada uno de los filamentos de actina y los anclan a través de los extremos barbados a los nodos de la membrana; las miosinas se unen a estos filamentos y tiran de ellos de forma paralela al anillo, tensándolos. La fuerza motriz de las miosinas junto al anclaje lateral de los filamentos de actina mediado por las forminas proporcionaría la tensión necesaria para el cierre del anillo, siguiendo un mecanismo similar al del ensamblaje del CAR. En estos modelos *Myo2* y *Cdc12* se localizan en los nodos unidos a la membrana, mientras que *Myp2* contribuye a la tensión incluso sin anclaje a través de la unión únicamente a los filamentos de actina. Los modelos también explican cómo el rápido recambio medido en los componentes del CAR, que excede a la velocidad de constricción, permite la remodelación del mismo a medida que se contrae sin perder organización o funcionalidad (Cheffings *et al.* 2019).

Síntesis del septo

S. pombe, como otras levaduras, posee una estructura polisacáridica denominada pared celular que envuelve a la célula y le permite mantener su alta presión de turgencia interna de 1.5 MPa (Chang 2017). Esta presión de turgencia ejerce una fuerza hacia el exterior que empuja a la membrana contra la pared, y es la pared quien contrarresta esta fuerza con sus propiedades mecánicas (Atilgan *et al.* 2015). La invaginación del surco citoquinético requiere pues de fuerzas que sobrepasen la presión de turgencia. De acuerdo con esto, se ha visto que la adición de bajas concentraciones de sorbitol aumenta la velocidad de constricción del anillo, lo cual se podría explicar por una reducción de la presión (Proctor *et al.* 2012). Sin embargo, la tensión ejercida por el anillo está varios órdenes de magnitud por debajo de la requerida (Stachowiak *et al.* 2014; Thiyagarajan *et al.* 2015), lo que sugiere que no es la constricción del anillo sino la síntesis del septo la fuerza dominante que dirige la citoquinesis.

La pared celular está compuesta por polisacáridos formados por tres glúcidos: glucosa, manosa y galactosa. Los principales componentes son el $\beta(1,3)$ -D-glucano con ramificaciones $\beta(1,6)$ y el $\alpha(1,3)$ -D-glucano lineal. Además, tiene en menor proporción $\beta(1,6)$ -D-glucano con alta frecuencia de ramificaciones $\beta(1,3)$, $\beta(1,3)$ -D-glucano lineal y galactomanano unido a

proteínas para formar la capa glicoproteica (Humbel *et al.* 2001; Sugawara *et al.* 2004; Grün *et al.* 2005; Magnelli *et al.* 2005). A nivel estructural, estos polisacáridos se disponen formando una capa de $\beta(1,3)$ -D-glucano ramificado y $\alpha(1,3)$ -D-glucano rodeada por dos capas de galactomanano; el $\beta(1,6)$ -D-glucano se encuentra en la confluencia entre la capa central y la externa de galactomanano (Humbel *et al.* 2001; Sugawara *et al.* 2004) (Figura 8). A pesar de tener en su genoma dos genes de quitín sintasas (*chs1+* y *chs2+*) (Matsuo *et al.* 2004), la pared celular de las células vegetativas de *S. pombe* no contiene quitina (Free 2013).

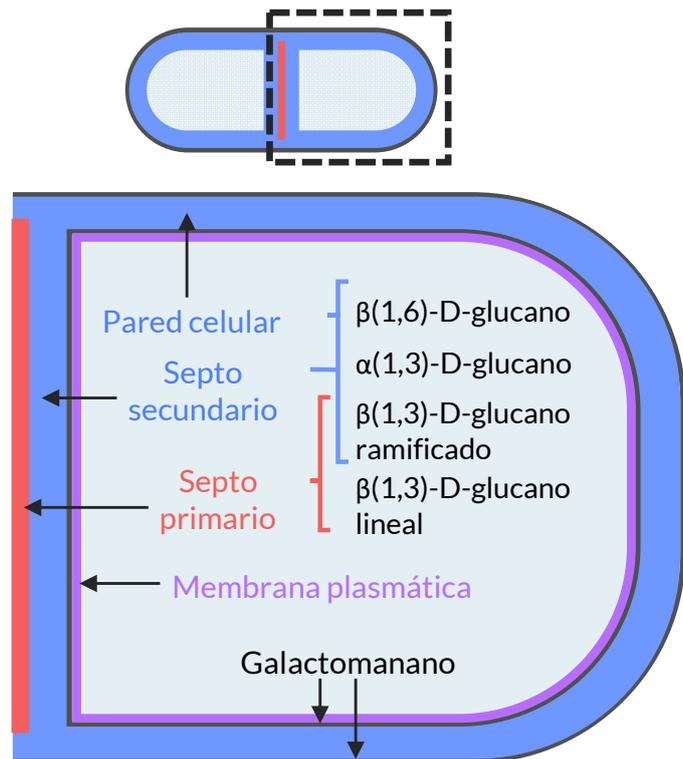


Figura 8 Esquema y localización de los componentes de la pared celular y septo. Adaptado de (Cortés *et al.* 2016a).

El septo está formado por dos tipos de estructuras que se sintetizan de forma simultánea durante la citoquinesis (Cortés *et al.* 2007): una banda central de septo primario rodeada por dos capas de septo secundario. Tanto el septo primario y como el septo secundario están formados por $\beta(1,3)$ -D-glucano ramificado y $\alpha(1,3)$ -D-glucano; el septo primario tiene además $\beta(1,3)$ -D-glucano lineal mientras que el septo secundario está compuesto adicionalmente por $\beta(1,6)$ -D-glucano (Humbel *et al.* 2001; Cortés *et al.* 2012; Muñoz *et al.* 2013) (Figura 8). Una vez completado el cierre del septo éste incrementa su grosor a través de una ronda adicional de síntesis de septo secundario.

El septo primario queda flanqueado en su extremo en contacto con la pared por dos estructuras circulares conocidas como material triangular denso y de otra estructura que va desde el septo primario hasta la superficie de la pared conocida como anillo denso, ambas de composición y estructura desconocidas (Cortés *et al.* 2012; Muñoz *et al.* 2013).

El $\beta(1,3)$ -D-glucano de la pared celular de las levaduras es sintetizado por la $\beta(1,3)$ -D-glucán sintasa (β GS), un complejo enzimático formado por una subunidad catalítica y otra reguladora. En *S. pombe* la subunidad reguladora es la GTPasa *Rho1* (Arellano *et al.* 1996), mientras que se han identificado hasta cuatro posibles componentes de la subunidad catalítica, *Bgs1*, *Bgs2*, *Bgs3* y *Bgs4* (Cortés *et al.* 2016b). Estas son proteínas de alto peso molecular con

múltiples dominios transmembrana. *Bgs1*, *Bgs3* y *Bgs4* aparecen en los polos y el septo de división, siendo las tres esenciales para la supervivencia celular. La función de *Bgs3* es todavía desconocida (Martín *et al.* 2003), mientras que *Bgs2* es esencial para la formación de la pared de la espora durante el ciclo sexual (Martín *et al.* 2000b).

El análisis de los septos formados en esporas *bgs1Δ* germinadas demostró que *Bgs1* es responsable de la síntesis del $\beta(1,3)$ -D-glucano lineal y de la formación del septo primario (Cortés *et al.* 2007). Sin embargo, existen dudas sobre si *Bgs1* es el único responsable de la síntesis del $\beta(1,3)$ -D-glucano lineal. Se ha visto que en células vegetativas la depleción de *Bgs1* obtenida mediante la represión prolongada del gen todavía presenta una cantidad importante de $\beta(1,3)$ -D-glucano lineal, además de un fenotipo de células multiseptadas y encadenadas (Cortés *et al.* 2007).

Bgs4 es responsable de la síntesis del $\beta(1,3)$ -D-glucano ramificado, de la formación del septo secundario y de la compleción del septo primario (Cortés *et al.* 2005; Muñoz *et al.* 2013). Su ausencia produce lisis celular explosiva, principalmente durante la separación de las células hijas (Cortés *et al.* 2005; Muñoz *et al.* 2013); además presenta fallos en el anclaje del CAR a la membrana y una reducción de la velocidad de la constricción del anillo y, en mayor medida, también de la síntesis del septo (Muñoz *et al.* 2013). Un mutante puntual de *bgs4⁺*, *cwg1-1*, presenta una importante bajada del β -glucano y de la actividad β GS, que normalmente van asociadas a la lisis celular (Ribas *et al.* 1991; Cortés *et al.* 2005), así como defectos en el posicionamiento del anillo similares a los de la pérdida del gen (Muñoz *et al.* 2013).

La septación comienza durante la anafase B. *Bgs1* se localiza en la zona media antes de que comience la septación mientras que *Bgs4* aparece en telofase cuando la velocidad de septación y de contracción del anillo se aceleran (Cortés *et al.* 2018). Su localización depende de la actividad SIN y del establecimiento del anillo de actomiosina (Liu *et al.* 2002; Cortés *et al.* 2018).

Aunque tanto el anillo como el septo son necesarios para producir la invaginación de la membrana y del surco citoquinético, una vez comenzada la síntesis del septo éste es capaz por sí solo de terminar el cierre en ausencia del anillo, aunque a velocidad reducida (Proctor *et al.* 2012). La tensión del anillo podría estar modulando la actividad de la glucán sintasa; asumiendo que la síntesis del septo sea mecanosensible y acoplada al anillo, la tensión del CAR regularía la velocidad de crecimiento del septo de acuerdo a la curvatura local de la membrana para mantener la circularidad del surco citoquinético (Thiyagarajan *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2015) (Figura 9).

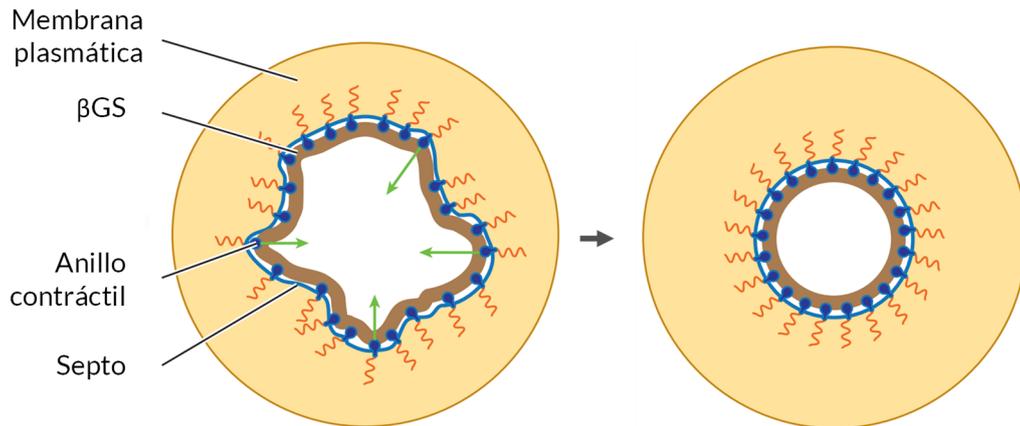


Figura 9 La actividad glucán sintasa podría ser mecanosensible, con una síntesis más rápida en aquellas zonas donde la curvatura y la fuerza por la tensión del anillo es mayor (flechas verdes). Traducida de (Pollard & O’Shaughnessy 2019).

Separación celular

La última etapa en la citocinesis de *S. pombe* es la disolución del septo que mantiene juntas físicamente a las dos células hijas. Este proceso también es muy específico y crítico para la integridad de la célula. La disolución comienza por la pared que rodea al septo seguido de la degradación del septo primario, mientras que el septo secundario permanece intacto, pues constituirá la pared de los polos nuevos de las células hijas tras la separación (Martín-García & Santos 2016). En este proceso intervienen la endo- β -1,3-glucanasa **Eng1** (Martín-Cuadrado *et al.* 2003) y la endo- α -1,3-glucanasa **Agn1** (Dekker *et al.* 2004; García *et al.* 2005). Ambas son localizadas de forma dependiente del exocisto en una estructura anular que rodea al septo y cuya formación depende de las septinas y de **Mid2** (Martín-Cuadrado *et al.* 2005).

Las septinas también participan en la localización de **Gef3** (Muñoz *et al.* 2014b), que activa a la GTPasa **Rho4**, la cual es necesaria para la secreción de las glucanasas (Perez *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015). Finalmente, la ruta MOR (*Morphogenesis Orb6 Network*), que es inhibida por la ruta SIN hasta el final de citocinesis, también participa en la separación celular. Fallos en la señalización de esta ruta producen lisis celular por el inicio prematuro de la degradación del septo, aunque su mecanismo de actuación es desconocido (Gupta *et al.* 2014).

Ruta de inicio de septación, SIN

El regulador por excelencia de la citocinesis es la ruta de inicio de septación (SIN). En ausencia de los principales componentes activadores de la ruta las células se vuelven alargadas, multinucleadas y sin septos, mientras que su activación ectópica induce la formación de

múltiples septos desligados de la mitosis (Simanis 2015). Esta ruta está compuesta en esencia por una GTPasa, tres proteínas kinasas, sus respectivos reguladores y proteínas de andamiaje.

La GTPasa de la familia Ras **Spg1** es el centro regulador de la ruta SIN (Schmidt *et al.* 1997). Su estado de activación está mediado por un inhibidor GAP bipartito formado por la subunidad catalítica **Cdc16** y la proteína de unión **Byr4** (Furge *et al.* 1998; Krapp *et al.* 2008); hasta la fecha no ha sido identificado ningún activador GEF de **Spg1**. Durante interfase **Spg1** y su GAP **Cdc16-Byr4** colocalizan en el SPB, manteniendo la señal inactiva. Tras la entrada en mitosis, en metafase, **Cdc16-Byr4** se disocia de los dos SPBs, lo que permite la activación de **Spg1** y su unión a la kinasa **Cdc7** (Schmidt *et al.* 1997) (Figura 10).

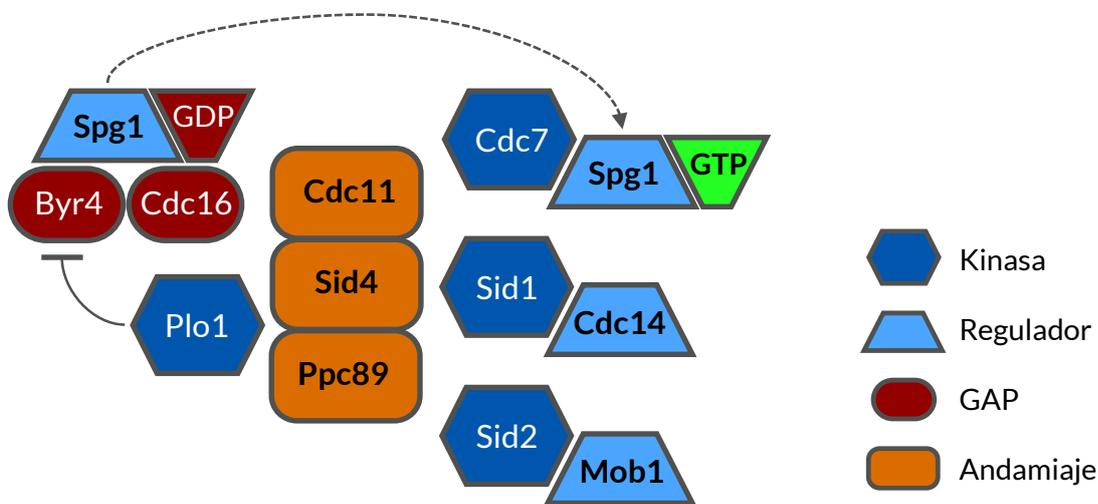


Figura 10 Componentes de la ruta SIN. En interfase Cdc16-Byr4 mantiene a la GTPasa Spg1 en su estado inactivo unido a GDP. Con la entrada en mitosis Plo1 inhibe al complejo GAP, lo que permite el intercambio del GDP de Spg1 por GTP y su activación. Adaptada de (Simanis 2015).

A continuación **Cdc7** activaría al complejo kinasa-regulador **Sid1-Cdc14** y este a su vez al equivalente **Sid2-Mob1**, siendo **Sid2** la kinasa final en la transmisión de la señal (Guertin *et al.* 2000). Todos estos componentes se unen a los SPBs a través de tres proteínas de anclaje: **Ppc89** ancla a **Sid4** al SPB (Rosenberg *et al.* 2006) y este a su vez media la unión de **Cdc11**, quien finalmente sirve de plataforma para el reclutamiento de las proteínas mencionadas anteriormente (Krapp *et al.* 2001; Morrell-Falvey *et al.* 2004).

Entre los sustratos de **Sid2** están la fosfatasa **Clp1** (Mishra *et al.* 2005), la formina **Cdc12** (Bohnert *et al.* 2013), la proteína de anclaje **Cdc11** (Feoktistova *et al.* 2012), la kinesina **Klp2** (Mana-Capelli *et al.* 2012), la kinasa **Cdr2** (Rincon *et al.* 2017) y la anillina **Midi1** (Willet *et al.* 2019) entre otras (Grallert *et al.* 2012; Gupta *et al.* 2013). La ruta SIN participa en la condensación de los nodos durante el ensamblaje del CAR cooperando con **Midi1**, y asegura la estabilidad del anillo en

anafase (Wu *et al.* 2003; Hachet & Simanis 2008; Huang *et al.* 2008; Willet *et al.* 2019). Aunque no se han identificado dianas directas se cree que la ruta SIN participa en la activación de la constricción del CAR y el inicio de la septación (Jin *et al.* 2006; Alcaide-Gavilán *et al.* 2014). Finalmente la ruta SIN participa junto con **Clp1** en el checkpoint de citoquinesis, un mecanismo que estabiliza el CAR y bloquea la progresión del ciclo en presencia de ciertos tipos de estreses que dañan la integridad del anillo (Trautmann *et al.* 2001).

La señal del SIN se transmite de forma polarizada desde los SPBs hacia el CAR en anafase. Durante anafase B **Cdc16-Byr4** vuelve al SPB, pero solo al antiguo, donde inactiva a **Spg1** y la señal del SIN en el polo viejo. Por otro lado, aunque **Cdc7** es reclutado a los dos SPBs de forma temprana, se acumula preferentemente en el nuevo SPB, donde **Spg1** está activo. Con el establecimiento de esta asimetría en la señal del SIN, **Sid1** y **Cdc14** son reclutadas preferentemente al SPB nuevo (Cerutti & Simanis 1999; Guertin *et al.* 2000; Li *et al.* 2000; Cortés & McCollum 2009; Wachowicz *et al.* 2015) (Figura 11). **Sid2** y **Mob1** se localizan en ambos SPBs durante mitosis y aparecen también en el plano de división antes del inicio de la septación (Sparks *et al.* 1999; Hou *et al.* 2000; Wachowicz *et al.* 2015).

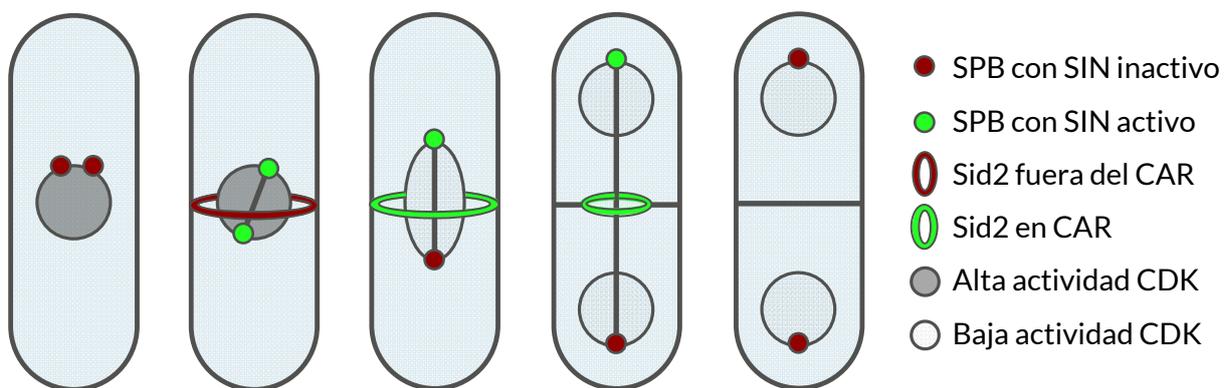


Figura 11 Patrón de la activación polarizada de la ruta SIN. **Spg1** en su forma activa recluta a **Cdc7** (SPB en verde). Con la elongación del huso en anafase **Cdc16-Byr4** inactiva a **Spg1** en el SPB viejo (SPB en rojo) y **Sid2** aparece en el anillo. Tras la septación la señal del SIN desaparece. Adaptada de (Johnson *et al.* 2012).

La regulación del SIN es compleja siendo la kinasa **Plo1** el activador más conocido. **Plo1** se asocia con los SPBs mitóticos parcialmente a través de su interacción con la proteína estructural **Sid4** (Chang & Gould 2000; Tanaka *et al.* 2001; Mulvihill & Hyams 2002), pero también se localiza en el huso mitótico y en el CAR (Bähler *et al.* 1998). En anafase **Plo1** promueve la activación de la ruta a través de la eliminación de **Byr4** de los SPBs. La kinasa dependiente de ciclina (CDK) **Cdc2** también actúa como un activador de la ruta SIN fosforilando a **Byr4**, y junto a **Plo1** contribuye a la eliminación completa de **Byr4** de los SPBs (Rachfall *et al.* 2014).

La función activadora de **Cdc2** es algo inusual puesto que durante interfase y al comienzo de mitosis **Cdc2** actúa como inhibidor de la ruta SIN (Cerutti & Simanis 1999; Dischinger *et al.* 2008). De hecho, la asociación del módulo **Sid1-Cdc14** con el SPB requiere una disminución de la actividad CDK (Guertin *et al.* 2000), mientras que en general una actividad CDK alta se considera un inhibidor de la citoquinesis (revisado en (Bohnert & Gould 2011)).

Etd1 es un activador de la ruta SIN necesario para la localización asimétrica de **Cdc7** al final de anafase (Cortés & McCollum 2009) y de **Sid2** en el CAR (Daga *et al.* 2005). **Etd1** promueve la actividad de la GTPasa **Rho1** y se ha propuesto la participación de las dos proteínas en un bucle retroalimentativo que regula el SIN a través de la activación de **Spg1** (Alcaide-Gavilán *et al.* 2014).

Checkpoint de citoquinesis

La existencia del checkpoint de citoquinesis que detecta fallos en la integridad de CAR se descubrió a través del estudio de mutantes en la $\beta(1,3)$ -D-glucán sintasa **Bgs1**. Algunos alelos de **bgs1⁺**, en concreto el mutante **cps1-191**, completan la mitosis, pero no pueden formar un septo de división, y se paran con una matriz de microtúbulos interfásicos y con dos núcleos colocados en el medio de lo que deberían ser las células hijas. Los núcleos completan la fase S pero quedan bloqueados en G2 sin volver a entrar en mitosis (Liu *et al.* 1999). En esta situación de bloqueo el CAR se mantiene en el córtex sin contraerse, **Cdc7** y **Sid1** permanecen asociados con el SPB nuevo y no se produce la reactivación del crecimiento en los polos (Le Goff *et al.* 1999; Liu *et al.* 2000) (Figura 12).

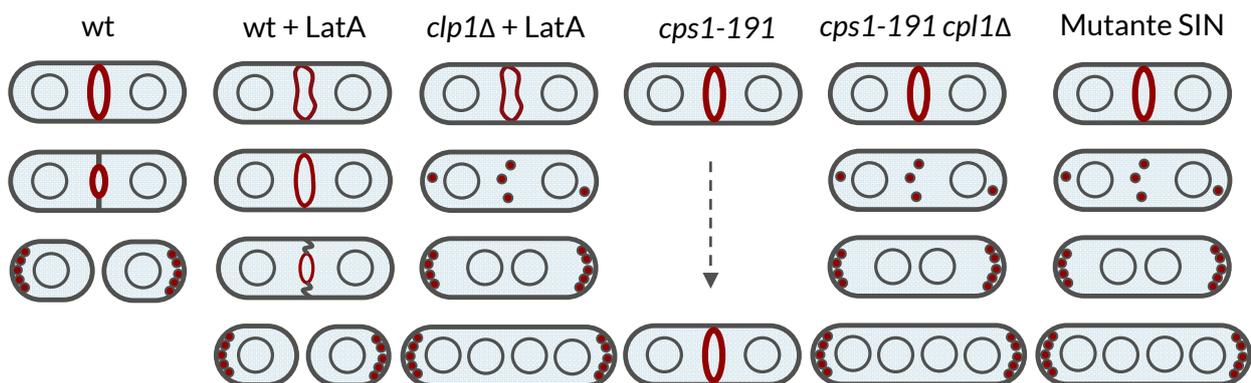


Figura 12 Comportamiento celular en distintos genotipos y condiciones de crecimiento relacionados con el checkpoint de citoquinesis. Adaptada de (Mishra *et al.* 2004).

El checkpoint de citoquinesis depende de la ruta SIN y de la fosfatasa **Clp1**; en su ausencia los núcleos se saltan el bloqueo de G2 y el anillo termina por desensamblarse dando lugar a células multinucleadas (Trautmann *et al.* 2001). Este checkpoint responde además ante agresiones del CAR, ya sea con bajas dosis de latrunculina (Mishra *et al.* 2004), un agente despolimerizador de actina, o en mutantes con defectos en la formación del anillo (Trautmann *et al.* 2001), lo que induce la estabilización del CAR a la vez que se bloquea la progresión del ciclo (Figura 12).

Clp1 se localiza en el nucleolo en interfase. Al comienzo de mitosis es liberado al citoplasma y se puede ver en el SPB, en el huso y en el anillo, al que se une a través de la anillina **Mid1** (Clifford *et al.* 2008). Tras finalizar la septación **Clp1** vuelve a su localización nucleolar original (Trautmann *et al.* 2001; Chen *et al.* 2013). La liberación de **Clp1** del nucleolo no depende del SIN; sin embargo, en respuesta a la activación del checkpoint la kinasa **Sid2** fosforila a **Clp1** y crea sitios de unión para la proteína 14-3-3 **Rad24**, lo que favorece su retención en el citoplasma (Chen *et al.* 2008).

Clp1 a su vez media la desfosforilación de **Cdc11**, induciendo así la activación del SIN en un feedback positivo con **Sid2** (Chen *et al.* 2013). **Sid2** también regula a **Cdc11** (Feoktistova *et al.* 2012). De esta manera **Clp1** mantendría al SIN activo para producir la parada en G2 y permitir el reensamblaje del anillo (Trautmann *et al.* 2001; Mishra *et al.* 2004; Trautmann & McCollum 2005). A pesar de ello no está claro si la retención citoplásmica de **Clp1** es necesaria para mantener el bloqueo de la progresión del ciclo puesto que el mutante **Clp1-6A**, el cual tiene todos sitios de fosforilación por **Sid2** mutados a alanina, se comporta como la cepa silvestre en cuanto a la activación del checkpoint (Trautmann & McCollum 2005; Chen *et al.* 2008).

GTPASAS DE LA FAMILIA RHO

Las GTPasas de la familia Rho forman parte de la superfamilia de GTPasas pequeñas (20–40 kDa) relacionadas con Ras (Ras homology). Son proteínas de unión e hidrólisis de GTP que se encuentran en todos los organismos eucariotas (Militello & Colombo 2013). La unión del nucleótido determina su estado de activación, de manera que sólo están activas cuando están unidas a GTP, lo que les permite interactuar con sus efectores, mientras que en su forma unida a GDP la transmisión de la señal queda interrumpida. Por ello son conocidas como interruptores moleculares (Vetter & Wittinghofer 2001).

Están implicadas en la transducción y regulación de una amplia diversidad de procesos como el control de la proliferación y diferenciación celular, la regulación del citoesqueleto de actina, el tráfico endosomal, la polaridad celular y en la regulación transcripcional (Hall 2012; Ueyama 2019). En levaduras se conocen algunas de sus funciones en el crecimiento polarizado,

en citoquinesis, mantenimiento de la integridad celular y regulación del citoesqueleto de actina (García *et al.* 2006b; Perez & Rincón 2010).

Regulación de las GTPasas de la familia Rho

La activación de las GTPasas se produce por la unión de GTP mediada por las proteínas GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). Estas proteínas activadoras se unen a la GTPasa en su estado inactivo (unida a GDP) e inducen un cambio de conformación que promueve la disociación del GDP y la entrada del GTP, que es más abundante en la célula. Aunque la transición hacia el estado inactivo unido a GDP depende de la hidrólisis del GTP por parte de la GTPasa, la cinética de este proceso es muy lenta, por lo que también son necesarios los elementos inactivadores GAP (*GTPase Activating Protein*) para aumentar su eficiencia (Figura 13). Las proteínas GAP se unen a

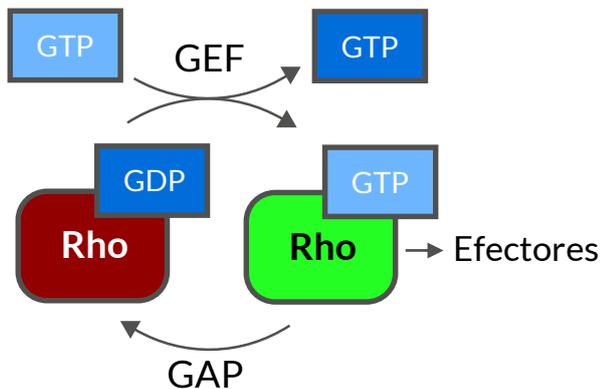


Figura 13 Regulación de las Rho-GTPasas por cambio de nucleótido.

la conformación activa de la GTPasa y promueven la hidrólisis del GTP unido. Facilitan la orientación correcta de la molécula de agua que efectúa el ataque nucleofílico y estabilizan el estado de transición de la reacción (Bos *et al.* 2007; Cherfils & Zeghouf 2013). Las concentraciones y cinéticas de GEFs y GAPs dotan al sistema de ultrasensibilidad, una propiedad que permite a la GTPasa ciclar entre los estados activo e inactivo en una respuesta rápida de “todo o nada”, cuando se sobrepasa un umbral en la concentración o en la duración del

estímulo (Lipshtat *et al.* 2010).

Tanto GEFs como GAPs son proteínas de mayor tamaño y complejidad que las GTPasas, están reguladas por señales extra- e intracelulares y contienen múltiples dominios capaces de interactuar con otras proteínas y con los lípidos de la membrana. Su estructura les permite actuar no solo en el cambio del estado de activación de la GTPasa, sino también como adaptadores en complejos multiproteicos para acoplar las señales y sus efectores, además de contribuir en la localización espacial y temporal de las Rho-GTPasas. El número de reguladores GEFs y GAPs es mayor que el de GTPasas, pudiendo una misma GTPasa ser regulada por más de una de estas proteínas; además un mismo GEF o GAP puede regular a distintas GTPasas, incrementando la complejidad del sistema (Bos *et al.* 2007; Cherfils & Zeghouf 2013).

La localización subcelular de las GTPasas Rho es uno de los mecanismos más importantes en la regulación de estas proteínas. Muchas de estas proteínas ciclan entre el citosol y la membrana plasmática, guiadas por la incorporación de un grupo de naturaleza isoprenoide (farnesilo o geranilgeranilo) en una cisteína conservada en el motivo C' - terminal CAAX, lo que les permite anclarse a la membrana. (Wennerberg *et al.* 2005; Bustelo *et al.* 2007). Pueden ser desplazadas de las membranas y secuestradas en el citosol gracias a los GDIs (*GDP Dissociation Inhibitors*), proteínas reguladoras que enmascaran estos grupos lipídicos altamente insolubles separándolos del solvente (DerMardirossian & Bokoch 2005; Cherfils & Zeghouf 2013). Además de la prenilación, otras modificaciones postraduccionales como la palmitoilación pueden afectar a la localización subcelular de las Rho-GTPasas. Algunas tienen una región polibásica formada por una serie de lisinas o argininas que preceden al motivo C' - terminal CAAX y que actúan como secuencia de localización nuclear (NLS) (Liu *et al.* 2012).

Además de los mecanismos de control por GEFs y GAPs y de los cambios en la localización, existen otros mecanismos de regulación “no convencionales” como: I) regulación por microRNA (miRNA) del procesamiento postranscripcional de los RNA mensajeros que codifican las Rho-GTPasas; II) modificaciones covalentes como la ADP-ribosilación y la glucosilación que normalmente inactivan a las proteínas Rho; III) transglutaminación, fosforilación, y AMP-ilación que afectan a la señalización activando constitutivamente a la GTPasa, y IV) ubiquitinación, que controla por la vía del proteasoma la estabilidad y reciclaje de las proteínas Rho (Liu *et al.* 2012).

La GTPasa Rho1

La familia Rho GTPasas en *S. pombe* está compuesta por seis miembros: **Cdc42**, **Rho1**, **Rho2**, **Rho3**, **Rho4** y **Rho5**; de estos sólo dos, **Cdc42** y **Rho1**, son esenciales para la supervivencia celular (Arellano *et al.* 1999a; García *et al.* 2006b; Perez & Rincón 2010).

Rho1 es el homólogo funcional de **RhoA** en humanos y de **Rho1** en *S. cerevisiae*. En *S. pombe* **Rho1** participa en la síntesis de la pared celular y la regulación del citoesqueleto de actina, ambos procesos relacionados con el crecimiento polarizado. La depleción de la actividad de **Rho1** durante el crecimiento vegetativo provoca la pérdida de la integridad celular, acompañada de la disminución drástica de la actividad β -glucán sintasa (β GS) y la desaparición de la actina polimerizada. Eventualmente las células se terminan lisando, la mayoría en el momento de la separación al final de citoquinesis (Arellano *et al.* 1996; Nakano *et al.* 1997; Arellano *et al.* 1999a). El incremento de la expresión de **Rho1** induce la aparición de grandes cúmulos de actina distribuidos por toda la célula y un incremento del grosor de la pared celular, apareciendo en

ocasiones células encadenadas, lo que sugiere, junto a la lisis del mutante, un papel en citoquinesis (Arellano *et al.* 1997, 1999a).

Los efectores de **Rho1** mejor conocidos son las β -(1,3)-GSs, responsables de la biosíntesis del β -(1,3)-glucano, componente más abundante de la pared celular, y las proteínas **Pck1** y **Pck2**, kinasas de la familia PKC (Arellano *et al.* 1996, 1999b) (Figura 14). **Rho1**, **Pck1** y **Pck2** funcionan como activadores de la cascada de MAPK de integridad celular, la cual se activa frente a condiciones adversas y regula la separación celular, morfogénesis, síntesis de pared y homeostasis iónica (Madrid *et al.* 2006; Perez & Cansado 2010). Hasta la fecha no se han encontrado efectores de **Rho1** en la regulación del citoesqueleto de actina.

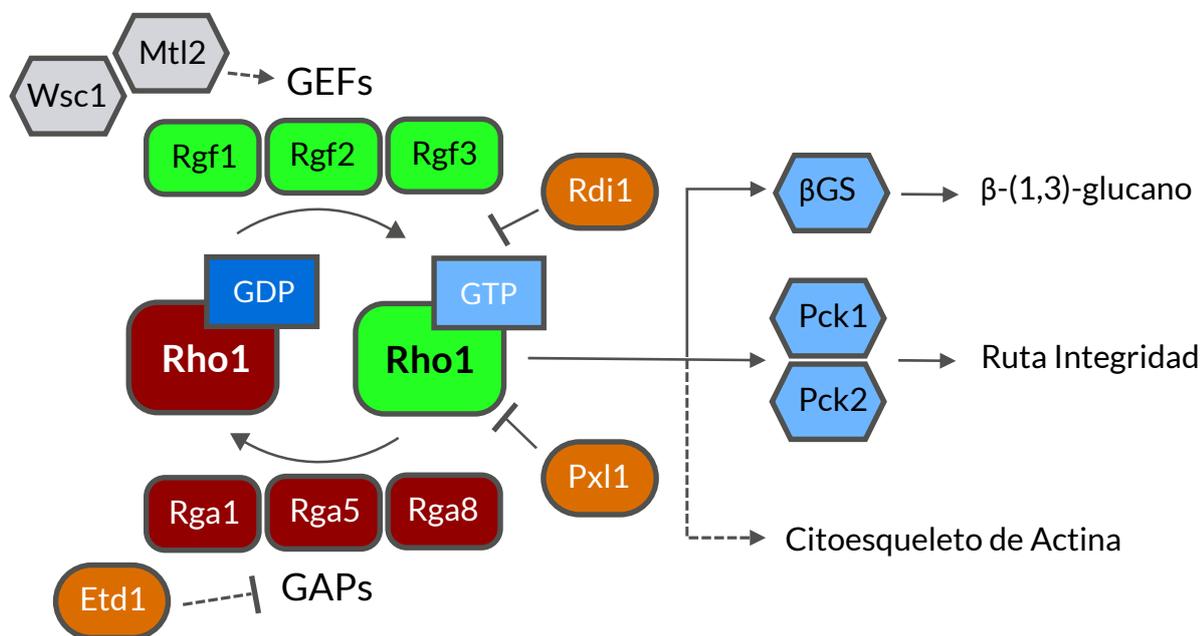


Figura 14 Reguladores y efectores de la GTPasa Rho1. Las líneas continuas son interacciones demostradas, las líneas discontinuas representan vías hipotéticas.

En lo que respecta a los componentes activadores de **Rho1** en respuesta a daños en la pared celular, hay dos proteínas **Mtl2** y **Wsc1**, con características similares a los sensores de estrés de *S. cerevisiae*, que actúan activando a la GTPasa. Ambas proteínas son necesarias para mantener los niveles fisiológicos de **Rho1-GTP** bajo el estrés crónico de la pared celular producido por agentes antifúngicos (Cruz *et al.* 2013). Recientemente se ha visto que mutaciones en uno de estos sensores aumentan la fragilidad de las células en respuesta a cambios en la presión (Minc 2019), y que la falta de **Wsc1** afecta a la homeostasis de la pared durante el crecimiento (Davì *et al.* 2018).

Regulación de Rho1

La actividad de **Rho1** está regulada por tres GEFs: **Rgf1**, **Rgf2** y **Rgf3** (Mutoh *et al.* 2005). A grandes rasgos **Rgf1** activa a **Rho1** durante el crecimiento polarizado y participa en la reorganización de la actina, necesaria para iniciar la transición de crecimiento monopolar a crecimiento bipolar (García *et al.* 2006a). **Rgf2** activa a **Rho1** durante el proceso de esporulación (García *et al.* 2009a). **Rgf3** activa a **Rho1** durante citoquinesis y regula específicamente la síntesis del β -(1,3)-glucano del septo de división (Tajadura *et al.* 2004; Morrell-Falvey 2005). Otro de los Rho-GEFs, **Gef2**, interacciona *in vitro* con **Rho1**, **Rho4** y **Rho5** (Zhu *et al.* 2013). **Gef2** participa en la estabilización de los nodos durante la formación del anillo de actomiosina (Ye *et al.* 2012), pero se desconoce si lo hace activando a **Rho1** o a otra GTPasa de la misma familia.

Además de los GEFs, **Rho1** está regulada por tres proteínas GAP, **Rga1**, **Rga5** y **Rga8**, y por una proteína GDI, **Rdi1** (Figura 14). **Rga1** tiene un papel importante en el crecimiento celular y la morfogénesis (Nakano *et al.*, 2001); **Rga5** participa en citoquinesis y regula de forma negativa la actividad β -(1,3)-GS (Calonge *et al.* 2003); **Rga8** tiene actividad GAP *in vivo* sobre **Rho1** en *S. pombe*, pero su función se desconoce (Yang *et al.* 2003). **Rdi1** es el único GDI descrito en *S. pombe*, pero se desconoce el proceso celular en el que participa (Nakano *et al.* 2003).

Otras proteínas son también capaces de regular la actividad de **Rho1**. La paxilina **Pxl1**, que participa en la estabilidad, anclaje y constricción del CAR en combinación con **Bgs1** (Cortés *et al.* 2015), actúa como regulador negativo de **Rho1** (Pinar *et al.* 2008). También se ha visto que **Etd1**, regulador de la ruta SIN que controla el inicio de la septación (Daga *et al.* 2005; Cortés *et al.* 2018), se une directamente a **Rho1** y actúa como activador de la GTPasa (Alcaide-Gavilán *et al.* 2014). Además, los mismos autores han descrito que **Rho1** actúa como activador de la ruta SIN, a través de un mecanismo de retroalimentación positiva que incluye a **Etd1**, **Rho1** y la GTPasa de la ruta SIN **Spg1**. Ya que **Etd1** no muestra actividad GEF *in vitro* (Cortés & McCollum 2009), se ha propuesto que podría activar a **Rho1** compitiendo con sus GAPs o reguladores negativos (Alcaide-Gavilán *et al.* 2014).

GEFs de Rho1

Los GEFs de la GTPasa **Rho1**, como la mayoría de Rho-GEFs, son proteínas con múltiples dominios. Todas ellas presentan el dominio *Dbl1-homology* (DH) o Rho-GEF, que establece contacto con la GTPasa y cataliza la disociación del GDP, y en muchos casos este dominio va seguido de un dominio *Pleckstrin homology* (PH) de unión a fosfolípidos (Rossman *et al.* 2005).

En *S. pombe* existen 8 proteínas con dominio Rho-GEF. **Rgf1**, **Rgf2** y **Rgf3** son reguladores de **Rho1** (Morrell-Falvey 2005; Mutoh *et al.* 2005; García *et al.* 2006b; a); **Scd1** y **Gef1** actúan como GEF específicos de **Cdc42** (Coll *et al.* 2003; Hirota *et al.* 2003); **Gef3** es un activador de **Rho4**

(Muñoz *et al.* 2014b; Wang *et al.* 2015), mientras que los GEFs *Gef2* (Ye *et al.* 2012) y *Mug10* y no han sido asignados a ninguna GTPasa (Figura 15).

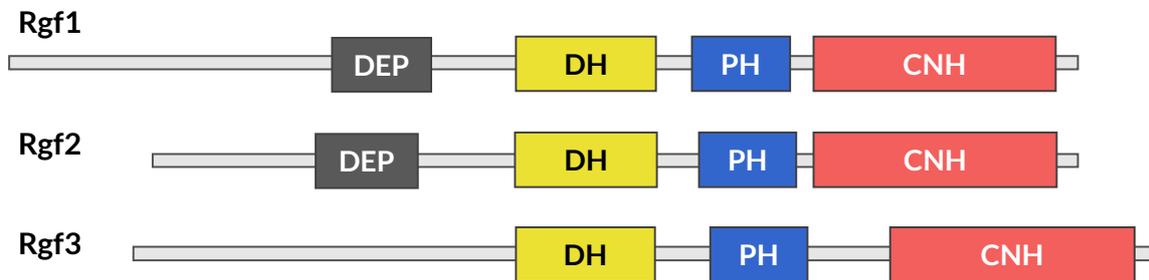


Figura 15 Esquema de los dominios de los GEF de Rho1.

Por estudios cristalográficos sabemos que la unión del dominio DH induce cambios conformacionales en las regiones switch y P-loop de la GTPasa, dejando el resto de la estructura sin grandes cambios (Dvorsky & Ahmadian 2004; Bos *et al.* 2007; Cherfils & Zeghouf 2013). El dominio DH estabiliza los intermediarios de Rho libres de nucleótido, lo que conduce a la carga del GTP debido a los altos niveles de GTP intracelular (Buchsbaum 2007). Los dominios DH contienen tres regiones conservadas (CR1, CR2 y CR3) que forman estructuras similares a α -hélices dispuestas hacia la superficie. Las sustituciones de aminoácidos dentro de estas regiones conservadas reducen la actividad intercambiadora de nucleótido. En *S. pombe*, una mutación puntual localizada en la hélice H8 (CR3) de *Rgf3*, o la eliminación de cuatro aminoácidos en la misma región del los dominios DH de *Rgf1* y *Rgf2* produce un fenotipo de pérdida de función (Tajadura *et al.* 2004; García *et al.* 2006a, 2009a).

Los dominios PH de los Rho-GEFs presentan una variedad de funciones reguladoras, pueden ser autoinhibidores, ayudar en la reacción de intercambio de nucleótido o dirigir a los Rho-GEFs hacia las membranas que contienen fosfoinosítidos (Rossman & Sondek 2005). Una mutación en *Rgf3* que se encuentra entre los dominios PH y CNH (*citron and NIK1-like kinase homology*), el mutante *lad1-1*, impide que *Rgf3* se localice en el anillo de actomiosina durante la citoquinesis (Morrell-Falvey 2005). Del mismo modo, en el mutante *Rgf1 Δ PH-GFP* la localización normal de *Rgf1* en los dos polos desaparece y la señal se vuelve monopolar (Muñoz *et al.* 2014a).

Aparte del módulo DH-PH, *Rgf1*, *Rgf2* y *Rgf3* contienen dominios de interacción proteína-proteína. *Rgf1* y *Rgf2* tienen un dominio DEP que fue descubierto en moscas (*Disheveled*), gusanos (*EGL-10*) y mamíferos (*Pleckstrin*). Se trata de un dominio globular de unos 100 aminoácidos presente en familias de proteínas con diversas funciones relacionadas con la

transducción de señales. La función más conocida de los dominios DEP es el anclaje a la membrana plasmática, aunque también están involucrados en la terminación de la señal, la unión intra-dominios y la dimerización (Xu & He 2010; Consonni *et al.* 2014; Gammons *et al.* 2016). **Rgf1** y **Rgf2**, los dos GEFs que contienen un dominio DEP, se localizan en ambos polos y en el septo, mientras que **Rgf3**, que carece del dominio DEP, se localiza exclusivamente en el anillo (Tajadura *et al.* 2004; Morrell-Falvey 2005; Mutoh *et al.* 2005). Además en el mutante **Rgf1 Δ DEP**, que carece de 26 aminoácidos en este dominio, la proteína desaparece parcialmente de los polos y se acumula dentro del núcleo (Muñoz *et al.* 2014a).

Los tres GEFs tienen un dominio regulatorio C-terminal CNH (*citron homology domain*), el cual está presente también en el extremo C-terminal de varias kinasas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina. Su función en estos GEFs es desconocida, pero podría ser un dominio de interacción proteína-proteína (Taira *et al.* 2004; Bassi *et al.* 2013). El dominio CNH es esencial para la función **Rgf1** en la integridad y polaridad celular (Muñoz *et al.* 2014a). Además, las células portadoras de deleciones en el dominio CNH de **Rgf3** son inviables (Tajadura 2004) y el intercambio del dominio CNH de **Rgf3** por el respectivo de **Rgf1** no rescata la letalidad en el diploide **rgf3 Δ /rgf3⁺** (datos no publicados).

Rgf3

Rgf3 se localiza exclusivamente en el anillo contráctil (Tajadura *et al.* 2004; Morrell-Falvey 2005; Mutoh *et al.* 2005); aparece en anafase y se cierra con el anillo hasta desaparecer al final de la constricción. El análisis de los componentes del anillo por microscopía de superresolución indica que **Rgf3** se localiza en la capa intermedia del anillo que incluye a **Pxl1**, **Fic1**, **Spa2**, **Pck1**, **Clp1**, **Pom1** y **Cyk3** (McDonald *et al.* 2017). Esta localización depende de **Cdc15**, **Imp2** (Roberts-Galbraith *et al.* 2009, 2010; Davidson *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015) y de la arrestina **Art1**. **Art1** y **Rgf3** interactúan físicamente y su localización es interdependiente; además, ambas proteínas están implicadas en el mantenimiento de los niveles de **Rho1** activo en la zona de la división (Davidson *et al.* 2015).

Rgf3 es, igual que **Rho1**, una proteína esencial y los mutantes conocidos de **Rgf3** presentan defectos relacionados con una activación deficiente de **Rho1** (Tajadura *et al.* 2004; Mutoh *et al.* 2005). Por ejemplo, las células mutantes **lad1-1** se lisan tras la división celular, específicamente cuando comienza la disolución del septo primario (Morrell-Falvey 2005), mientras que las células del alelo mutante **ehs2-1** presentan hipersensibilidad a equinocandina. Esta sensibilidad es suprimida por la sobreexpresión de **Bgs1**, **Bgs2** y **Bgs3** en plásmidos multicopia bajo el control de su propio promotor (Tajadura *et al.* 2004). Estos datos inducen a pensar que **Rgf3** activa a **Rho1** y la actividad β GS tras ser reclutado a la zona del anillo (Tajadura *et al.* 2004; Davidson *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015). Además, la maduración y constricción del anillo son más prolongadas en los

mutantes de *rgf3*⁺ (Mutoh *et al.* 2005; Davidson *et al.* 2015) aunque no se conoce la razón de este retraso o qué componentes del anillo pueden estar afectados. Es posible que *Rgf3* actúe como un enlace físico entre los componentes del CAR y el crecimiento del septo mediado por las enzimas Bgs unidas a la membrana (McDonald *et al.* 2017).

Rgf2

Rgf2 es esencial durante la diferenciación sexual. Se localiza en la periferia de la espora de forma uniforme, probablemente asociada a la membrana interna. La fluorescencia de *Rgf2*-GFP aparece en la fracción de células que ya han sufrido meiosis I y II, cuando el contorno de la espora está perfectamente definido (García *et al.* 2009a). La señal de fluorescencia apenas se ve en las células vegetativas de tipo silvestre, sin embargo, cuando se expresa en un plásmido multicopia con su propio promotor, *Rgf2* se localiza en los polos de crecimiento, el septo y a lo largo de toda la superficie celular (Morrell-Falvey 2005; Mutoh *et al.* 2005; García *et al.* 2009a).

Los datos de localización indican que *Rgf2* también juega un papel durante el crecimiento vegetativo; de hecho, aunque las células *rgf2* Δ crecen como células de tipo silvestre (incluso en situaciones de estrés), la disrupción de *rgf1*⁺ en un fondo genético *rgf2* Δ es letal, lo que sugiere que *Rgf2* comparte con *Rgf1* una función esencial durante el crecimiento vegetativo (Mutoh *et al.* 2005; García *et al.* 2009a). La sobreexpresión leve de *rgf2*⁺ (bajo su propio promotor o con el promotor de *rgf1*⁺ en un plásmido multicopia) rescata completamente el fenotipo de células lisadas del mutante *rgf1* Δ y parcialmente su defecto de crecimiento monopolar (García *et al.* 2009a). La sobreexpresión del alelo de falta de función *rgf2*-*PTTR* Δ (García *et al.* 2009a), bajo el control del promotor *nmt1*, aumenta el porcentaje de células lisadas y monopolares en la cepa silvestre (resultados no publicados). Por tanto, niveles altos de *Rgf2* fenocopian la ausencia de *Rgf1*, sugiriendo que ambas proteínas compiten por los mismos sustratos. En ausencia de *Rgf1*, *Rgf2* asumiría las funciones esenciales sobre *Rho1* durante el crecimiento vegetativo.

Rgf1, principal GEF de la GTPasa Rho1

Rgf1 es una proteína de 1.334 aminoácidos, no esencial, y posiblemente responsable de la mayor parte del *Rho1* activo disponible en la célula. La eliminación de *Rgf1* disminuye enormemente la cantidad de *Rho1* unido GTP (García *et al.* 2006a, 2009b), algo que no ocurre en los mutantes de los otros GEFs.

Rgf1 presenta una localización dinámica durante el ciclo celular; su distribución sigue a la de los parches de actina cortical, que se acumulan en los polos de crecimiento activo durante interfase y se reubican en un anillo central en mitosis (Mutoh *et al.* 2005; García *et al.* 2006a) (Figura 16A). Por consiguiente, la localización de *Rgf1*-GFP en los polos de la célula se ve

fuertemente afectada por el desensamblaje de los filamentos de actina al añadir latrunculina A, pero no por la alteración severa de los microtúbulos después del tratamiento con MBC (resultados no publicados).

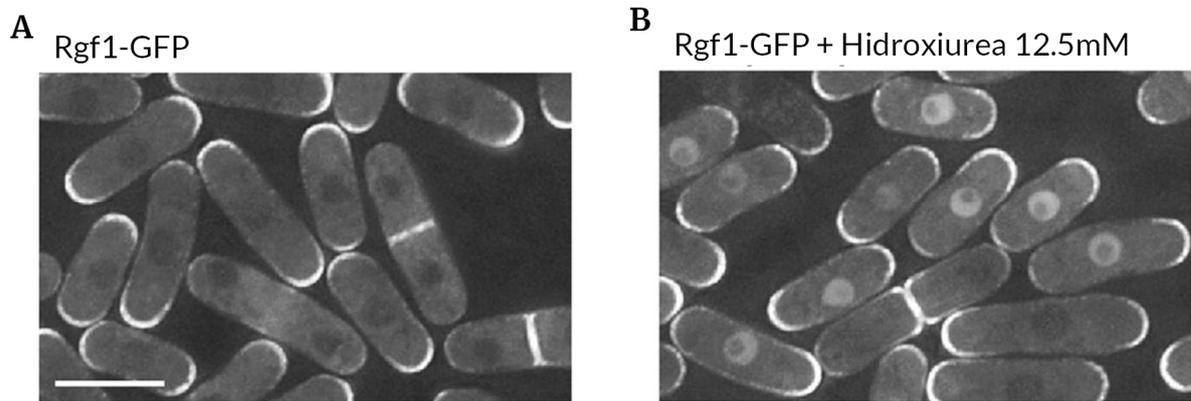


Figura 16 Localización de Rgf1-GFP. (A) En células en crecimiento Rgf1 se localiza en el septo y los polos. (B) Frente al bloqueo replicativo por HU Rgf1 se acumula también en el núcleo. Barra 10 µm. Tomada de (Muñoz *et al.* 2014a).

Rgf1 se acumula en el núcleo en respuesta al daño en la replicación del DNA causado por la presencia de hidroxiurea (HU, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa que bloquea la replicación del DNA) (Figura 16B). En interfase, además de localizarse en los polos, **Rgf1** entra y sale del núcleo, pero en ausencia de estrés su exporte está favorecido de manera que la fluorescencia de **Rgf1-GFP** es menos intensa en el núcleo que en el citoplasma (Muñoz *et al.* 2014a). En presencia de estrés replicativo ocurre lo contrario, se produce un bloqueo de su salida del núcleo. El proceso de importación al núcleo está mediado por una secuencia de localización nuclear (NLS) en el extremo N-terminal, mientras que la liberación en el citoplasma requiere dos secuencias de exportación nuclear ricas en leucina (NES1 y NES2) en la región C-terminal de la proteína (Muñoz *et al.* 2014a).

Rgf1 es necesario en el mantenimiento de la integridad celular y crecimiento bipolar

Aunque **rgf1⁺** no es un gen esencial, en un cultivo asincrónico el ~10% de las células del mutante **rgf1Δ** se lisan (García *et al.* 2006a) (Figura 17). El fenotipo de células lisadas es similar al que se observa en el apagado de **rho1⁺** (Arellano *et al.* 1997), pero mientras que en el caso de **rho1⁺** la mayoría de las células se lisan en parejas (durante la separación), en el mutante **rgf1Δ** la lisis celular ocurre en células individuales y en parejas de células largas que ya han empezado a crecer

por un polo. El mutante *rgf1Δ* es además extremadamente sensible a caspofungina, un antibiótico que inhibe la síntesis del $\beta(1,3)$ -glucano (García *et al.* 2006a).

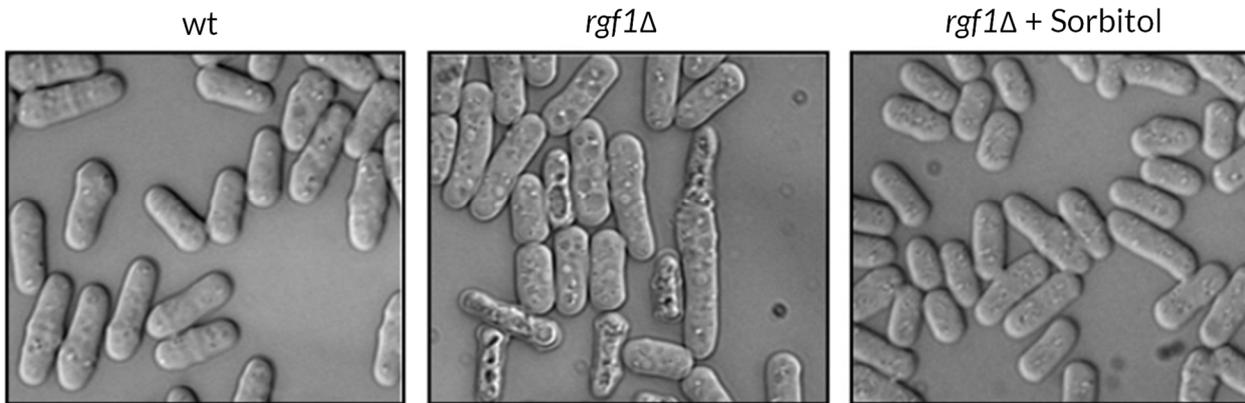


Figura 17 Fenotipo de lisis de las células *rgf1Δ*. Células silvestres y mutantes *rgf1Δ* creciendo en medio YES y YES suplementado con sorbitol 1.2M. Tomada de (García *et al.* 2006a).

Otra característica de las células de *rgf1Δ* es que son monopolares; en un cultivo asincrónico el 80% de las células del mutante presentan crecimiento monopolar comparado con el 20% observado en la cepa silvestre. En ausencia de *Rgf1*, *Cdc42* y los parches de actina se localizan exclusivamente en el polo de crecimiento (García *et al.* 2006a). Estas observaciones apuntan hacia un papel de *Rgf1* en el crecimiento polarizado promoviendo la reorganización de actina necesaria para iniciar el crecimiento en el polo nuevo.

***Rgf1* participa en la tolerancia al estrés replicativo**

Rgf1 se acumula en el núcleo durante el bloqueo replicativo causado por hidroximetilurea (HU) y su presencia en el núcleo protege a las células del estrés replicativo (Muñoz *et al.* 2014a). La HU causa la depleción de los dNTPs al inactivar la ribonucleótido reductasa, con lo que se bloquea la progresión de las horquillas de replicación y se dispara la respuesta del checkpoint de replicación (Boddy & Russell 2001). La kinasa sensora *Rad3* fosforila a la kinasa del checkpoint *Cds1* (también a *Chk1* cuando el daño se produce en G2), que regula a través de sus efectores la parada de la progresión del ciclo celular y la activación de mecanismos de reparación del daño (Langerak & Russell 2011; Lambert & Carr 2013).

La acumulación nuclear de *Rgf1* durante el estrés replicativo depende de *Rad3* y *Cds1*, y de la chaperona *Rad24*. En el modelo propuesto la activación de *Cds1*, recluta a *Rgf1* fosforilada y promueve su interacción con *Rad24*. Esta interacción ocultaría la secuencia NES de *Rgf1*,

reduciendo su asociación con la exportina **Crm1** y bloqueando así su salida del núcleo (Muñoz *et al.* 2014a) (Figura 18).

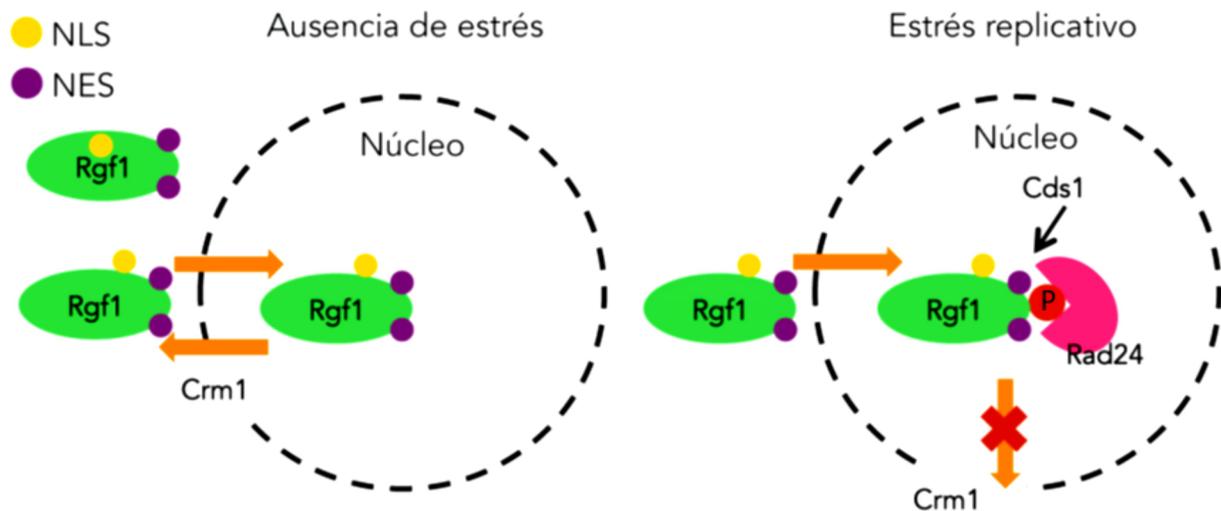


Figura 18 Modelo de la acumulación de Rgf1 en el núcleo en respuesta a estrés replicativo. Traducida de (Muñoz *et al.* 2014a).

Las células que carecen de **Rgf1** son sensibles a HU. Curiosamente, la proteína mutada **Rgf1-9A**, en la que se han sustituido las serinas de los 9 posibles sitios de fosforilación por **Cds1** por alaninas, no se acumula en el núcleo en respuesta a estrés replicativo y tampoco interactúa con **Rad24**. Las células del mutante **Rgf1-9A** son sensibles a HU (Muñoz *et al.* 2014), pero no muestran otros fenotipos característicos del mutante nulo como el crecimiento monopolar o la sensibilidad a caspofungina (Csp) (García *et al.* 2006a, 2009b). Estos datos sugieren que la interacción de **Rgf1** con **Cds1-Rad24** y su acumulación en el núcleo son necesarias específicamente para la tolerancia al estrés de replicación.

Rgf1 está involucrado en la reparación de daño en el DNA

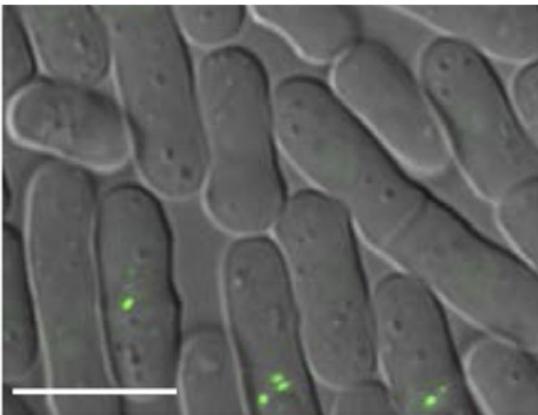
Rgf1 también está implicado en la tolerancia a agentes genotóxicos distintos de HU (Manjón *et al.* 2017). Las células **rgf1Δ** son sensibles a camptotecina (CPT, un inhibidor de la topoisomerasa) y muy sensibles a la exposición a fleomicina (Phl, un derivado de la bleomicina); ambos agentes inducen roturas de doble cadena en el DNA (DSBs) (Levin & Demple 1996; Pommier 2006).

Estas agresiones activan el checkpoint de daño en el DNA, que bloquea la progresión del ciclo celular y promueve la reparación de la rotura a través de dos vías, la recombinación

homóloga (HR) cuando la cromátida hermana está disponible en fase G2 y fase S, y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) en fase G1 (Langerak & Russell 2011; Chapman *et al.* 2012).

Rgf1 participa en la reparación de las roturas de doble cadena producidas por el tratamiento con Phl (Manjón *et al.* 2017). La eliminación de **Rgf1** no afecta al establecimiento de la parada de ciclo inducida por el checkpoint, pero sí impide la recuperación de las células tras producirse el daño en el DNA. Las células de **rgf1Δ** presentan focos de reparación que no se resuelven y son incapaces de reparar eficazmente los cromosomas fragmentados después del tratamiento con Phl (Figura 19). Estos efectos van ligados a la activación permanente de **Chk1** y el bloqueo de las células en G2/M.

wt Rad54-GFP 3h tras Phl



rgf1Δ Rad54-GFP 3h tras Phl

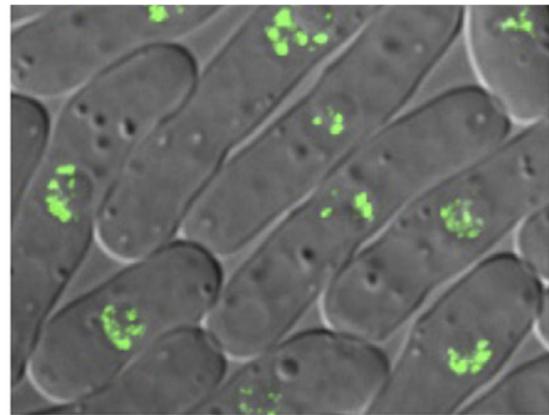


Figura 19 Focos de reparación de daño sin resolver en el mutante *rgf1Δ*. Después de 3 horas en recuperación del tratamiento con fleomicina las células *rgf1Δ* todavía presentan un elevado número de focos de Rad54, a diferencia de la cepa silvestre que ya ha resuelto la mayoría. Barra 10 μm. Tomado de (Manjón *et al.* 2017).

De forma similar a las células *rgf1Δ*, el mutante *rho1-596* (Viana *et al.* 2013) es sensible a CPT y Phl. La tasa de disolución de los focos **Rad52** inducidos por Phl en las células *rho1-596* y en el doble mutante *rgf1Δ rho1-596* es muy similar a la del mutante sencillo *rgf1Δ*, lo que sugiere que **Rho1** participa en la reparación de DSBs (Manjón *et al.* 2017).

Rgf1 es un activador de la ruta de integridad celular

Al estudiar la relación de **Rgf1** con alguno de los efectores conocidos de **Rho1** se vio que la sobreexpresión moderada de *bgs4⁺*, *pck1⁺* y *pck2⁺* suprimía la sensibilidad a Csp del mutante *rgf1Δ* (García *et al.* 2006a). Además de ser efectores de **Rho1**, las kinasas **Pck1** y **Pck2**, son activadores de la ruta de integridad celular (CIP) (Ma *et al.* 2006; Barba *et al.* 2008; Sánchez-Mir *et al.* 2014),

lo que llevó a investigar la relación de **Rgf1** con la ruta CIP. Los datos más relevantes se resumen a continuación:

- I) Las células **rgf1Δ** presentan el fenotipo *vic* (*viable in the presence of immunosuppressant and chlorine ion*), característico de los mutantes nulos de los genes implicados en la ruta de integridad. En *S. pombe* se sabe que la eliminación del gen de la calcineurina, **ppb1⁺**, o la inhibición de su actividad mediante inmunosupresores como FK506, produce hipersensibilidad al ion Cl⁻, mientras que una mutación adicional en los miembros de la ruta de MAPK suprime este fenotipo (Sugiura *et al.* 1999).
- II) Tanto el mutante **rgf1Δ** como los mutantes nulos de los componentes de la ruta son sensibles a estrés osmótico, a Csp y muestran un retraso en la reentrada al ciclo celular desde fase estacionaria (García *et al.* 2009b).
- III) **Rgf1** es necesario para la activación de **Pmk1** en respuesta a estrés osmótico y a daños en la pared celular. Este fenotipo es característico de **Rgf1**, que es el único de los GEFs de **Rho1** implicado en esta señalización (García *et al.* 2009b).
- IV) La sobreexpresión de **rho1⁺** y la de un alelo constitutivamente activo, **rho1-G15V**, aumentan los niveles de fosforilación de **Pmk1** de forma dependiente de **Pck2** y de **Mkh1** (García *et al.* 2009b).

Todos estos datos sitúan a **Rgf1** como un activador de la ruta de integridad celular que podría actuar a través de **Rho1** y/o de **Pck2**.

RESPUESTA CELULAR A ESTRÉS: RUTAS DE MAPK

Las condiciones de crecimiento altamente controladas que se mantienen en los laboratorios tienen muy poco que ver con el ambiente cambiante en el que han evolucionado los seres vivos. Las células no son ciegas al medio externo, al contrario, todos los organismos poseen mecanismos para detectar y responder en consecuencia a los cambios en el ambiente que les rodea. Hablamos de variaciones ambientales, como pueden ser cambios en la temperatura, presión osmótica, pH, disponibilidad de nutrientes, presencia de ciertos iones, otros agentes químicos o radiación. Para recabar la información del medio y transmitir las señales ambientales hacia el interior celular los organismos eucariotas poseen unas vías de señalización conservadas conocidas como cascadas de MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) (Rispaill *et al.* 2009).

Las rutas de MAPK están formadas por cuatro módulos compuestos por proteínas sensoras, proteínas que transmiten la señal, proteínas efectoras y reguladoras. Según la naturaleza del estímulo, los receptores de la señal pueden ser proteínas G acopladas a receptores transmembrana, sistemas de regulación de dos componentes, receptores de membrana tirosina

kinasa o proteínas integrales de membrana. En levaduras, se han identificado receptores pertenecientes a todos los grupos con la excepción de los de tipo tirosina kinasa (Perez & Cansado 2010).

El módulo de transmisión de la señal está integrado por una cascada de kinasas muy conservadas que actúan en orden secuencial (Figura 20), aquí listado en orden inverso de actuación: la MAP kinasa (MAPK), la MAPK kinasa (MAPKK) y la MAPKK kinasa (MAPKKK). Tras la transducción del estímulo la MAPKKK es activada por otras proteínas, ya sean otras kinasas o GTPasas de la familia Ras o Rho (Perez & Cansado 2010). La MAPKKK activa a la MAPKK por fosforilación en residuos de serina o treonina (Ser/Thr). La MAPKK activada actúa como kinasa dual fosforilando a la MAPK en residuos de treonina y tirosina en el loop de activación (Thr-X-Tyr) que induce el cambio conformacional de la kinasa final y su activación (Cargnello & Roux 2011).

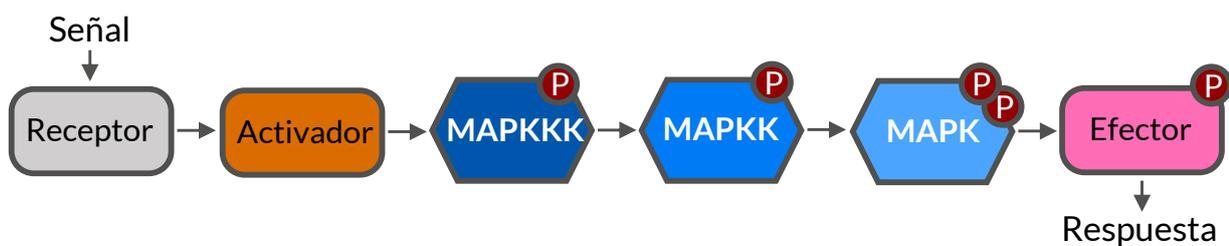


Figura 20 Orden de actuación de los cuatro módulos de las rutas de MAPK. El módulo de transmisión de la señal (en azul) lo forman MAP kinasas que dan nombre a la ruta.

La MAPK fosforila a sus efectores en residuos de serina o treonina seguidos de prolina (Ser/Thr-Pro). Estos efectores son generalmente factores de transcripción que al ser fosforilados cambian el patrón transcripcional de la célula para adaptarse al estímulo, aunque también se han identificado otro tipo de sustratos, como reguladores del ciclo celular, proteínas del citoesqueleto, canales iónicos, remodeladores de cromatina, proteínas de unión a RNA y moduladores de la traducción (Chen & Thorner 2007; Cargnello & Roux 2011).

Las rutas de MAPK no actúan de manera independiente o aislada, de hecho hay una variedad de mecanismos que contribuyen a la especificidad de la respuesta mediada por estas rutas (Chen & Thorner 2007). Uno de los más importantes es el mediado por proteínas que actúan a modo de adaptadores, que mantienen a los componentes de la cascada próximos entre sí y a la membrana plasmática para maximizar la propagación de la señal a la vez que se evita la activación inapropiada de otras respuestas (Atay & Skotheim 2017). Adicionalmente, el

reclutamiento localizado y la compartimentalización subcelular es también parte importante de la regulación de la señal (Atay & Skotheim 2017).

Otro mecanismo de regulación es el que concierne al apagado de la señal. De forma general, en ausencia de los estímulos apropiados, las MAPK se mantienen en niveles mínimos de activación, y tras activarse y desencadenar su señal son inactivadas rápidamente. Esta dinámica se debe a la activación secuencial del módulo de MAP kinasas (Piala *et al.* 2014) y a la acción de proteínas fosfatasas (González-Rubio *et al.* 2019). En conjunto, las propiedades de estos componentes dotan al sistema de un comportamiento del tipo interruptor molecular, capaz de ejercer una respuesta rápida y contundente (Huang & Ferrell 1996; English *et al.* 2015).

Por último está la propia interacción entre las distintas rutas de MAPK, que incluye la participación de más de una ruta en la regulación de un mismo proceso, la interacción entre las distintas proteínas pertenecientes a diferentes rutas de MAPK, así como la interacción entre varias rutas de MAPK entre ellas o con otras vías de señalización (Chen & Thorner 2007; Martínez-Soto & Ruiz-Herrera 2017).

En *S. pombe* existen tres rutas de MAPK: la ruta de integridad celular (CIP), cuya MAP kinasa final es **Pmk1**, la ruta de respuesta a estrés (SAPK), con **Sty1** como elemento final, y la ruta de respuesta a feromonas con la kinasa **Spk1** (Figura 21).

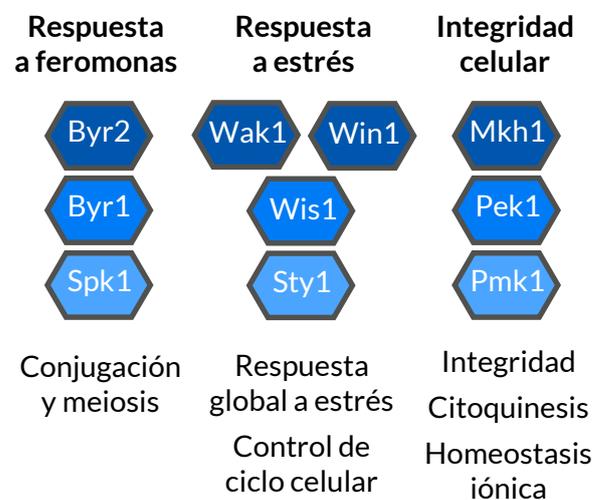


Figura 21 Módulos centrales de las tres rutas de MAPK de *S. pombe* y los procesos en los que intervienen. Adaptado de (Perez & Cansado 2010).

Ruta de integridad celular, CIP

La ruta de MAPK de integridad celular (CIP) se activa frente a estrés osmótico, térmico, oxidativo, daño en la pared celular y ayuno de glucosa (Madrid *et al.* 2006). Gracias al uso de mutantes en sus componentes se sabe que esta ruta participa en la homeostasis de la pared celular, en la homeostasis iónica y en la fusión de vacuolas (Toda *et al.* 1996; Zaitsevskaya-Carter & Cooper 1997; Sugiura *et al.* 1999; Loewith *et al.* 2000; Madrid *et al.* 2006).

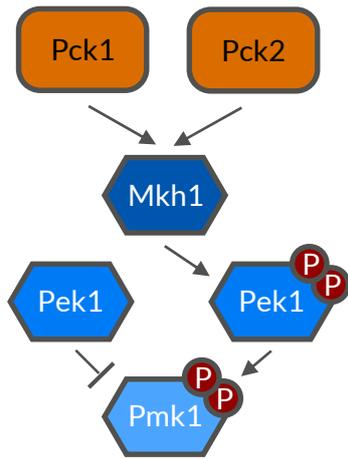


Figura 22 MAP quinasas de la ruta de integridad celular y sus activadores Pck1 y Pck2. Pek1 tiene actividad dual sobre Pmk1 dependiendo de su estado de fosforilación.

El módulo de MAP quinasas de la ruta CIP comienza con la MAPKKK *Mkh1*. *Mkh1* es fosforilada por los reguladores *Pck1* y principalmente *Pck2*, y transmite la señal fosforilando a la MAPKK *Pek1*, con quien se encuentra formando un complejo ternario junto a la MAPK *Pmk1* (Loewith *et al.* 2000; Sánchez-Mir *et al.* 2014) (Figura 22). En su forma activa *Pek1* fosforila a *Pmk1* de manera dual en un residuo de treonina y otro de tirosina (Sugiura *et al.* 1999; Loewith *et al.* 2000), mientras que en su forma no fosforilada actúa como regulador negativo de la MAPK *Pmk1*, inhibiendo la señalización (Sugiura *et al.* 1999). La activación de *Pmk1* es totalmente dependiente de *Mkh1* y *Pek1*, y los mutantes nulos en cualquiera de las tres quinasas presentan los mismos fenotipos, lo que

indica que en este tramo la señalización es lineal (Madrid *et al.* 2006).

Mkh1, *Pek1* y *Pmk1* se localizan en el citoplasma y el septo. *Pmk1* aparece también en el núcleo, huso mitótico y SPB (Madrid *et al.* 2006). La localización de estas tres MAPK no se ve alterada por la inducción de distintos estreses. Tampoco se han observado cambios en la localización de *Pmk1* en ausencia de *Mkh1* o *Pek1*, lo que sugiere que su activación se puede dar tanto en el citoplasma como en el septo y que esto no condiciona su transporte al núcleo (Madrid *et al.* 2006; Sánchez-Mir *et al.* 2012). Curiosamente, un mutante en el que *Pmk1* está mayoritariamente anclada a la membrana plasmática, y por lo tanto excluida del núcleo, se comporta prácticamente igual que la cepa silvestre.

Sensores y reguladores positivos

La identidad de los sensores que detectan el estrés y activan la ruta de integridad celular todavía no se conoce en *S. pombe*. En *S. cerevisiae* las proteínas transmembrana *Wsc1*, *Mtl1* y *Mid2* detectan los cambios mecánicos en la pared celular causados por distintos estreses. Transducen la señal a través de *Rom2*, el GEF de *Rho1*, que a su vez activa a *Pkc1* y este a la ruta de MAPK de integridad celular (Levin 2005).

En *S. pombe* se han descrito las proteínas *Wsc1* y *Mtl2* con estructura similar a los sensores de *S. cerevisiae*. Ambas tienen una cola citoplásmica, un dominio transmembrana y una región rica en serinas y treoninas (altamente glicosilada), *Wsc1* tiene además un dominio rico en cisteínas (Cruz *et al.* 2013). *Mtl2* se localiza en la periferia celular y es necesario para la supervivencia frente a distintos estreses de pared, mientras que *Wsc1* se concentra en las zonas

de crecimiento y su sobreexpresión activa la síntesis de pared celular. *Wsc1* y *Mtl2* participan en la activación de *Rho1*, de hecho, la sobreexpresión de *Rho1* o de sus GEFs rescata el fenotipo letal de la doble delección *wsc1Δ mtl2Δ*. Sin embargo, ninguno de los mutantes individuales presenta defectos en la activación de la ruta CIP en respuesta a estrés osmótico (Cruz *et al.* 2013).

Aun desconociendo el sensor, sí se conoce bastante acerca del módulo de reguladores positivos que activan a la cascada de MAPK. Este está compuesto por las GTPasas de la familia Rho, *Rho1* y *Rho2*, los dos ortólogos de PKC, *Pck1* y *Pck2*, y la kinasa dependiente de fosfolípidos (PDK) *Ksg1* (Figura 23).

Pck1 y *Pck2* son kinasas con un porcentaje alto de identidad en su secuencia. Ambas presentan un dominio regulador en la región N-terminal mediante el cual se unen a la forma activa de las GTPasas *Rho1* y *Rho2* (Matsuyama *et al.* 2006). Esta interacción estabiliza a las kinasas, que de forma normal presentan una vida media reducida. *Pck1* y *Pck2* tienen papeles parcialmente complementarios sobre la viabilidad celular. La doble delección de ambas kinasas resulta inviable, el mutante sencillo *pck2Δ* tiene defectos en polaridad celular, presenta una pared celular delgada y es hipersensible a temperaturas altas, estrés salino y al tratamiento con enzimas líticas (Toda *et al.* 1993; Sengar *et al.* 1997); por su parte el mutante *pck1Δ* presenta sensibilidad a agentes que dañan la pared celular como el calcoflúor, la cafeína y las equinocandinas (Arellano *et al.* 1999b; Calvo *et al.* 2009). La sobreexpresión de *Pck1* no tiene efectos notables, pero la sobreexpresión de *Pck2* origina un incremento en la síntesis de pared celular que acaba siendo letal (Toda *et al.* 1993; Arellano *et al.* 1999b). *Ksg1* actúa como regulador positivo de la ruta de integridad celular en *S. pombe* (Gräub *et al.* 2003), y se asocia y fosforila *in vivo* a *Pck1* y *Pck2* (Madrid *et al.* 2015, 2017).

La GTPasa *Rho2*, a diferencia de *Rho1*, no es esencial, pero comparte con *Rho1* funciones en el control de la polaridad celular, la remodelación del citoesqueleto de actina y la síntesis de la pared celular; además, las dos GTPasas comparten localización en las zonas de crecimiento (Arellano *et al.* 1997; Hirata *et al.* 1998; Calonge *et al.* 2000). La delección de *Rho2* origina células ligeramente redondeadas que son sensibles a glucanasas, caspofungina y cafeína (Hirata *et al.* 1998; Villar-Tajadura *et al.* 2008; Calvo *et al.* 2009). No se conocen los GEFs de *Rho2*, pero sí se han descrito cuatro GAPs: *Rga2*,

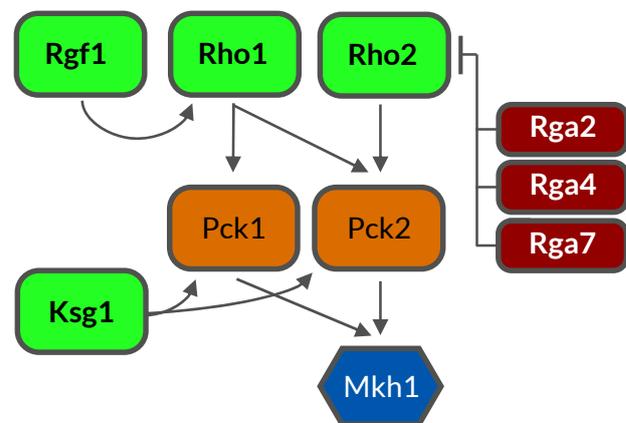


Figura 23 Reguladores positivos de la ruta CIP. Se muestran en granate los GAP de *Rho2* relacionados con la inhibición de la señal.

Rga4, **Rga7** y **Rga6**. De estos, los tres primeros están relacionados con la inhibición de la señal de **Pmk1** (Villar-Tajadura *et al.* 2008; Soto *et al.* 2010; Revilla-Guarinos *et al.* 2016).

Al margen de la activación de la ruta CIP, **Rho1** regula la síntesis del β -(1,3)-glucano de la pared a través de dos vías, una directa modulando la actividad de las enzimas Bgs y otra indirecta a través de la activación de **Pck1** y **Pck2**, que a su vez regulan la síntesis del β -(1,3)-glucano *in vitro* (Arellano *et al.* 1999b). **Rho2** no regula a las enzimas Bgs pero sí controla la actividad de la α -glucán sintasa **Mok1** en una vía únicamente dependiente de **Pck2** (Calonge *et al.* 2000). También se ha propuesto que las GTPasas **Rho4** y **Rho5** actúan como reguladores positivos de la ruta CIP a través de **Pck2**, pues se asocian con esta proteína y con **Pck1**, su sobreexpresión y delección afectan a la fosforilación de **Pmk1** y presentan fenotipo *vic* (Doi *et al.* 2015).

Vías de activación de **Pmk1**

Pmk1 se activa ante múltiples situaciones de estrés que incluyen: temperatura alta, estrés salino (NaCl, KCl, CaCl₂), estrés oxidativo (H₂O₂, diamida, DEM, *t*-BOOH, Paraquat), estrés hipertónico (sorbitol) e hipotónico, estrés en la pared celular (cafeína, vanadato sódico, calcoflúor, caspofungina) y estrés por ayuno de glucosa, pero no de nitrógeno (Zaitsevskaya-Carter & Cooper 1997; Madrid *et al.* 2006; García *et al.* 2009b). Sin embargo, la relación entre los distintos activadores y la cascada de MAPK no es para nada simple y está condicionada por la naturaleza de cada estrés en cuestión. Los detalles fenotípicos de estas relaciones se citan a continuación:

- La presencia de **Rho2** y **Pck2** es crítica para la activación de **Pmk1** frente a KCl, sorbitol y estrés hipotónico, mientras que en los mutantes *rho2* Δ , *pck2* Δ y en el doble *rho2* Δ *pck2* Δ , **Pmk1** responde (aunque con menor intensidad) a los tratamientos con calcoflúor, cafeína, vanadato sódico y ayuno de glucosa. Frente a los tratamientos con DEM y Paraquat la activación de **Pmk1** cae sensiblemente en el mutante *rho2* Δ y drásticamente en *pck2* Δ . Con la exposición a alta temperatura **Pmk1** se activa de forma normal en *rho2* Δ pero no responde en el mutante *pck2* Δ (Barba *et al.* 2008).
- **Rgf1** es necesaria para la activación de **Pmk1** frente a KCl, sorbitol, estrés hipotónico y caspofungina, pero no afecta a la activación de **Pmk1** cuando el estrés es la temperatura o el ayuno de glucosa. Además, la sobreexpresión de **Rho1** aumenta los niveles de fosforilación de **Pmk1** a través de una vía dependiente de **Pck2** (García *et al.* 2009b).
- El mutante termosensible *rho1-596* presenta un nivel de basal de fosforilación de **Pmk1** más alto que la cepa silvestre, que se suprime al deleccionar a *rho2*⁺ o *pck2*⁺. No presenta cambios en la fosforilación de **Pmk1** ante KCl, H₂O₂ y estrés hipotónico. Es posible que en este mutante la activación constitutiva de **Pmk1** sea causada por los defectos en la pared celular señalizados vía **Rho2** y **Pck2** (Viana *et al.* 2013).

- La activación de **Pmk1** frente a H₂O₂ y caspofungina es parcialmente dependiente de **Rho2**. En el doble mutante *rho2Δ rho1-596* los niveles de fosforilación de **Pmk1** son similares a los del mutante sencillo *rho2Δ* en presencia de H₂O₂, pero más bajos en respuesta a caspofungina, poniendo de manifiesto el papel de **Rho1** junto a **Rho2** en la activación de la ruta CIP en respuesta a daño en la pared (Sánchez-Mir *et al.* 2014).
- El mutante *pck1Δ* presenta niveles de fosforilación de **Pmk1** basales más elevados que la cepa silvestre. Este aumento se reduce al deletar *rho2⁺* y todavía más con la mutación adicional de *rho1⁺*. Además, la hiperactivación de **Pmk1** por la sobreexpresión de **Rho1** se atenúa en *pck1Δ* aunque no tanto como en *pck2Δ* (Sánchez-Mir *et al.* 2014).
- Frente a caspofungina la fosforilación de **Pmk1** baja ligeramente en el mutante *pck1Δ*, aunque no tanto como en *pck2Δ* o *rho2Δ*. Esta menor fosforilación debida a la ausencia de *pck1⁺* disminuye todavía más en los mutantes *pck1Δ rho2Δ* y *pck1Δ rho1-596*, y se suprime totalmente en el triple mutante *pck1Δ rho1-596 rho2Δ* (Sánchez-Mir *et al.* 2014). Estos datos indican que **Pck1** también juega un papel, aunque más discreto que **Pck2**, en la respuesta a daños en la pared celular.
- La activación de la ruta CIP ante la limitación de glucosa depende de **Pck2** pero opera a través de un mecanismo independiente de la actividad de **Rho1** y **Rho2** (Madrid *et al.* 2013). Tanto en este caso como en el daño en la pared celular existe un mecanismo en el que participan los complejos de la ruta TOR (*Target of Rapamycin*). Estos complejos actúan incrementando los niveles de **Pck1** y **Pck2**, lo que favorecería la activación de la ruta CIP. Se ha visto que un activador del complejo TORC2, la GTPasa **Rhy1** de la familia Rab, promueve la activación de **Pmk1** a través del tráfico y estabilización de **Ksg1** y **Rgf1** (Madrid *et al.* 2015, 2016, 2017).
- **Pmk1** presenta una fosforilación en condiciones normales que depende del ciclo celular, aumenta en fase M y llega al máximo en citocinesis. La regulación precisa de esta fosforilación cíclica depende de la fosfatasa **Pmp1** (Madrid *et al.* 2007) y es independiente de **Rho2** y de **Pck2** (Barba *et al.* 2008). Aunque no se conoce el papel de **Pmk1** en ausencia de estrés, esto explicaría por qué las células *pmk1Δ* y *pmp1Δ* tienen fallos en separación celular, que a largo plazo se traducen en fenotipos de multiseptación (Madrid *et al.* 2007).

Efectores y reguladores negativos

Se conocen pocos efectores de la ruta CIP en *S. pombe*. En *S. cerevisiae* esta ruta responde regulando la síntesis de polisacáridos de pared así como su transporte polarizado, sin embargo en *S. pombe* no se ha encontrado un papel similar (Perez *et al.* 2018). En *S. pombe*, **Pmk1** fosforila al factor de transcripción **Atf1**, uno de los principales efectores de la ruta de respuesta a estrés SAPK, en respuesta a estrés en la pared celular (Takada *et al.* 2007). **Pmk1** también refuerza la

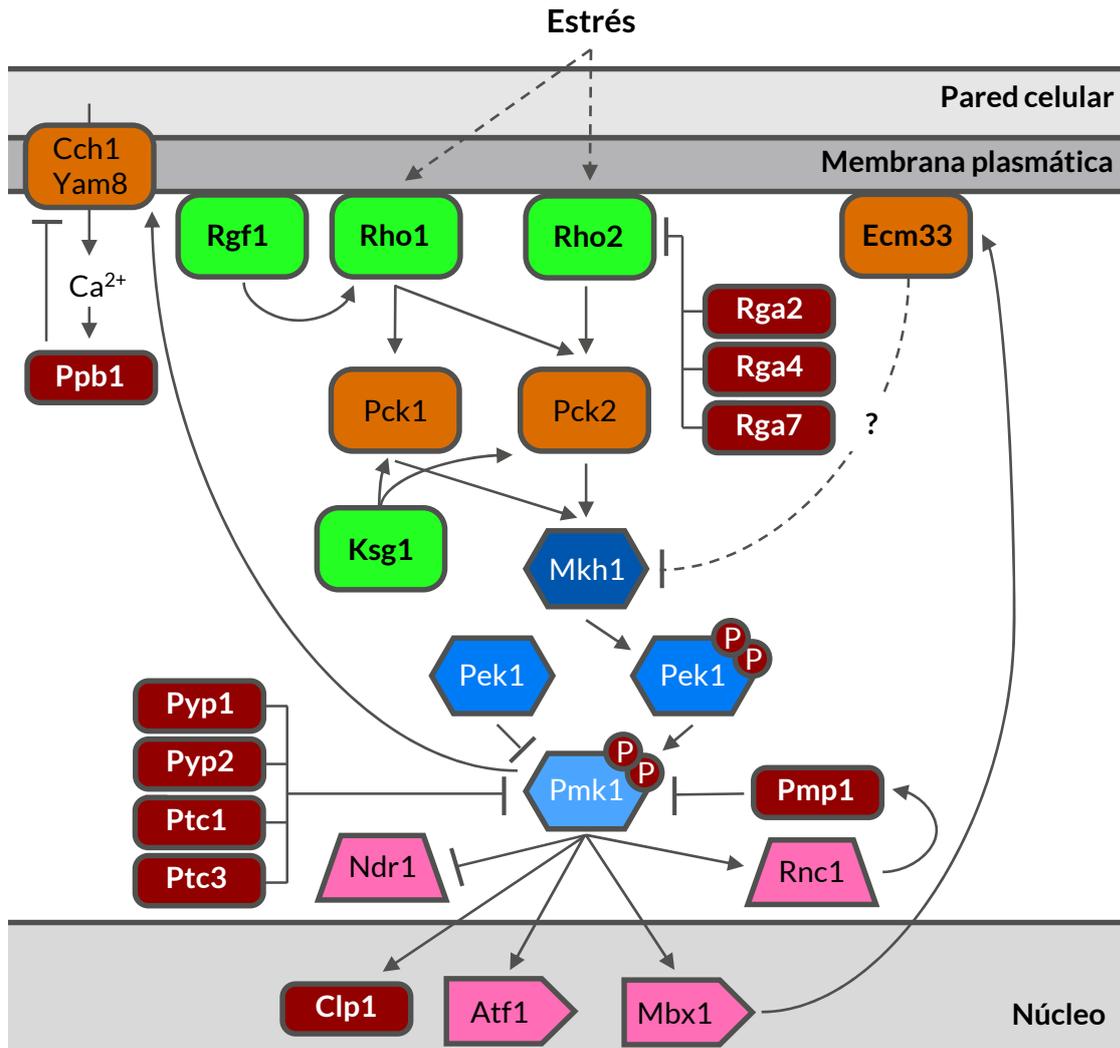


Figura 24 Modelo de la ruta de MAPK de integridad celular CIP, sus activadores, efectores y reguladores. Adaptado de (Perez *et al.* 2018).

respuesta de la ruta SAPK a través de **Atf1** en condiciones de estrés producido por la privación de glucosa (Madrid *et al.* 2013) y frente a estrés oxidativo (Zhou *et al.* 2012). Otro factor de transcripción, **Mbx1**, también tiene un papel en el mantenimiento de la integridad celular de forma dependiente de **Pmk1**. En este caso es a través de la regulación de **Ecm33**, una proteína de la superficie celular anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que se localiza en los polos de crecimiento y en el septo (Fang *et al.* 2014) y que establece un *feedback* de regulación negativa sobre la ruta CIP (Takada *et al.* 2010) (Figura 24).

En su estado activo **Pmk1** fosforila a dos proteínas de unión a RNA, **Nrd1** y **Rnc1**. **Nrd1** estabiliza el mRNA de *cdc4+*, la cadena ligera de la miosina II. Al fosforilar a **Nrd1**, **Pmk1** bloquea su unión con este mRNA, promoviendo su desestabilización (Sato *et al.* 2009). **Rnc1** fosforilado por **Pmk1** estabiliza el mRNA de *pmp1+*, la fosfatasa dual específica de **Pmk1** y principal regulador

negativo (Sugiura *et al.* 1998), estableciendo un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la ruta CIP (Sugiura *et al.* 2003).

Además de **Pmp1** otras fosfatasa también tienen capacidad de unirse y desfosforilar a **Pmk1** *in vivo*, es el caso de **Pyp1**, **Pyp2** y **Ptc1**. Estas tres fosfatasa, que son efectores de la ruta SAPK (su activación transcripcional depende de **Sty1** y **Atf1**), desfosforilan a **Pmk1** en respuesta a estrés osmótico, mientras que **Pyp1**, **Ptc1** y **Pmp1** controlan los niveles basales de fosforilación de **Pmk1** durante el crecimiento vegetativo (Madrid *et al.* 2007). También se ha descrito que **Ptc3** modula junto con **Ptc1** la fosforilación de **Pmk1** (Takada *et al.* 2007). Como hemos visto en el apartado anterior, **Pmp1** juega un papel importante en el control de **Pmk1** durante la separación celular, pues su ausencia produce un fenotipo de multiseptación similar al de la disrupción de **Pmk1** (Sugiura *et al.* 1998; Madrid *et al.* 2007).

En presencia de estrés salino (NaCl, KCl o MgCl₂) **Pmk1** fosforila a **Cch1**. **Cch1** es la subunidad catalítica de un canal de Ca²⁺ del que también forma parte la subunidad **Yam8**, clonada en nuestro laboratorio como el mutante *ehs1-1* (*echinocandin hypersensitive 1*) (Carnero *et al.* 2000). La fosforilación de **Cch1** induce la apertura del canal y la entrada de Ca²⁺ en la célula, lo que promueve la activación de la calcineurina **Ppb1**, una fosfatasa dependiente de calcio. **Ppb1** desfosforila a **Cch1** inhibiendo la entrada de más Ca²⁺. La ausencia de actividad **Ppb1** por su delección o mediante su inactivación con el inhibidor FK506 ocasiona hipersensibilidad a estrés salino en las células, que es suprimida por la delección de los componentes de la ruta CIP, lo que se conoce como fenotipo *vic* (*viable in the presence of immunosuppressant and chlorine ion*) (Ma *et al.* 2011).

Por último, también se ha descrito que **Pmk1** fosforila a la fosfatasa **Clp1**, induciendo junto a **Cdk1** su liberación del nucleolo en presencia de estrés oxidativo mediado por H₂O₂ (Broadus & Gould 2012).

Ruta de respuesta a estrés, SAPK

La ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK) es crítica para la supervivencia de *S. pombe* cuando se enfrenta a una amplia variedad de situaciones que condicionan la homeostasis de la levadura. Por ello los mutantes de los componentes de esta ruta son sensibles o hipersensibles a la presencia de estrés hiperosmótico, metales pesados, temperaturas altas y bajas, radiación UV, aumento de la presión osmótica y estrés oxidativo (Warbrick & Fantès 1991; Millar *et al.* 1995; Shiozaki & Russell 1995; Soto *et al.* 2002; George *et al.* 2007). Estos mutantes también presentan defectos en la transición G₂/M, que se traducen en morfología alargada, pérdida de viabilidad al entrar en fase estacionaria y fallos en la diferenciación sexual ante la limitación de nitrógeno (Shiozaki & Russell 1995; Wilkinson *et al.* 1996).

El módulo de MAP kinasas de la ruta SAPK comienza con dos MAPKKK, **Wis4** (también conocida como **Wak1** o **Wiki1**) y **Win1**. El regulador de respuesta **Mcs4** transmite la señal de estrés uniéndose y activando a **Wis4** y a **Win1**, y es necesario para la activación de la ruta en respuesta todos los estreses (Buck *et al.* 2001; Soto *et al.* 2002). Por otra parte, las dos MAPKKK no se comportan de la misma forma ante todos los tipos de estrés; en algunos casos son redundantes pero en otros son necesarias ambas o domina una de ellas (Shiozaki *et al.* 1998; Quinn *et al.* 2002; Soto *et al.* 2002). **Wis4** y **Win1** fosforilan y activan a la MAPKK **Wis1**, con la excepción de la respuesta frente a estrés térmico o en presencia de arsenito (Nguyen & Shiozaki 1999; Rodríguez-Gabriel & Russell 2005). En el resto de estreses **Wis1** activa a la MAPK **Sty1** en el citoplasma e induce su translocación al núcleo (Gaits *et al.* 1998; Nguyen *et al.* 2002) (Figura 25).

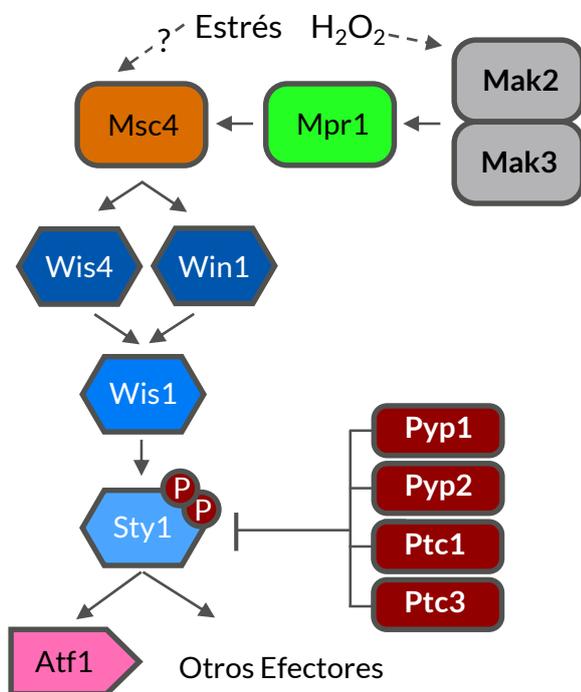


Figura 25 Modelo resumido de la ruta de MAPK de respuesta a estrés SAPK. Adaptado de (Perez *et al.* 2019).

Se sabe poco acerca de los sensores que detectan los daños que activan la ruta SAPK. El único mecanismo de activación conocido es el que concierne a la respuesta ante estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno. En este caso se activa un sistema fosfotransferasa compuesto por dos sensores histidín kinasa, **Mak2** y **Mak3**, que se autofosforilan y que, por medio del transmisor **Mpr1** (**Spy1**), transfieren el grupo fosfato al regulador de respuesta **Mcs4**, quien activa a la cascada de MAPK (Papadakis & Workman 2015). Además, **Mcs4** es necesario para activar a **Sty1** en respuesta a cualquier tipo de estrés, aunque los sensores de estos otros estreses son desconocidos (Perez *et al.* 2019).

De entre los efectores de **Sty1**, **Atf1** es el factor de transcripción que mejor se conoce. La activación de la ruta de MAPK promueve la translocación de **Sty1** al núcleo donde fosforila a **Atf1** (Shiozaki & Russell 1996), lo que permite su interacción con la maquinaria transcripcional (Salat-Canela *et al.* 2017). **Atf1** induce la expresión de un grupo de genes que cooperarán en la respuesta celular al estrés, incluyendo los genes del grupo CESR (*core environmental stress response*) (Chen *et al.* 2003). **Sty1** también controla la expresión génica a través de otros efectores como proteínas de unión a RNA (**Csx1**, **Cip1**, **Cip2** y **Upf1**) y factores de regulación de la traducción

(eEF2, eIF2 α y eIF3a) (Perez *et al.* 2019). Otros efectores de **Sty1** actúan como reguladores de la entrada en mitosis (**Srk1**, **Plo1** y **Cdr1**) (Opalko & Moseley 2017; Perez *et al.* 2019).

Las tirosina fosfatasas **Pyp1** y **Pyp2** regulan negativamente a **Sty1** desfosforilándola conjuntamente en situaciones de estrés, mientras que **Pyp1** inhibe a **Sty1** durante el crecimiento vegetativo en ausencia de estrés (Opalko & Moseley 2017). Las serina/treonina fosfatasas **Ptc1** y **Ptc3** recuperan los niveles basales de fosforilación de **Sty1** tras su activación por choque térmico (Nguyen & Shiozaki 1999). **Sty1** junto a **Atf1** induce la expresión de estas fosfatasas, estableciendo así un mecanismo de retroalimentación negativa que se encarga de amortiguar la señalización como parte de la respuesta al estrés (Degols *et al.* 1996; Wilkinson *et al.* 1996).

2

OBJETIVOS

Los GEFs de la familia Rho son proteínas clave en la citoquinesis desde mamíferos a levaduras. Sin embargo, en *S. pombe* su papel en la biosíntesis de la pared celular ha enmascarado su función en etapas más tempranas, como el ensamblaje y contracción del anillo de actomiosina y la invaginación de la membrana.

Entre los GEFs de *Rho1*, solo se conoce parcialmente la función de *Rgf3* en citoquinesis. *Rgf1* y *Rgf2* también se localizan en la zona de división y entre los dos desempeñan una función esencial. Para determinar si esta función esencial era la citoquinesis obtuvimos un mutante termosensible *rgf1-Δ45 rgf2Δ* y vimos que el principal defecto del mutante se manifiesta durante el crecimiento polarizado y no durante la separación celular. Aun así, nos pareció interesante estudiar el papel de *Rgf1* en la división celular.

A continuación, se describen los objetivos que nos propusimos al iniciar este trabajo:

- Analizar la localización de *Rgf1* durante la citoquinesis.
- Estudiar la relación de *Rgf1* con componentes del anillo contráctil y la ruta de inicio de septación.
- Buscar fenotipos relacionados con defectos en citoquinesis en el mutante *rgf1Δ*.

RESULTADOS

RGF1 SE LOCALIZA JUNTO AL ANILLO CONTRÁCTIL DE ACTOMIOSINA

Rgf1 se localiza en interfase en los polos de crecimiento de *S. pombe*, pasando de un único polo tras la división celular a ambos después de que tenga lugar la transición a crecimiento bipolar (NETO). Durante la división celular cesa el crecimiento por los polos y la maquinaria de síntesis de la pared se relocaliza a la zona media de la célula para formar el septo. En este momento **Rgf1** desaparece de los polos y aparece concentrado en la zona de septación, en forma de un disco transversal que colocaliza con la señal del septo teñido por blankophor (García *et al.* 2006b; a).

En ocasiones se puede observar esta estructura resuelta como dos discos paralelos separados por lo que sería el propio septo, presumiblemente localizados en la nueva membrana fruto de la citoquinesis (Figura 26).

Para conocer la dinámica concreta de los cambios de localización de **Rgf1** durante la citoquinesis y establecer su cronología con respecto a la mitosis realizamos el seguimiento de la fluorescencia de **Rgf1-GFP** en el tiempo mediante microscopía en time-lapse. A la vez que visualizamos la fluorescencia de **Rgf1** en el canal verde tomamos fotografías de marcadores fluorescentes en otros canales de emisión (rojo y cian) para seguir los eventos mitóticos y de citoquinesis. Utilizamos **Sad1-DsRed**,

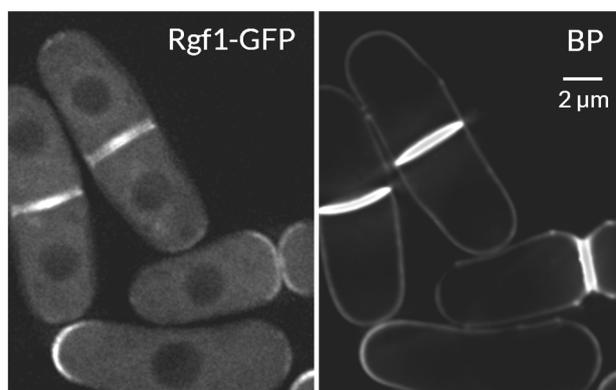


Figura 26 Rgf1 se localiza en la zona de división además de en los polos de la célula. Imagen de fluorescencia en DeltaVision de Rgf1-GFP teñidas con BP para marcar el septo.

proteína asociada al SPB, como marcador de la progresión mitótica (Hagan & Yanagida 1995). Este marcador nos permite diferenciar las distintas etapas de la mitosis en base a la distancia que separa a los dos SPBs, además de la propia segregación de los SBP al comienzo de la mitosis que utilizamos como tiempo 0 en las reconstrucciones fotográficas (Nabeshima *et al.* 1998).

El componente regulador de la cadena ligera de la miosina **Rlc1-tdTomato** nos sirve como marcador de las etapas del desarrollo del anillo de actomiosina (CAR), pues es uno de los componentes tempranos del anillo (aparece en los nodos) y permanece formando esta estructura hasta el final de la constricción (Wu *et al.* 2003). Por último, utilizamos el blankophor (BP, también llamado calcoflúor o fluorescent brightener), colorante fluorescente que se une al β -glucano en *S. pombe* (Cortés *et al.* 2007), y nos sirve para identificar el inicio de la síntesis del septo y seguir su progresión (Ribas & Cortés 2016).

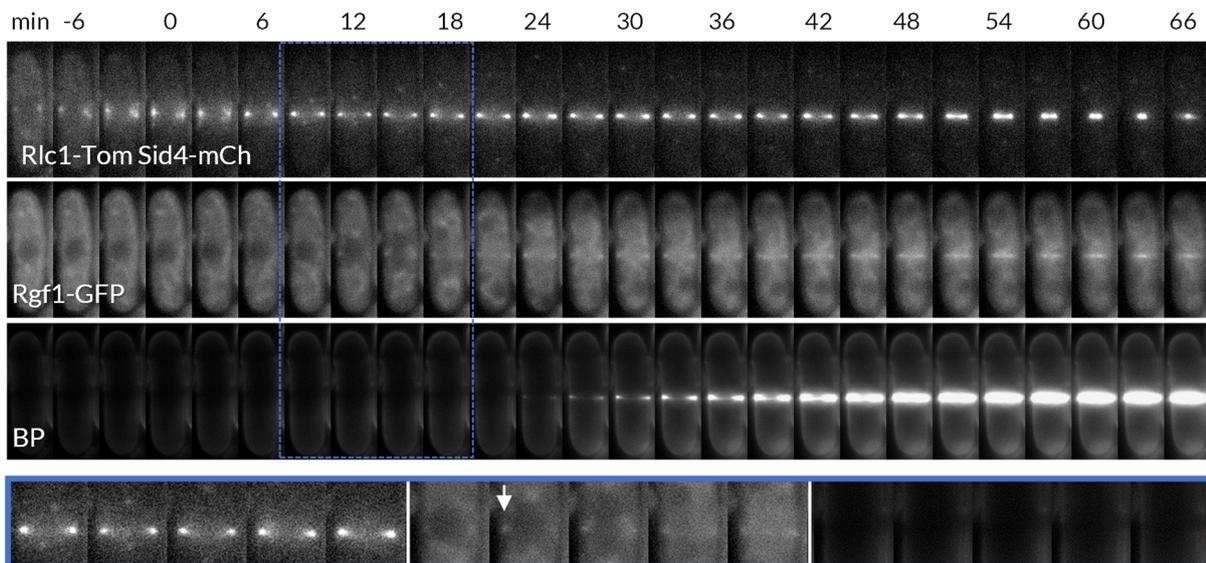


Figura 27 Rgf1 llega a la zona de división en la fase de maduración del anillo. Imágenes de time-lapse en DeltaVision de células marcadas con Rlc1-tdTomato, Sid4-mCherry, Rgf1-GFP y teñidas con BP. Fotografías tomadas cada 3 minutos. Debajo se muestra una ampliación del intervalo señalado en azul (9-18 min). La flecha señala la aparición de Rgf1.

Rgf1-GFP aparece en la zona de división hacia el final de anafase A, cuando los SPBs se han separado, pero todavía se encuentran próximos a la zona media de la célula (Figura 27, recuadro azul). En este punto el anillo de actomiosina ya presenta una estructura anular definida con una señal de fluorescencia homogénea, lo que indica que ha concluido la coalescencia de los nodos y con ello la fase de formación. En el momento en el que se detecta, **Rgf1** se localiza junto con **Rlc1** en una estructura anular (Figura 27). Además, en este instante el anillo de actomiosina marcado por **Rlc1-tdTomato** se encuentra en su diámetro máximo y permanece así varios minutos antes

de iniciar la constricción. Estos resultados indican que **Rgf1** llega a la zona de división cuando el anillo se encuentra en la fase de maduración. En esta etapa desaparece **Mid1** y aparecen las proteínas con motivo F-BAR (**Imp2**, **Pxl1**, **Fic1**) (Roberts-Galbraith *et al.* 2009), la tropomiosina (Skau & Kovar 2010), la miosina no-convencional **Myp2** (Laplante *et al.* 2015) y la β -glucán sintasa **Bgs1** (Goss *et al.* 2014) entre otras.

La señal de blankophor en la zona del septo es indetectable hasta minutos después de la llegada de **Rgf1** (Figura 27), por lo que pensamos que **Rgf1** es reclutada a la zona de división antes de que se inicie la septación. Durante la constricción **Rgf1** progresa con el anillo y se invagina hacia el interior celular. Sin embargo, en esta etapa en la que se aprecia cómo el anillo sufre una disminución progresiva de su diámetro, **Rgf1** presenta un comportamiento diferente. Su señal de fluorescencia, originalmente como un anillo en la periferia celular, va extendiéndose hacia el centro de la célula en un avance que acompaña al de la constricción del anillo. La dinámica de localización de **Rgf1** se asemeja pues más a la del septo o la membrana, la formación centrípeta de un disco (Figura 26), que a la del anillo contráctil, aunque estos tres procesos progresan a la vez.

Recientemente hemos podido fotografiar estas mismas células utilizando microscopía óptica de superresolución (Figura 28). Las imágenes muestran en detalle cómo **Rgf1-GFP** se localiza en forma de invaginaciones desde la periferia celular que no pueden ser otra cosa más que la membrana plasmática, ya que, como reflejan los line-scan, su señal no colocaliza con el anillo de **Rlc1**.

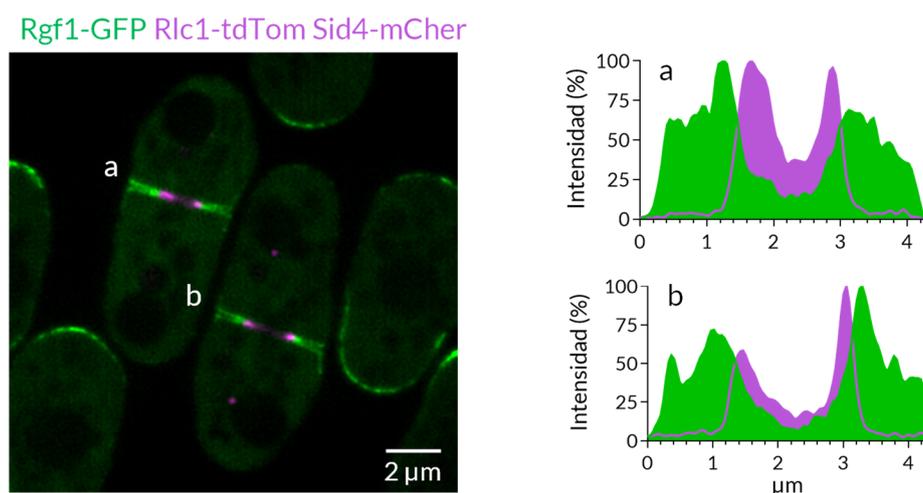


Figura 28 Localización en detalle de Rgf1. Imagen de superresolución en Olympus IX71 de células marcadas con **Rgf1-GFP**, **Rlc1-tdTomato** y **Sid4-mCherry**. Derecha, line-scan de la intensidad de fluorescencia de **Rgf1-GFP** y **Rlc1-tdTomato** a lo largo de los anillos de la imagen.

LA LOCALIZACIÓN DE RGF1 EN EL SEPTO DEPENDE DE SU INTERACCIÓN CON LOS COMPONENTES DEL CAR

Puesto que la relocalización de *Rgf1* en la proximidad del anillo se produce una vez que este se ha formado, nos preguntamos si su reclutamiento era dependiente del estado del anillo. Para ello examinamos la localización de *Rgf1-GFP* en distintos mutantes termosensibles con defectos en la formación o mantenimiento del anillo de actomiosina. Entre los mutantes utilizados están *cdc15-140*, *cdc3-6*, *cdc11-119* y *sid2-250* (Nurse *et al.* 1976; Balasubramanian *et al.* 1994, 1998; Fankhauser *et al.* 1995). En estos experimentos, cultivos de células mutantes y de la cepa silvestre que expresan de manera endógena *Rgf1-GFP*, se incubaron a 25°C hasta alcanzar la fase exponencial y se pasaron a 36°C (temperatura restrictiva) 3h antes de tomar las fotografías. También se realizó una tinción con BP en el momento para visualizar el septo.

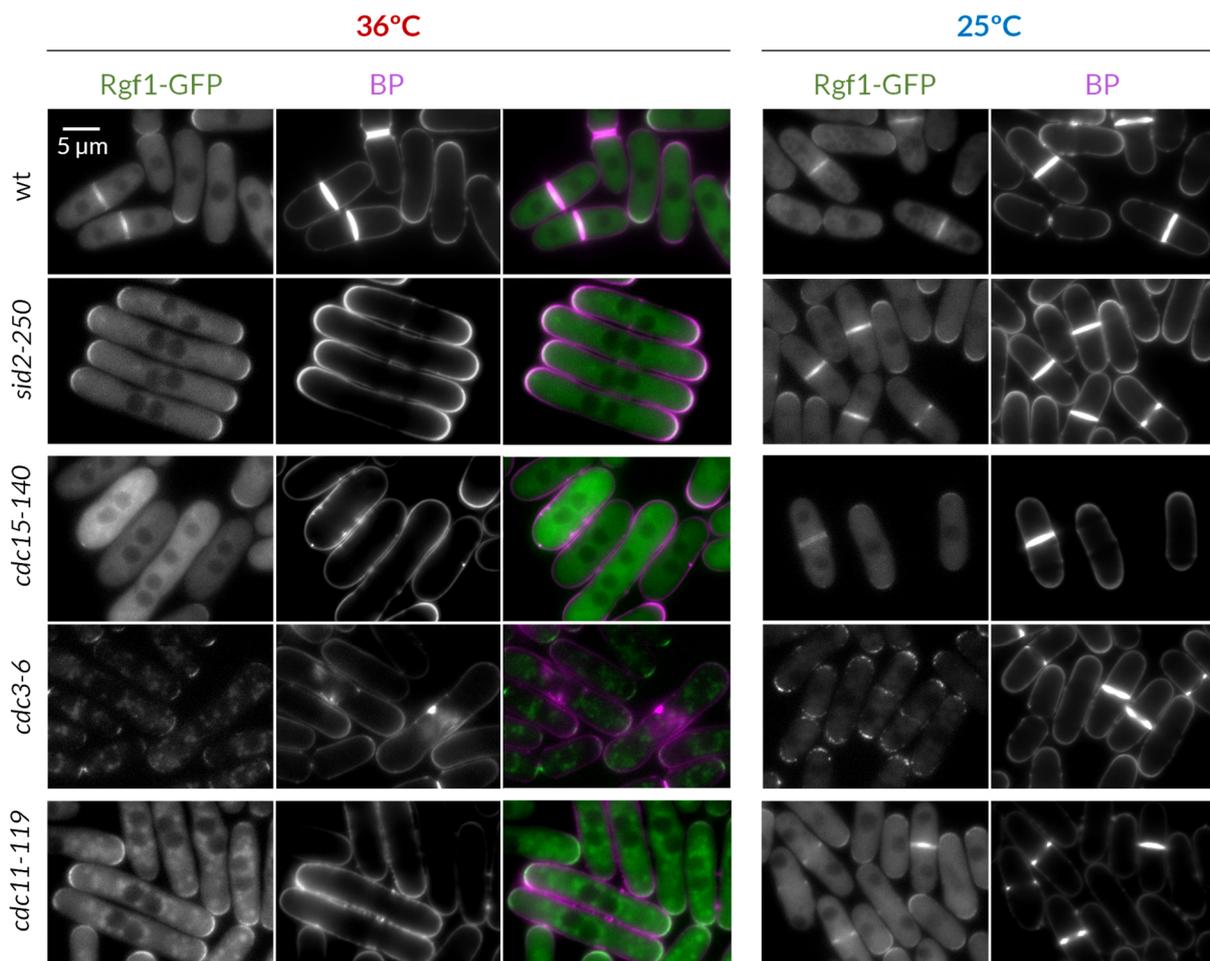


Figura 29 La localización de *Rgf1* en la zona de división se ve afectada en mutantes defectivos en la formación del CAR. Imágenes de fluorescencia en DeltaVision de *Rgf1-GFP* y BP. Las células de las cepas indicadas fueron crecidas a 25°C (panel derecho) y después pasadas 3h a 36°C (panel izquierdo).

En la cepa silvestre a 36°C, **Rgf1-GFP** se localiza en la zona del septo (marcada por la señal de BP), sin embargo, en ninguno de los mutantes es posible detectar Rgf1 en la misma zona (**Figura 29**). En las condiciones del experimento (36°C), estos mutantes son incapaces de formar o mantener el CAR, por lo que tampoco pueden generar septos más allá de alguna marca de BP en la periferia, señal de una septación abortiva (Gould & Simanis 1997; Balasubramanian *et al.* 1998).

Curiosamente, en el mutante *cdc3-6* la señal de **Rgf1-GFP** en los polos de la célula se ve como puntos discretos en lugar de una banda uniforme (**Figura 29**). Esta distribución aparece tanto a 25°C como a 36°C, aunque en este caso se aprecia peor, y podría estar relacionada con el mecanismo de unión de **Rgf1** a la actina en los polos.

Aunque en la mayoría de estas las células **Rgf1** está ausente de la zona de división, hay un pequeño porcentaje en las que todavía observamos dicha señal (**Figura 30, triángulos**). Examinamos el origen de estas excepciones a través del marcador **Rlc1-tdTomato**, que nos permite observar el estado del CAR junto a **Rgf1-GFP**.

En condiciones restrictivas (36°C) sobre los fondos mutantes *cdc15-140* y *cdc11-119* vemos ahora con el doble marcaje fluorescente cómo esa señal infrecuente de **Rgf1-GFP** en la zona media de la célula se corresponde con puntos en los que todavía se ve señal de **Rlc1-tdTomato** (**Figura 30**). Esta señal de **Rlc1** es de uno o pocos puntos discretos de baja intensidad, probablemente partes de anillos no formados o restos de anillos disueltos fruto de la pérdida de actividad propia de estos mutantes. Por tanto, para que **Rgf1** se localice en la zona de división de la célula es necesario que previamente exista un CAR estable.

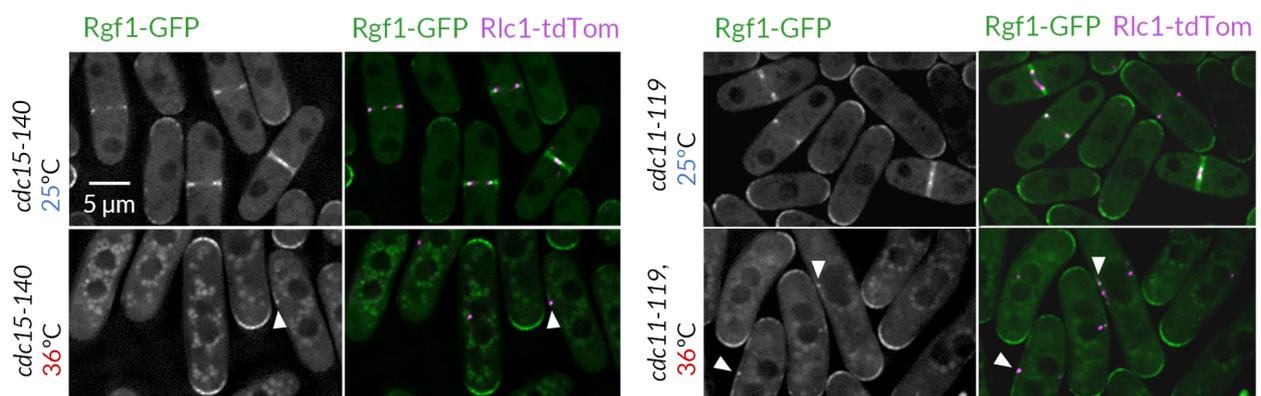


Figura 30 Rgf1 requiere la presencia del CAR para localizarse en la zona de división. Imágenes de fluorescencia de células *cdc15-140* y *cdc11-119* que expresan **Rgf1-GFP** y **Rlc1-tdTomato** a 25°C y 3h a 36°C, tomadas en DeltaVision. Los triángulos señalan puntos donde **Rgf1-GFP** permanece en la zona media y sus respectivas señales de **Rlc1-tdTomato**.

A continuación, analizamos las interacciones genéticas entre *Rgf1* y las proteínas que forman el CAR. En primer lugar, obtuvimos cepas que llevan la delección de *Rgf1* junto con mutaciones o deleciones en genes de los componentes del CAR y después examinamos su capacidad de crecimiento a distintas temperaturas en ensayos de gota. Los datos obtenidos se muestran en la **Figura 31**. Aunque crecen un poco peor, no hay una diferencia grande en el crecimiento de los mutantes *rgf1Δ cdc4-8* y *rgf1Δ rlc1Δ* comparados con los mutantes simples de las miosinas *cdc4-8* y *rlc1Δ*. Sin embargo, vimos una interacción fuerte entre el mutante *rgf1Δ* y los mutantes *cdc15-140* e *imp2Δ* (mutantes en las proteínas BAR, *Cdc15* e *Imp2*), que son componentes estructurales del CAR, también con el mutante *cdc12-112* (mutante de la formina *Cdc12*). Así, mientras los mutantes sencillos son capaces de formar colonias (entre 30°C y 32°C), los dobles mutantes que carecen de *Rgf1* son inviables. Estos resultados sugieren que *Rgf1* podría colaborar con proteínas citoquinéticas para que la división celular se desarrolle correctamente.

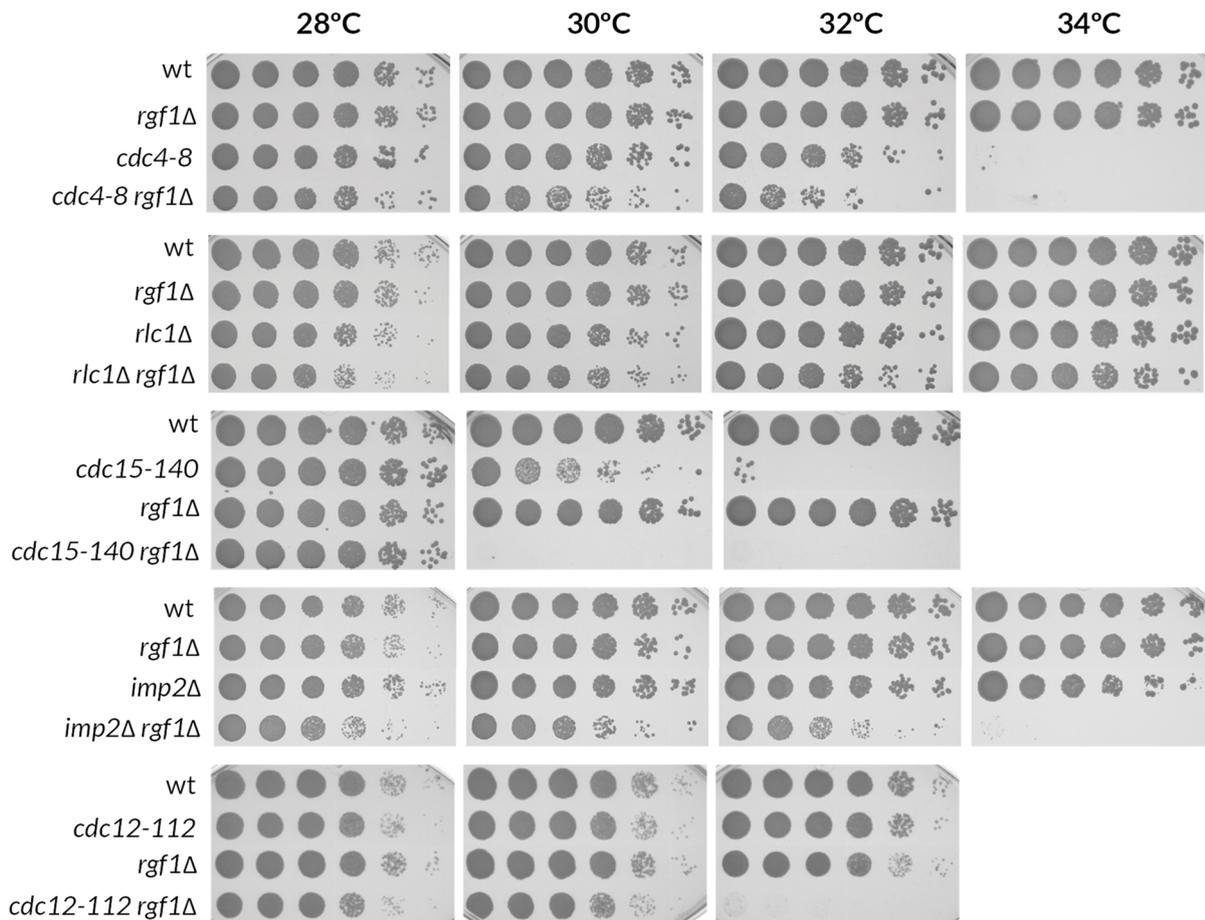


Figura 31 *Rgf1* presenta interacciones genéticas con componentes del CAR. Ensayos de viabilidad con diluciones seriadas 1:5 de las cepas indicadas crecidas a 25°C. En todos los casos la D.O inicial fue de 2.0.

Tras ver que localización de **Rgf1** depende del CAR, examinamos el carácter de esta asociación utilizando el mutante de la β -tubulina **nda3-KM311**. Este mutante es “sensible al frío” y presenta defectos en la formación del huso mitótico cuando se mantiene a 18°C; las células se bloquean en prometafase por su incapacidad de continuar la mitosis en ausencia de esta estructura (Hiraoka *et al.* 1984).

Al analizar la localización de **Rgf1-GFP** en las células bloqueadas (**Figura 32**), vimos que se acumulaba en la región media en un ~50% de las células del cultivo, formando una especie de corsé.

Esta localización va acompañada de una leve o nula señal de invaginación del BP, indicando una parada en el mismo comienzo de la septación o previa a este, respectivamente. Este resultado confirma que **Rgf1** se localiza en la zona del CAR antes del inicio de la septación.

En algunas células **nda3-KM311** bloqueadas también se ve señal de **Rgf1-GFP** en uno de los polos a la vez que en la zona del CAR (**Figura 32**). Es posible que éstas sean células que intentan iniciar el crecimiento polarizado tras el prolongado bloqueo mitótico. Esto concuerda con la presencia de **Rgf1** en los polos de los mutantes con defectos en la formación del CAR (**Figura 30**). A la temperatura restrictiva, estas células post-mitóticas que no septan, reanudan el crecimiento y relocalizan a **Rgf1** en los polos.

También nos llamó la atención el patrón que presenta la señal de **Rgf1-GFP** durante el bloqueo mitótico. En este caso la señal no se mantiene como una estructura anular definida (**Figura 32**). Esto podría ser debido a la asociación de **Rgf1** a la membrana más que al propio anillo, difundiéndose sobre la misma cuando la citoquinesis está bloqueada. Esta localización de **Rgf1** en forma de corsé recuerda a la localización

nda3-KM311 18°C

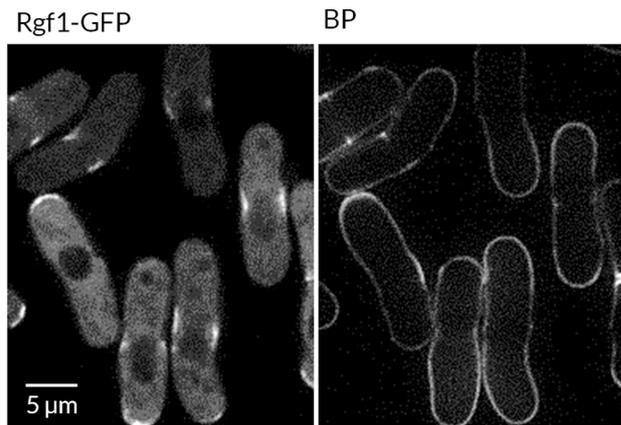


Figura 32 Rgf1 está presente en la región media durante un bloqueo mitótico en prometafase. Las células del mutante **nda3-KM311** que expresan **Rgf1-GFP** se crecieron a 32°C y después se incubaron 8h a 18°C para inducir el bloqueo. Justo antes de tomar las imágenes de fluorescencia se añadió BP.

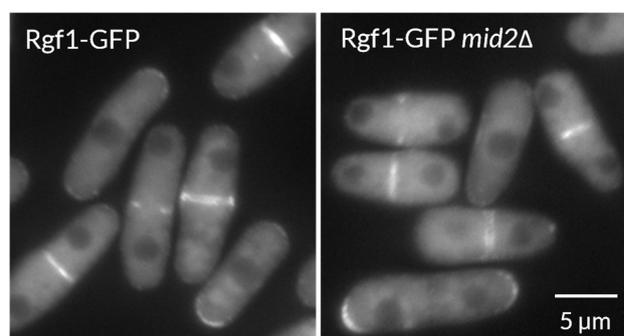


Figura 33 La ausencia de la anilina Mid2 no afecta a la localización de Rgf1. Imágenes de fluorescencia de **Rgf1-GFP** en cepas wt y **mid2Δ** tomadas en el DeltaVision.

de las septinas durante la formación del CAR (Zheng *et al.* 2018). Sin embargo, no hemos visto diferencias en la localización de *Rgf1* en un mutante nulo de *Mid2*, la anillina que organiza el anillo de septinas y que presenta un fenotipo casi idéntico al de la eliminación de estas (Berlin *et al.* 2003; Tasto *et al.* 2003) (Figura 33).

EL BLANKOPHOR PRODUCE UN RETRASO DE LA CITOQUINESIS AUSENTE EN PARTE EN EL MUTANTE *RGF1Δ*

El siguiente paso en el estudio de la implicación de *Rgf1* en citoquinesis pasó por observar cómo transcurría este proceso en el mutante nulo *rgf1Δ*. Realizamos el seguimiento de todo el proceso citoquinético por microscopía de time-lapse en las cepas silvestre y *rgf1Δ*. En este caso utilizamos cepas que expresan de manera endógena la tubulina *Atb2* marcada en verde con GFP, lo que permite detectar fácilmente la formación del huso como un punto brillante tras la desaparición de los microtúbulos interfásicos (Wu *et al.* 2003). Empleamos de nuevo la cadena ligera de la miosina de tipo II, *Rlc1-tdTomato*, para seguir la dinámica del CAR y la tinción de BP como marcador del septo.

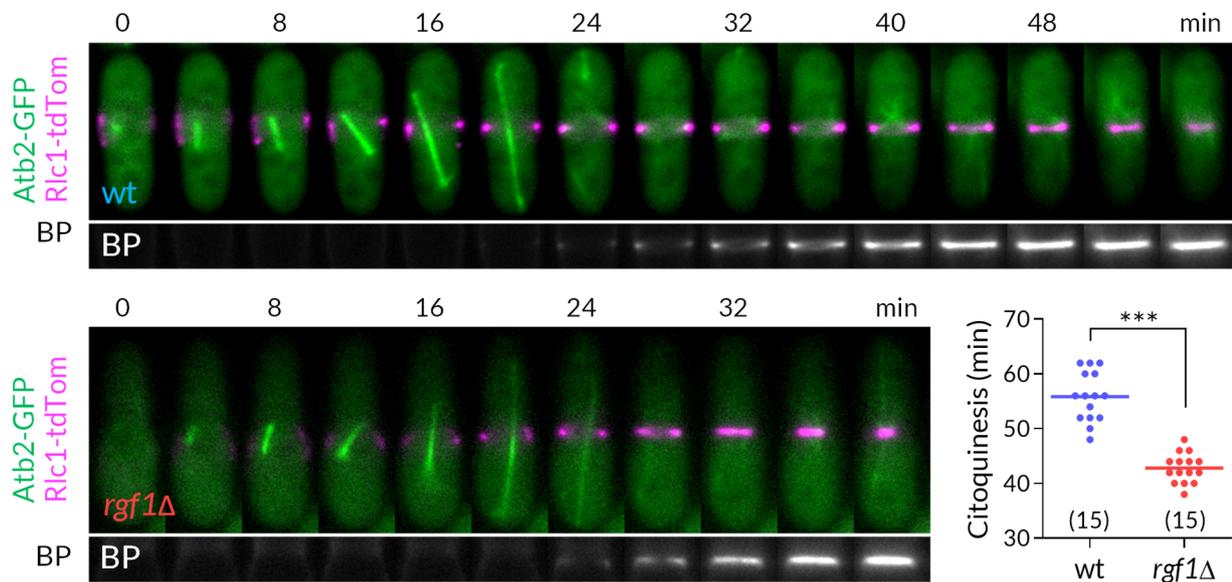


Figura 34 Las células *rgf1Δ* completan la citoquinesis más rápido que la cepa silvestre. Imágenes de time-lapse en DeltaVision de células wt y *rgf1Δ* marcadas con *Rlc1-tdTomato*, *Atb2-GFP* y teñidas con BP. Fotografías tomadas cada 2 minutos (se muestran cada 4). Derecha, tiempos de citoquinesis de ambas cepas medidos desde la aparición del spindle hasta el cierre del CAR, analizados con el test t de Student (***) $p < 0.0001$, (n)).

Al alinear temporalmente los time-lapses de ambas cepas (con inicio de la formación del spindle como tiempo 0) vimos que las células del mutante *rgf1Δ* completaban el cierre del anillo antes que la cepa silvestre (Figura 34). Este fue un resultado sorprendente pues parecía indicar que la ausencia de *Rgf1* aceleraba la citoquinesis, algo inusual ya que generalmente las mutaciones que afectan a la velocidad de este proceso tienden a retrasarlo o impedirlo, no hacer que vaya más rápido (Wu *et al.* 2003). Nuestros datos parecían revelar una función de *Rgf1* como freno de la citoquinesis.

Quisimos confirmar este resultado variando las proteínas empleadas como marcadores del CAR y del ciclo mitótico para ver si el fenotipo era robusto. Cambiamos el reportero de ciclo de *Atb2* a *Sid4-GFP*, componente de reclutamiento de la ruta SIN (Chang & Gould 2000) y el marcador del anillo a *Imp2-GFP*, proteína con dominio F-BAR de carácter estructural que es reclutada durante maduración (Roberts-Galbraith *et al.* 2009, 2010; Ren *et al.* 2015). Con las nuevas cepas volvimos a ver el mismo resultado en el que *rgf1Δ* presentaba una citoquinesis más corta que la de la cepa silvestre (Figura 35A). Sin embargo, al repetir el experimento encontramos unas condiciones en las que el fenotipo desaparecía y los tiempos se igualaban.

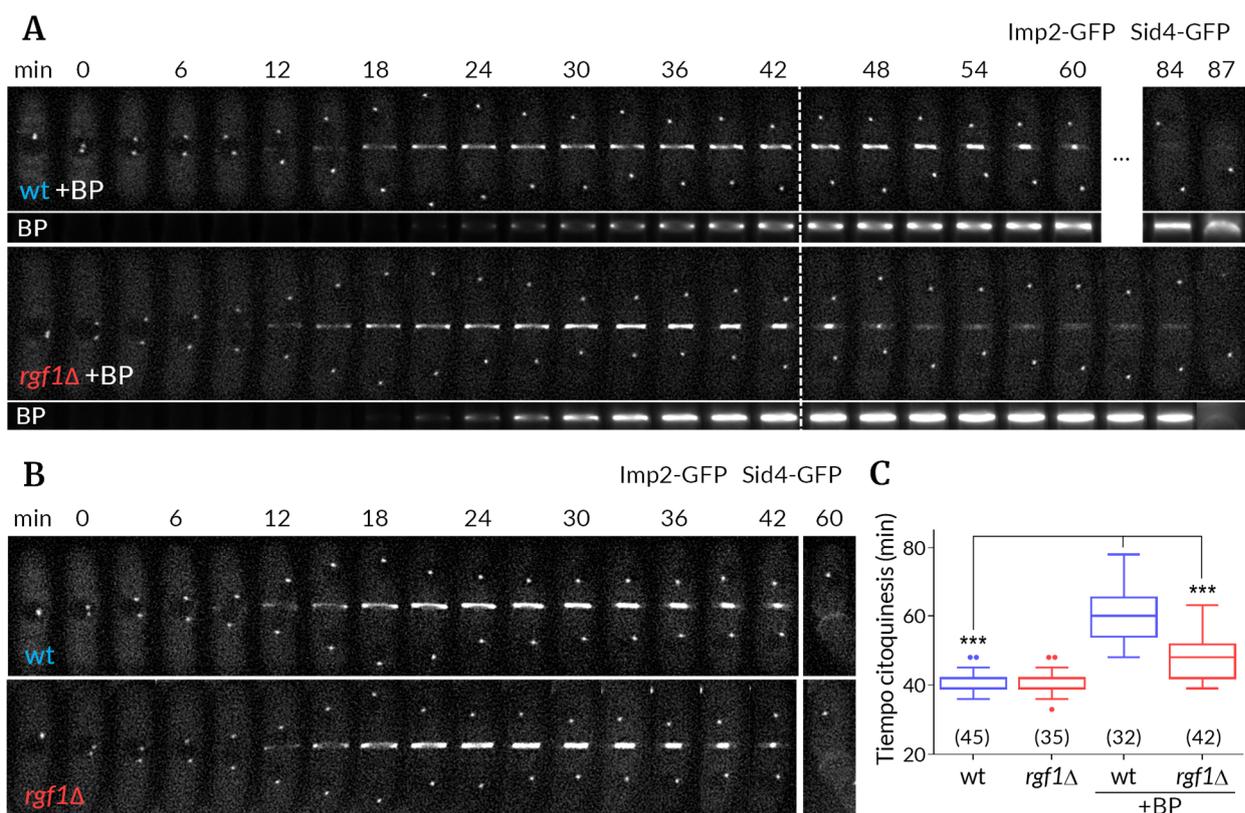


Figura 35 El blankophor produce un retraso de la citoquinesis, que es menor en la cepa *rgf1Δ*. Imágenes de time-lapse en DeltaVision de células marcadas con *Imp2-GFP* y *Sid4-GFP*, en presencia (A) o ausencia (B) de BP 5 μ g/ml. Fotografías tomadas cada 3 minutos (en (A) se omiten las fotos tomadas del minuto 63 a 81 para mostrar la separación celular al final). (C) Tiempos de citoquinesis de las cepas wt y *rgf1Δ* en presencia y ausencia de BP, contados desde la separación de los SPBs hasta el cierre del anillo y analizados con test de Šidák (***) $p < 0.0001$, (n).

En los primeros experimentos, con el afán de recoger la mayor información posible, además de los marcadores de ciclo y anillo utilizamos el marcaje del septo con BP. Examinando las condiciones experimentales nos dimos cuenta de que en alguna de las réplicas habíamos prescindido de la tinción de BP, y fue entonces cuando vimos que en ausencia de este compuesto los tiempos de la cepa silvestre y mutante se igualaban (Figura 35B).

Nuestra primera interpretación de una citoquinesis acelerada en el mutante *rgf1Δ* resultó equivocada. En condiciones normales (ausencia de BP) no había diferencia en el tiempo de citoquinesis entre el mutante *rgf1Δ* y la cepa silvestre, considerado éste desde el momento en el que se separan los SPBs hasta que el anillo se contrae completamente y se ve como un punto. Con la adición del BP el tiempo de citoquinesis de la cepa silvestre se extiende, y es entonces cuando vemos la diferencia con respecto al mutante *rgf1Δ* (Figura 35A). Es la presencia de BP lo que produce un retraso en la cepa silvestre, que es mucho menor en el mutante *rgf1Δ*.

Obtuvimos el mismo resultado de retraso por BP al repetir los experimentos con diferentes combinaciones de marcadores del anillo como las miosinas *Myo2* y *Myp2* (East & Mulvihill 2011), o los ya mencionados *Rlc1* e *Imp2* y con marcadores de ciclo como *Sfi1* (Rüthnick & Schiebel 2016), *Sid4*, *Sad1* y *Atb2* (Figura 36).

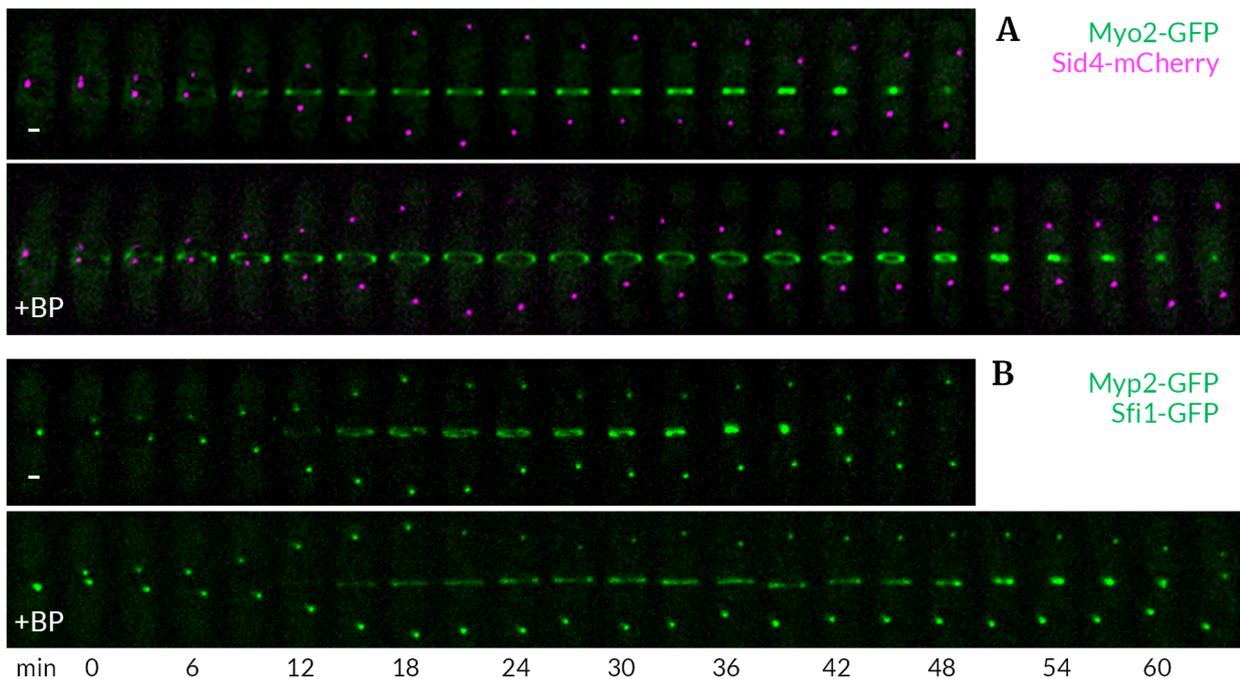


Figura 36 El retraso en citoquinesis causado por el blankophor es robusto frente a la variación de marcadores fluorescentes. Imágenes de time-lapse de células de tipo silvestre en presencia o ausencia de BP 5µg/ml, (A) las células expresan Myo2-GFP, Sid4-mCherry y fueron capturadas en DeltaVision, o (B) las células expresan Myp2-GFP, Sfi1-GFP y fueron capturadas en Spinning Disk.

En estas últimas réplicas (Figura 36) dejamos de capturar el canal de fluorescencia del BP, cuya excitación está en el rango de luz UV, con lo que descartamos que el efecto sea por la iluminación o excitación del compuesto.

Bajo esta nueva perspectiva en la que es el BP quien produce un retraso en citoquinesis decidimos evaluar el alcance de este efecto. Realizamos los mismos experimentos de time-lapse para medir el tiempo de citoquinesis en la cepa silvestre utilizando concentraciones crecientes de BP. Los resultados se muestran en la Figura 37A, donde se observa que cuanto mayor es la concentración de BP más se incrementa el tiempo total de citoquinesis. Por lo tanto, el efecto de este compuesto sobre la célula es directamente dependiente de la dosis.

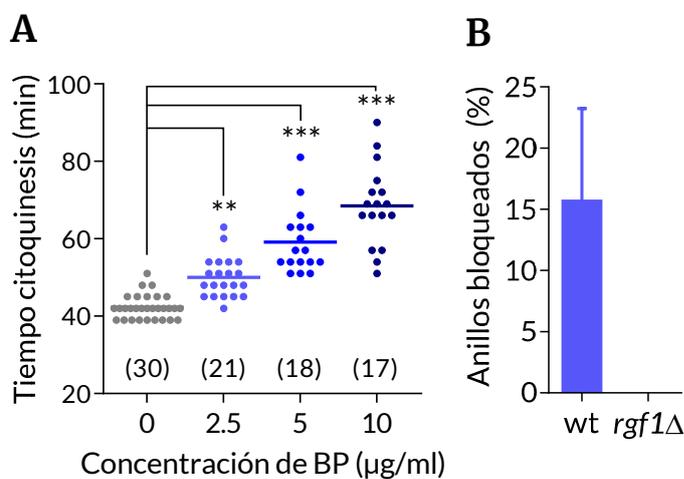


Figura 37 El BP alarga la citoquinesis de forma dependiente de la dosis y bloquea la constricción de algunos anillos. (A) Relación dosis-respuesta en el tiempo de citoquinesis de células wt frente a concentraciones crecientes de BP. Analizados con test de Šidák (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, (n)). (B) Fracción de células wt y *rgf1Δ* con anillos que no inician la constricción en presencia de BP 5 µg/ml (Media \pm SD, n: 3 réplicas con > 20 células/réplica). Datos cuantificados a partir de time-lapses de Imp2-GFP, Sid4-GFP en DeltaVision.

Además del alargamiento de la citoquinesis encontramos otro efecto que producía el BP y que definimos como bloqueo. Una fracción de las células, tanto mayor cuanto más incrementábamos la dosis de BP, formaban un anillo que permanecía con un diámetro constante, es decir sin constricción, en el tiempo que duraba el experimento. Definimos como anillos bloqueados aquellos en los que, dentro de las 2 horas que dura el experimento, no vemos su constricción y que permanecen sin cambios durante al menos 45 minutos, el tiempo que dura la citoquinesis completa en condiciones normales. La cuantificación de los anillos bloqueados en la cepa silvestre y en el mutante *rgf1Δ* en presencia de BP (5 µg/ml) se muestran en la Figura 37B.

En el 15% de las células de la cepa silvestre que tienen anillo éste se encuentra bloqueado. Sin embargo, este efecto de anillos bloqueados está ausente en la cepa *rgf1Δ* tratada en las mismas condiciones. Este dato indica de nuevo que la presencia de Rgf1 es necesaria para prolongar la citoquinesis en condiciones de estrés sobre la pared celular.

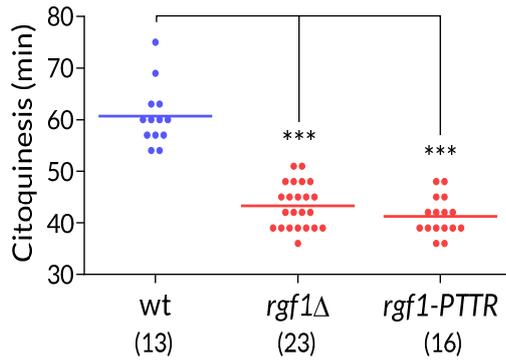


Figura 38 La actividad GEF de Rgf1 condiciona el retraso citoquinético del BP. Tiempos de compleción de la citoquinesis de cepas wt, *rgf1*Δ y *rgf1-PTTR* en presencia de BP 5 μg/ml. Analizados con test de Šidák (** p<0.001, *** p<0.0001, (n)). Datos cuantificados a partir de time-lapses de Imp2-GFP, Sid4-GFP en DeltaVision.

Nos preguntamos también si el retraso producido por el BP depende de la actividad catalítica o actividad GEF de Rgf1 hacia Rho1. Para ello utilizamos el mutante *rgf1-PTTR*, el cual lleva una deleción de cuatro aminoácidos en el dominio Rho-GEF (García *et al.* 2006a) que reduce su actividad intercambiadora de nucleótido o activadora de Rho1 (García *et al.* 2009b). En presencia de BP, la cepa *rgf1-PTTR* se comporta como el mutante nulo *rgf1*Δ, con tiempos de citoquinesis alejados del retraso que se ve en la cepa silvestre (Figura 38). En resumen, la actividad GEF de Rgf1 es crítica para que se produzca el retraso por BP.

Antes de continuar con los siguientes resultados es necesario señalar que los experimentos subsiguientes en los que utilizamos BP, este se añadió a una concentración final de 5 μg/ml, salvo que se indique explícitamente otra concentración. Usamos esta concentración porque, examinados los resultados, vimos que era suficiente para producir un retraso apreciable y una diferencia entre las cepas silvestre y mutante. No utilizamos una concentración mayor para no incrementar el porcentaje de células con anillos bloqueados, en las que no podemos medir el tiempo de citoquinesis, ni extender el efecto del retraso, lo que nos obligaría a incrementar el tiempo de captura de los time-lapses para recoger los datos de un buen número de células en cada experimento.

De esta forma, un tiempo de captura total de 2 horas junto a la selección previa de los campos de la preparación más adecuados (aquellos con un buen número de células cercanas a entrar en mitosis, es decir, las que tienen una longitud cercana al máximo y solo un SPB) nos permite medir la citoquinesis de entre 15 y 30 células por experimento. Contamos solo aquellas células en las que vemos la duplicación del SPB y el cierre del anillo dentro del mismo experimento, y definimos el tiempo que tardan las células en completar la citoquinesis como la diferencia entre estos dos valores.

EL INICIO DE LA SEPTACIÓN Y DE LA CONSTRICCIÓN DEL CAR ESTÁN DESACOPLADOS EN PRESENCIA DE BLANKOPHOR

Hasta ahora hemos visto un retraso en la citoquinesis en presencia de BP teniendo en cuenta el tiempo de contracción del anillo de actomiosina. En *S. pombe* la constricción del CAR lleva acoplada la invaginación de la membrana plasmática y la síntesis del septo (Roncero & Sánchez 2010; Cortés *et al.* 2016b), por lo que decidimos estudiar el comportamiento de estos otros dos componentes durante el retraso por BP.

Visualizamos la membrana plasmática empleando el marcador de unión a fosfatidilserina **LactC2-GFP** (Yeung *et al.* 2008; Haupt & Minc 2017). En la cepa silvestre en condiciones normales, la invaginación de la membrana plasmática se puede observar como un incremento en la fluorescencia de este marcador en la región media de la célula, desde la periferia hacia el interior, que se produce tras la ruptura del huso mitótico (*spindle breakdown*), esto es de acuerdo con nuestros marcadores, el momento en el que la distancia que separa a los SPBs se acorta tras haber llegado al máximo (**Figura 39**).

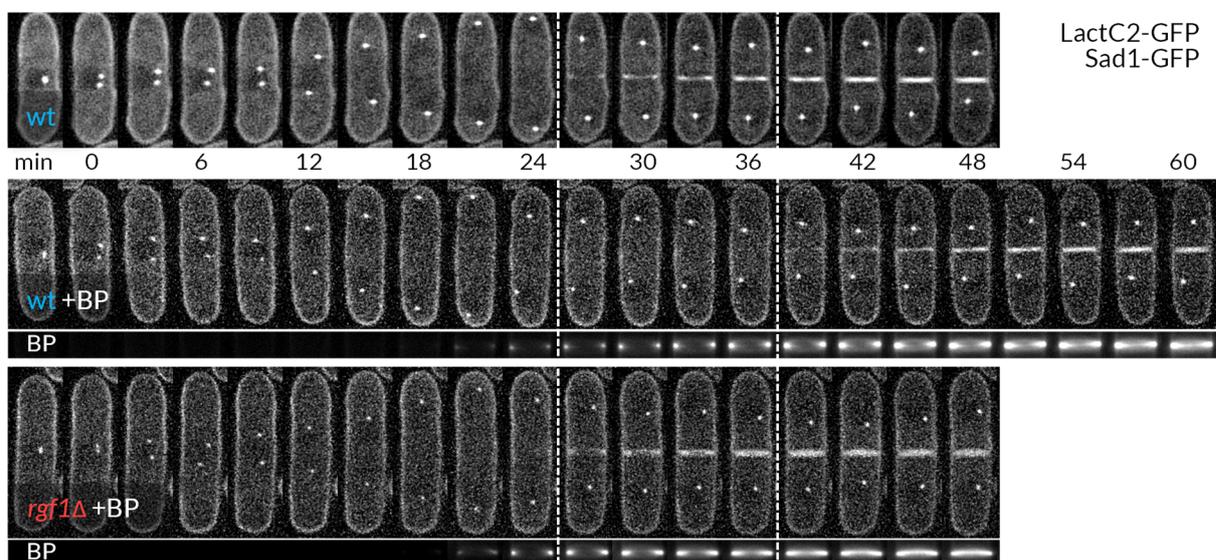


Figura 39 La invaginación de la membrana plasmática se ve retrasada por la presencia de blankophor. Imágenes de time-lapse en DeltaVision de células de tipo silvestre y *rgf1Δ* que expresan LactC2-GFP y Sad1-GFP, en presencia o ausencia de BP 5μg/ml. Las líneas discontinuas señalan el inicio de la invaginación de la membrana plasmática en condiciones normales (primera línea) y con la adición de BP (segunda).

Estos tiempos concuerdan con el momento de inicio de la constricción publicado por otros autores (Laplante *et al.* 2015; Dey & Pollard 2018; Zheng *et al.* 2018), sin embargo recientemente se ha descrito que la constricción del anillo ocurriría minutos antes del *spindle breakdown* (Cortés *et al.* 2018; Okada *et al.* 2019). Con la adición del BP la invaginación de la membrana se distancia temporalmente del *spindle breakdown*, comenzando hasta 15 minutos después (Figura 39). La ausencia de *Rgf1* revierte este efecto, por lo que el retraso es mucho menor en el mutante *rgf1Δ*. Estos resultados sugieren que el retraso inducido por el BP, al que *rgf1Δ* es menos sensible, se circunscribe a los procesos previos a la invaginación de la membrana.

Para visualizar la formación del septo se realizó una tinción con el marcador fluorescente blankophor (BP). De este modo, el BP (5 μg/ml) nos sirve a la vez como agente causante del retraso y marcador de la formación del septo. Tanto en la cepa silvestre como en el mutante *rgf1Δ* el avance de la señal de BP, y por tanto de la síntesis del septo, va parejo a la constricción del anillo, y es el diámetro del anillo quien marca el límite interior del tamaño del septo en cada momento (Figura 40). Este proceso es más rápido (entre 10 y 15 min) en el mutante *rgf1Δ*, que como hemos visto en resultados previos termina la citoquinesis antes que la cepa silvestre en presencia de BP. Al finalizar la contracción en ambas cepas aparece un septo de fluorescencia uniforme. Este septo se mantiene durante un tiempo similar en ambas cepas, que abarca desde el fin de la constricción del anillo hasta que las células se separan.

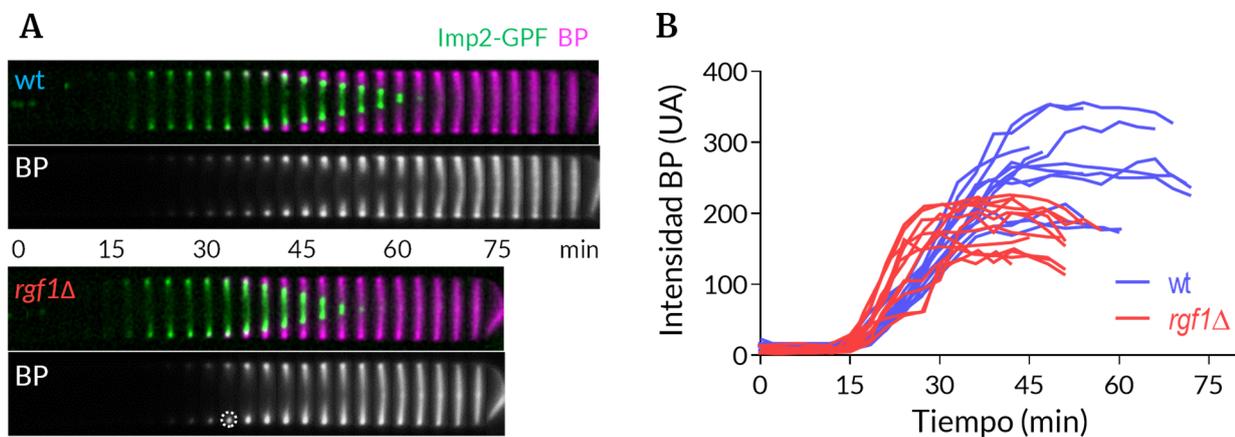


Figura 40 La síntesis del septo en presencia de BP comienza al mismo tiempo en las cepas wt y *rgf1Δ*, y no se detiene durante el bloqueo citoquinético. (A) Representación quimográfica de la progresión del anillo y septo, obtenidos a partir de time-lapses en DeltaVision de células wt y *rgf1Δ* que expresan Imp2-GFP, Sid4-GFP en presencia de BP 5 μg/ml. El tiempo 0 es la separación de los SPBs (no apreciable en la figura); el círculo discontinuo señala la región empleada para las medidas de intensidad (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del BP en la región periférica del septo de las células de (A) a lo largo del tiempo. Cada línea es la medida del septo de una célula (n: 12 células).

También hemos cuantificado la progresión inicial del septo en las células de tipo silvestre retrasadas por BP y en las *rgf1Δ*. Par ello medimos la intensidad de la señal de BP en la periferia celular (**Figura 40A**, círculo) a lo largo de la citoquinesis, tomando como tiempo 0 la separación de los SPBs.

En ambas cepas el incremento de la señal, es decir el inicio de la síntesis del septo, se da al mismo tiempo (~ en 18 minutos) (**Figura 40B**). Esta intensidad crece de forma lineal hasta llegar a un máximo que se mantiene como una meseta (siempre contando sólo la intensidad en la periferia, donde comienza la síntesis; mientras tanto el septo continúa su progresión hacia el interior). La cepa *rgf1Δ*, que apenas se para, alcanza este máximo antes que la cepa silvestre, y es además de una intensidad inferior. En la cepa silvestre esta señal continúa creciendo, aun con la constricción parada, lo que indica que durante el bloqueo la síntesis del septo no se detiene, sólo lo hace su ingresión (incursión hacia el interior), que va ligada a la invaginación del surco citoquinético. Finalmente, la existencia de una meseta de señal máxima de BP valida la metodología, pues indica que el colorante deja de incorporarse a la periferia aproximadamente tras comenzar la ingresión citoquinética (**Figura 40**).

En conjunto estos resultados indican que el BP es capaz de retrasar el inicio de la invaginación de la membrana, pero no el comienzo de la síntesis del septo. Se produce por tanto un desacoplamiento entre estos dos aspectos de la citoquinesis, que en condiciones normales se suceden sin retraso, y que la pérdida de *Rgf1* revierte parcialmente. Los datos sugieren también que el origen del bloqueo por BP no es la parada de la síntesis del septo, lo que señala a la actividad del anillo como hipotético responsable. Adicionalmente, la incorporación continuada de BP durante el bloqueo resulta paradójica: el BP origina un bloqueo citoquinético, y cuanto más prolongado es este bloqueo más BP se incorpora al septo. Parecería que la parada es contraproducente; sin embargo, como veremos más adelante, la ausencia de bloqueo resulta en fenotipos de multiseptación.

EL BLANKOPHOR RETRASA ESPECÍFICAMENTE EL INICIO DE LA CONSTRICCIÓN DEL CAR

El retraso observado en el inicio de la invaginación de la membrana plasmática nos ayuda a situar el bloqueo producido por el BP en los eventos previos a este. No podemos estudiar los pasos previos a la invaginación mirando la membrana plasmática, ya que no detectamos ningún cambio por fluorescencia. Sin embargo, la invaginación de la membrana va asociada a la constricción del anillo en telofase, y este sí que lo podemos estudiar. En concreto analizamos el

tiempo que dura cada una de las tres fases por las que pasa el anillo de actomiosina en citoquinesis.

La primera de estas tres etapas es la de formación. En esta etapa un conjunto de proteínas tempranas se distribuye como nodos dispersos en la membrana plasmática próxima a la posición del núcleo y determina la posición del anillo (Moseley *et al.* 2009; Akamatsu *et al.* 2014). Estos nodos se van aglutinando hasta formar una estructura anular discreta. La formación se define como el tiempo desde que aparecen los nodos hasta que se ensamblan formando un anillo de fluorescencia uniforme. En la etapa de maduración, el anillo sufre la remodelación de algunos de sus componentes, pero no cambia de tamaño (Pelham & Chang 2002; Roberts-Galbraith *et al.* 2009). En los experimentos de time-lapse medimos indirectamente la etapa de maduración como el intervalo de tiempo desde que aparece el anillo uniforme hasta que se inicia la constricción. La constricción se mide por la disminución del diámetro del anillo fluorescente con el tiempo hasta que se cierra y aparece como un punto (Rincon & Paoletti 2016).

A continuación, medimos las tres etapas en la cepa silvestre en ausencia y en presencia de BP. También medimos la formación, maduración y constricción en la cepa *rgf1Δ* en las mismas condiciones para ver si la ausencia de retraso estaba asociada a las mismas etapas. En esta ocasión utilizamos *Myo2-EGFP* para visualizar el anillo. *Myo2-EGFP* es una de las proteínas tempranas que aparece en nodos y se mantiene en el anillo hasta el final de citoquinesis, a diferencia de *Imp2* que aparece en la etapa de maduración (Laplante *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015) (Figura 41).

En la cepa silvestre la fase de formación no se ve alterada significativamente por la adición del BP, siendo el tiempo de formación en condiciones normales de 21.1 ± 2.1 min (media \pm SD), y de 18.6 ± 2.9 min en presencia de BP. Los tiempos de formación en la cepa mutante *rgf1Δ* tampoco difieren de los de la cepa silvestre en ninguna de las dos condiciones. Estos resultados indican que el tratamiento con BP no causa alteraciones en el tiempo de formación del anillo, y sugieren que *Rgf1* no contribuye a la formación del anillo, lo que está de acuerdo con su aparición en la fase de maduración, cuando el anillo ya está ensamblado (ver Figura 27).

Sí observamos diferencias en fase de maduración en el tratamiento con BP. En la cepa silvestre el tiempo de maduración del anillo prácticamente se duplica al añadir la droga, pasando de 10 ± 2.8 min en condiciones normales a 22.1 ± 4.0 min bajo la acción del BP. La cepa *rgf1Δ* es mucho menos susceptible a este retraso; en este caso el tiempo de maduración pasa de 8.8 ± 2.5 min en condiciones normales (sin BP) a 11.4 ± 2.4 min con BP. Tampoco hemos visto diferencias en la fase de constricción, lo que indica que el retraso en el tiempo de citoquinesis producido por el BP se manifiesta exclusivamente en la fase de maduración.

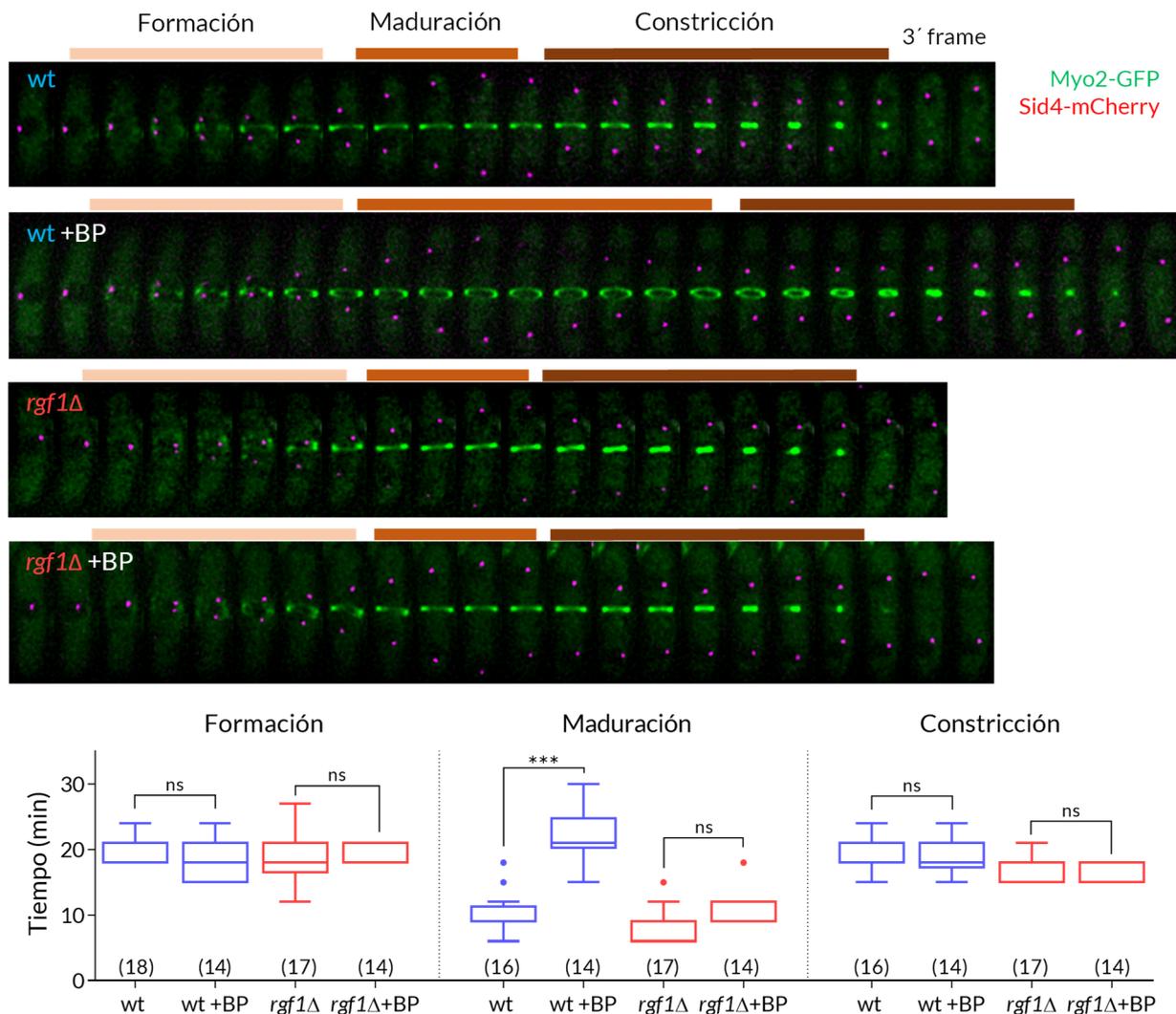


Figura 41 El BP alarga la fase de maduración del CAR sin afectar a su formación y constricción. Imágenes de time-lapse de células de tipo silvestre y *rgf1Δ* que expresan Myo2-GFP y Sid4-mCherry, en presencia o ausencia de BP 5μg/ml. Las barras de color señalan las tres etapas por las que pasa el anillo: formación, maduración y constricción. Las cuantificaciones se muestran en los box-plots de los paneles inferiores. Datos analizados con test de Šidák (ns no significativo, *** p<0.0001, (n))

Otra forma de cuantificar las diferencias en la progresión del CAR entre cepas y condiciones consiste en medir la reducción del diámetro del anillo durante la citoquinesis. Estos datos nos permiten calcular la velocidad de la contracción y sirven para complementar y reforzar los resultados anteriores. Sabemos que el retraso no se da en la fase de formación, por lo que volvimos a utilizar las cepas con los marcadores **Imp2-GFP** y **Sid4-GFP**. Esta combinación resulta particularmente adecuada porque no hay solapamiento entre ambas señales, tal y como se explica a continuación.

Cuando los SPBs se están separando los componentes del anillo están en forma de nodos (ver **Figura 41**). Ambas estructuras se localizan en este momento en la zona media de la célula,

los nodos en la MP y los SPBs en la envuelta nuclear, lo que hace que se confundan fácilmente sus señales de fluorescencia, especialmente bajo condiciones de microscopía pobres (pocos planos en Z o ausencia de confocalidad), o al visualizarlas como proyección en un único plano. Para evitar esta confusión se recurre a marcar estas estructuras con reporteros de fluorescencias distintas, separando así el solapamiento con el uso de dos canales. La adición de un segundo canal incrementa la presión por fotodaño al tener que iluminar las células con dos líneas de excitación en lugar de una (Magidson & Khodjakov 2013). Al ser **Imp2** una proteína tardía que no aparece en nodos, cuando los SPBs comienzan a separarse no hay señal de **Imp2** y por tanto no hay solapamiento. Cuando **Imp2** aparece en el anillo los SPBs ya están lo suficientemente alejados de esta región para que no interfieran. De este modo podemos visualizar ambas estructuras con la iluminación de un único canal de fluorescencia.

Medimos el diámetro del anillo de **Imp2-GFP** en cada tiempo del time-lapse usando la separación de los SPBs como referencia de tiempo 0. Los primeros minutos no se pueden contabilizar debido a que **Imp2** aparece en la fase madurativa. Tanto en ausencia como en presencia de BP, **Imp2** llega al anillo alrededor del minuto 18 en la cepas silvestre y mutante *rgf1Δ* (Figura 42). Esto indica que el BP no afecta el reclutamiento de **Imp2** al anillo y que **Rgf1** tampoco está involucrado en este proceso.

Con la aparición de **Imp2** medimos el diámetro máximo o inicial del anillo. Utilizamos la media de los diámetros en los dos primeros tiempos para dar cuenta de la inexactitud de la medida, especialmente la del primer instante en que aparece **Imp2** con baja intensidad de fluorescencia. Aunque el diámetro inicial es similar en ambas cepas, siempre observamos una ligera merma en el mutante *rgf1Δ* (wt: 3.56 μm, *rgf1Δ*: 3.32 μm). Esto podría explicar la pequeña diferencia en los tiempos de constricción que veíamos al medir las fases con **Myo2** (Figura 41).

En condiciones normales, tras la llegada de **Imp2** el anillo permanece en su diámetro máximo durante unos minutos hasta que se inicia la constricción, marcada por un cambio brusco en la tendencia de las medidas de diámetros. La constricción comienza a un ritmo lento y en unos minutos alcanza la velocidad máxima; podemos ver la aceleración en el codo que forman las curvas, incluso con la resolución temporal de tres minutos. El anillo continúa su constricción a una velocidad constante hasta que se cierra como un punto discreto.

La adición de BP incrementa el tiempo en el que los anillos se mantienen con su diámetro máximo (Figura 42). Esto coincide con el aumento del tiempo de maduración (Figura 41), ya que no deja de ser un alargamiento del periodo en el que vemos anillos formados que todavía no han comenzado a contraer.

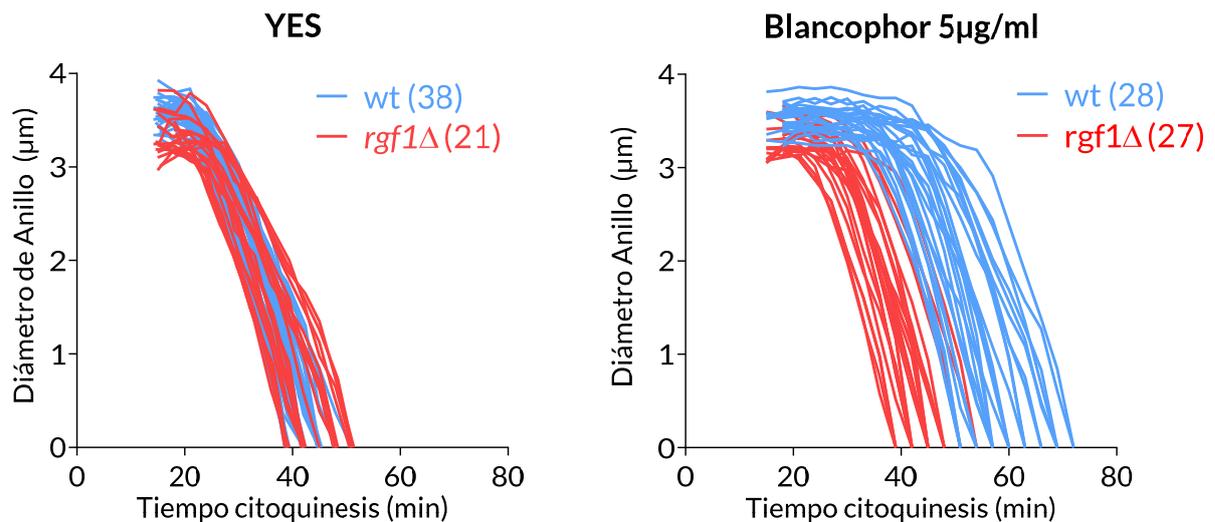


Figura 42 El BP retrasa el inicio de la constricción del CAR. Dinámicas de contracción de los anillos de cepas silvestre y *rgf1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP, en presencia y ausencia de BP 5 µg/ml. Cada línea es un anillo al que medimos su diámetro en cada tiempo a partir de time-lapses capturados en DeltaVision.

En condiciones normales, en la cepa silvestre el anillo comienza a contraerse en el minuto 21 ± 2 tras la separación de los SBPs, la adición de BP retrasa este evento hasta el minuto 38 ± 5 . Una vez iniciada, la constricción progresa a una velocidad similar en ambas condiciones, ~ 150 nm/min, lo que indica que el BP no interfiere en el proceso de constricción del anillo. Este retraso en el inicio de la constricción en presencia de BP se suprime en gran medida en la cepa con la delección de *rgf1*⁺; mientras que en la cepa silvestre veíamos una diferencia de 17 minutos, en el mutante *rgf1Δ* este retraso se reduce a 6 minutos (Tabla 1). Como ocurría en la cepa silvestre la adición de BP no altera la velocidad de la constricción en el mutante *rgf1Δ*. Estos resultados sugieren que *Rgf1* podría ser parte de un mecanismo que retrasa la constricción del anillo frente agresiones externas causadas por antifúngicos.

Constricción	wt -	wt +BP	<i>rgf1Δ</i> -	<i>rgf1Δ</i> +BP
Inicio (min)	21 ± 2	38 ± 5	19 ± 3	25 ± 4
Velocidad (nm/min)	154 ± 21	158 ± 31	148 ± 25	175 ± 30

Tabla 1 Momento de inicio y velocidad de constricción del CAR en cepas wt y *rgf1Δ* en presencia y ausencia de blankophor 5 µg/ml. El minuto de inicio de la constricción toma como referencia 0 la duplicación de los SPBs. La velocidad está medida como el cambio del diámetro del CAR en función del tiempo, en el tramo lineal de la curva.

LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR ES NECESARIA PARA RETRASAR LA CONSTRICCIÓN DEL CAR EN RESPUESTA A BLANKOPHOR.

Pensamos que *Rgf1* podría actuar como parte de una vía de respuesta al estrés por BP produciendo un retraso en citoquinesis. *Rgf1* es el principal activador de la GTPasa *Rho1*, y ya hemos visto que el bloqueo inducido por el BP depende de la actividad catalítica de *Rgf1* sobre *Rho1* (ver Figura 38). De acuerdo con esta interpretación el retraso en citoquinesis debería ser dependiente también de la propia GTPasa *Rho1*, por lo que en un mutante de *Rho1* esperaríamos encontrar un fenotipo de “no retraso” frente al BP similar al que observamos en los mutantes *rgf1Δ* y *rgf1-PTTR*.

Rho1 es una proteína esencial, por lo que empleamos el mutante termosensible e hipomorfo *rho1-596* (Viana *et al.* 2013). La inactivación parcial de *Rho1* se realizó a la temperatura restrictiva de 36°C. Partimos de células de la cepa silvestre y del mutante *rho1-596* crecidas a 25°C hasta alcanzar la fase logarítmica. En el momento de realizar el experimento pasamos los cultivos a 36°C durante 1h, posteriormente añadimos el BP al medio y realizamos el time-lapse también a 36°C.

Igual que sucedía con los mutantes de *Rgf1*, el retraso en citoquinesis en presencia de BP es menor en la cepa *rho1-596* que en la cepa silvestre (Figura 43). En este caso hay que tener en cuenta que a 36°C el proceso citoquinético se acelera, dando por tanto tiempos menores en todas las situaciones con respecto a las medidas realizadas a 28°C. Este resultado confirma que el

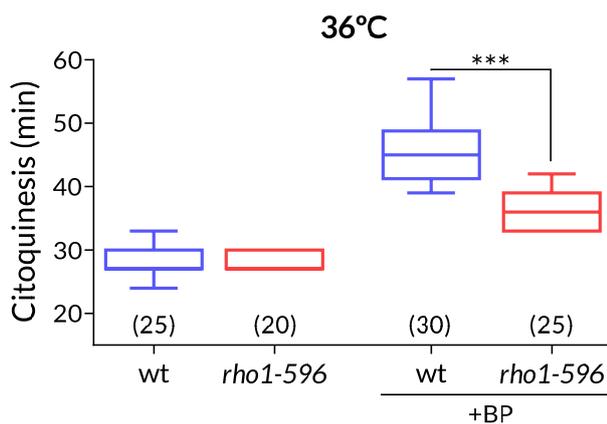


Figura 43 El retraso citoquinético causado por BP depende de la actividad de *Rho1*. Tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en cepas wt y *rho1-596* que expresan *Imp2-GFP* y *Sid4-GFP*, en presencia y ausencia de BP 5μg/ml. Antes de realizar el time-lapse en el DeltaVision las células se incubaron 1h a 36°C. Los datos se analizaron con el test t de Student (***) $p < 0.0001$, (n).

retraso producido por el BP depende de la actividad GEF de *Rgf1* sobre *Rho1*, y por tanto de la activación de *Rho1*.

¿Qué puede estar controlando *Rho1* para producir el retraso en citoquinesis? *Rho1* participa como regulador de diferentes procesos dentro de la célula: biosíntesis de la pared celular, organización del citoesqueleto de actina, crecimiento polarizado y el mantenimiento de la integridad celular entre otros (Arellano *et al.* 1996, 1997; García *et al.* 2009b). Su papel como activador de la síntesis de pared celular no parece ser el responsable, puesto que el inicio de la síntesis del septo ocurre por

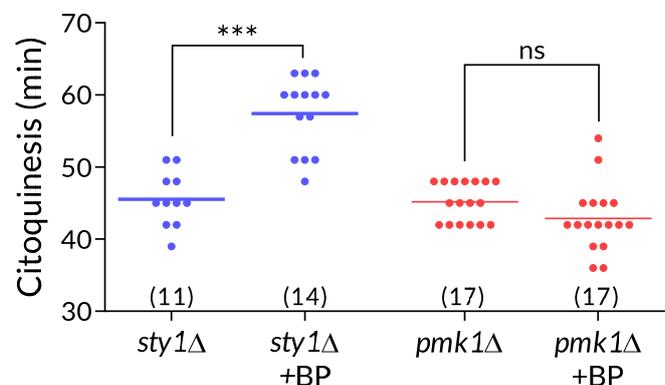
igual en presencia o ausencia de BP y no se detiene (ver [Figura 40](#)). Además, en presencia de BP, el septo tiene un aspecto normal y no encontramos fenotipo de lisis por la zona de división asociado al BP. Tampoco parece estar implicada su actividad relacionada con la actina, en tanto que la formación del anillo de actomiosina no se ve alterada por la presencia de BP y que la constricción, en la que intervienen la polimerización y despolimerización de actina, ocurre de forma normal (ver [Figura 41](#)).

De todos ellos, el papel de [Rho1](#) y de [Rgf1](#) como activadores de la ruta de integridad celular (CIP) parecía el más prometedor (García *et al.* 2009b; Sánchez-Mir *et al.* 2014). Esta vía de MAPK responde ante diversas condiciones de estrés para procurar la supervivencia celular y se activa, entre otros, ante la presencia de BP (Madrid *et al.* 2006; Barba *et al.* 2008). La ruta CIP, una de las tres rutas de MAPK en *S. pombe*, controla procesos como la formación y mantenimiento de la pared celular, morfogénesis, citoquinesis y homeostasis iónica (Perez & Cansado 2010). [Rho1](#) y [Rho2](#) son los principales reguladores positivos de la ruta y [Pmk1](#) su elemento central (Ma *et al.* 2006; Sánchez-Mir *et al.* 2014).

Otra de las rutas que también regula la separación celular en condiciones adversas es la ruta de respuesta a estrés (SAPK). La vía SAPK, cuyo componente central es la MAP kinasa [Sty1](#), promueve la transcripción de cohortes de genes específicos y la inhibición de la entrada en mitosis en respuesta a distintos tipos de estrés (Shiozaki & Russell 1995; Perez & Cansado 2010; Salat-Canela *et al.* 2017). Si las ruta CIP o SAPK actuaran como sensores de BP esperaríamos ver el mismo fenotipo de ausencia de bloqueo al suprimir la actividad de estas cascadas de señalización. Para analizar la citoquinesis en estas condiciones construimos cepas mutantes de las MAP kinasas de las dos rutas, [Pmk1](#) y [Sty1](#) junto con los marcadores fluorescentes habituales ([Imp2-GFP](#) y [Sid4-GFP](#)).

Como se muestra en la [Figura 44](#), el mutante [pmk1Δ](#) no presenta retraso citoquinético frente al BP. De hecho, el fenotipo es incluso más pronunciado que el de los mutantes de [Rgf1](#) y [Rho1](#). Por el contrario, en el mutante [sty1Δ](#) se observa un retraso en la citoquinesis similar al de

Figura 44 El retraso citoquinético causado por BP depende de la ruta CIP y no de la ruta SAPK. Tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en cepas [sty1Δ](#) y [pmk1Δ](#) que expresan [Imp2-GFP](#) y [Sid4-GFP](#), en presencia y ausencia de BP 5μg/ml. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en el DeltaVision y analizados con test de Šidák (ns no significativo, *** $p < 0.0001$, (n))



la cepa silvestre. En resumen, de las dos rutas analizadas, solo la ruta CIP está relacionada con el retraso en citocinesis asociado al BP.

Para comprobar si el fenotipo observado en el mutante *pmk1Δ* se debía a la ausencia de respuesta de retraso, y no a un efecto compensatorio entre las distintas etapas de la citocinesis, analizamos por separado el tiempo necesario para completar la formación, maduración y constricción. Como ocurría con *rgf1Δ*, en *pmk1Δ* las tres fases del CAR permanecen inalteradas en presencia de BP (Figura 45).

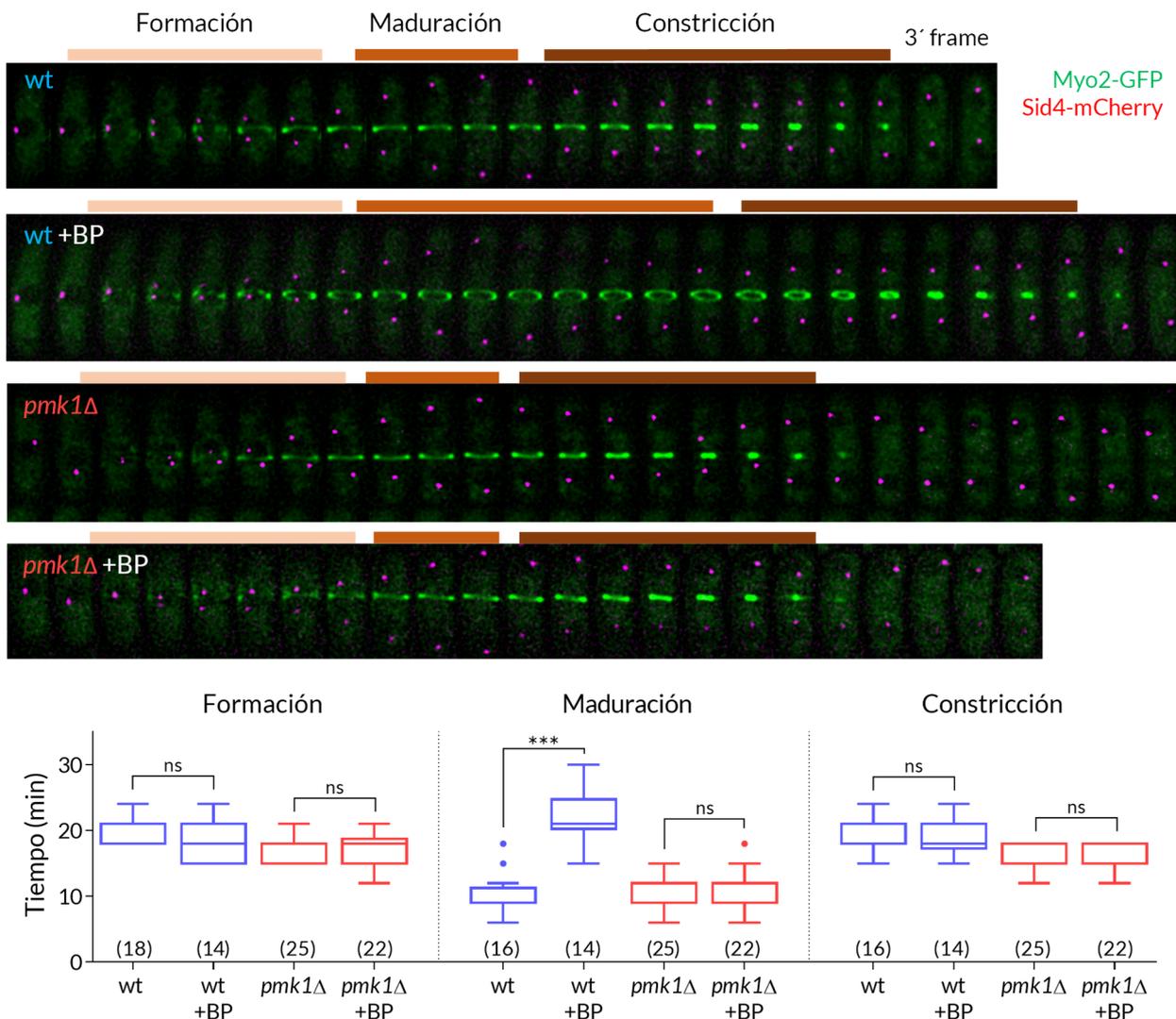


Figura 45 Pmk1 es necesaria para bloquear el inicio de la constricción en presencia de BP. Imágenes de time-lapse de células de tipo silvestre y *pmk1Δ* que expresan Myo2-GFP y Sid4-mCherry, en presencia o ausencia de BP 5μg/ml. Las barras de color señalan las tres etapas por las que pasa el anillo, cuantificadas en los box-plots de los paneles inferiores como detalla en el texto que alude a la Figura 4.1. Datos analizados con test de Šidák (ns no significativo, *** $p < 0.0001$, (n)).

Si nos fijamos en la fase de maduración, aquella que se incrementa en la cepa silvestre, vemos que en el mutante *pmk1Δ* apenas cambia por la presencia de BP. Cuando medimos la dinámica de constricción del anillo en el mutante *pmk1Δ* vimos que el inicio de la constricción no se ve modificado por la presencia de BP, y tampoco su velocidad de cierre (Tabla 2). Estos datos indican que *Pmk1* es parte fundamental de la maquinaria que induce un retraso en el inicio de la constricción del CAR en respuesta a daño en la pared celular provocado por BP.

Constricción	wt -	wt +BP	<i>rgf1Δ</i> -	<i>rgf1Δ</i> +BP	<i>pmk1Δ</i> -	<i>pmk1Δ</i> +BP
Inicio (min)	21 ± 2	38 ± 5	19 ± 3	25 ± 4	20 ± 2	20 ± 4
Velocidad (nm/min)	154 ± 21	158 ± 31	148 ± 25	175 ± 30	175 ± 16	187 ± 15

Tabla 2 Momento de inicio y velocidad de constricción del CAR en cepas wt, *rgf1Δ* y *pmk1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP en presencia y ausencia de blankophor 5 μg/ml. El minuto de inicio de la constricción toma como referencia 0 la duplicación de los SPBs. La velocidad se midió como el cambio del diámetro del CAR en función del tiempo, en el tramo lineal de la curva.

COMPONENTES DE LA RUTA CIP QUE PARTICIPAN EN LA RESPUESTA A BLANKOPHOR

La ruta de respuesta a estrés de *Pmk1* no es lineal en su tramo superior, sino que presenta al menos dos activadores conocidos, *Rho1* y *Rho2*. Estas GTPasas tienen papeles diferentes dependiendo del tipo de estrés que origina la respuesta y actúan sobre la MAPKKK *Mkh1* a través de dos proteínas PKC, *Pck1* y *Pck2* (ver Introducción) (Ma *et al.* 2006; Barba *et al.* 2008; Sánchez-Mir *et al.* 2014).

Sabemos que *Rho1*, *Rgf1* y *Pmk1* participan en el retraso en citoquinesis, pero no sabemos por dónde se canaliza la señal ni qué componentes de la ruta participan en el proceso. Para ello construimos las cepas *rho2Δ*, *pck2Δ* y *pck1Δ* con los marcadores Imp2-GFP y Sid4-GFP y analizamos el tiempo de citoquinesis siguiendo el mismo procedimiento que en los experimentos anteriores. Hemos visto que el mutante *pck2Δ* también es refractario al retraso citoquinético, mientras que los mutantes *rho2Δ* y *pck1Δ* responden de forma normal al BP (Figura 4.6). Estos datos indican que la vía *Rgf1-Rho1-Pck2-Pmk1* de la ruta CIP es necesaria para el retraso del inicio de constricción del CAR inducido por BP.

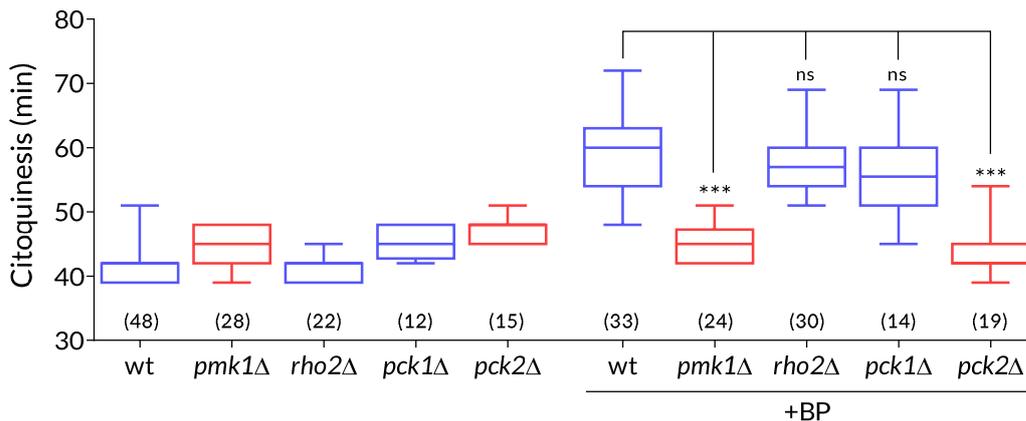


Figura 46 La vía Rgf1-Rho1-Pck2-Pmk1 de la ruta CIP es necesaria para retrasar la citoquinesis frente al BP. Tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en cepas wt, *pmk1Δ*, *rho2Δ*, *pck1Δ* y *pck2Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP, en presencia y ausencia de BP 5 μg/ml. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en el DeltaVision y analizados con test de Sidák (ns no significativo, *** $p < 0.0001$, (n)).

OTROS ESTRESSES QUE ACTIVAN LA RUTA CIP TAMBIÉN RETRASAN LA CONSTRICCIÓN DEL CAR

La ruta de integridad celular es activada por una amplia variedad de situaciones y sustancias exógenas (Madrid *et al.* 2006). Nos preguntamos si esta respuesta era exclusiva de la agresión producida por el BP o si otros agentes de estrés tendrían un efecto similar.

Seleccionamos otras sustancias que son, al igual que el BP, inductores de la ruta CIP: la caspofungina, un inhibidor de la β -1,3-glucán sintasa (Aguilar-Zapata *et al.* 2015), el KCl como agente de estrés salino hiperosmótico (Hohmann 2002), y la cafeína que, de manera potencialmente afín al BP, produciría cambios en la arquitectura de la pared celular (Martín *et al.* 2000a; Kuranda *et al.* 2006). Estos compuestos inducen la fosforilación de *Pmk1* y la activación de la ruta CIP (Madrid *et al.* 2006; García *et al.* 2009b), pero más allá de la descripción de fenotipos de multiseptación no se había estudiado cómo progresaba la citoquinesis en células afectadas por estas drogas.

Medimos los tiempos de citoquinesis en células de tipo silvestre tratadas con estos tres compuestos. Como en el caso del BP (5 μg/ml) empleamos también concentraciones bajas de los otros compuestos, cafeína (Caf) 2 mM, caspofungina (Csp) 0.2 μg/ml y KCl 0.2 M, que se añadieron en el momento inmediatamente previo al inicio del time-lapse. Los resultados mostraron que el BP no era un caso aislado (Figura 47).

Vimos que los tratamientos con cafeína, caspofungina y KCl también producen un aumento del tiempo que emplean las células en completar la citoquinesis, y que este retraso depende de la

presencia de *Pmk1*. En el mutante *rgf1Δ* la respuesta frente a Caf y Csp está a un nivel intermedio entre la del silvestre y el mutante *pmk1Δ*, mientras que en el tratamiento con KCl responde de forma comparable al silvestre (Figura 47).

Estos datos sugieren que el punto final de la ruta, *Pmk1*, tiene mayor efecto que su tramo superior, *Rgf1*, en lo relativo a la parada frente a estrés. También podría ser indicativo de una amplificación de la señal a lo largo de la ruta o de una integración de señales que confluyen en *Pmk1*.

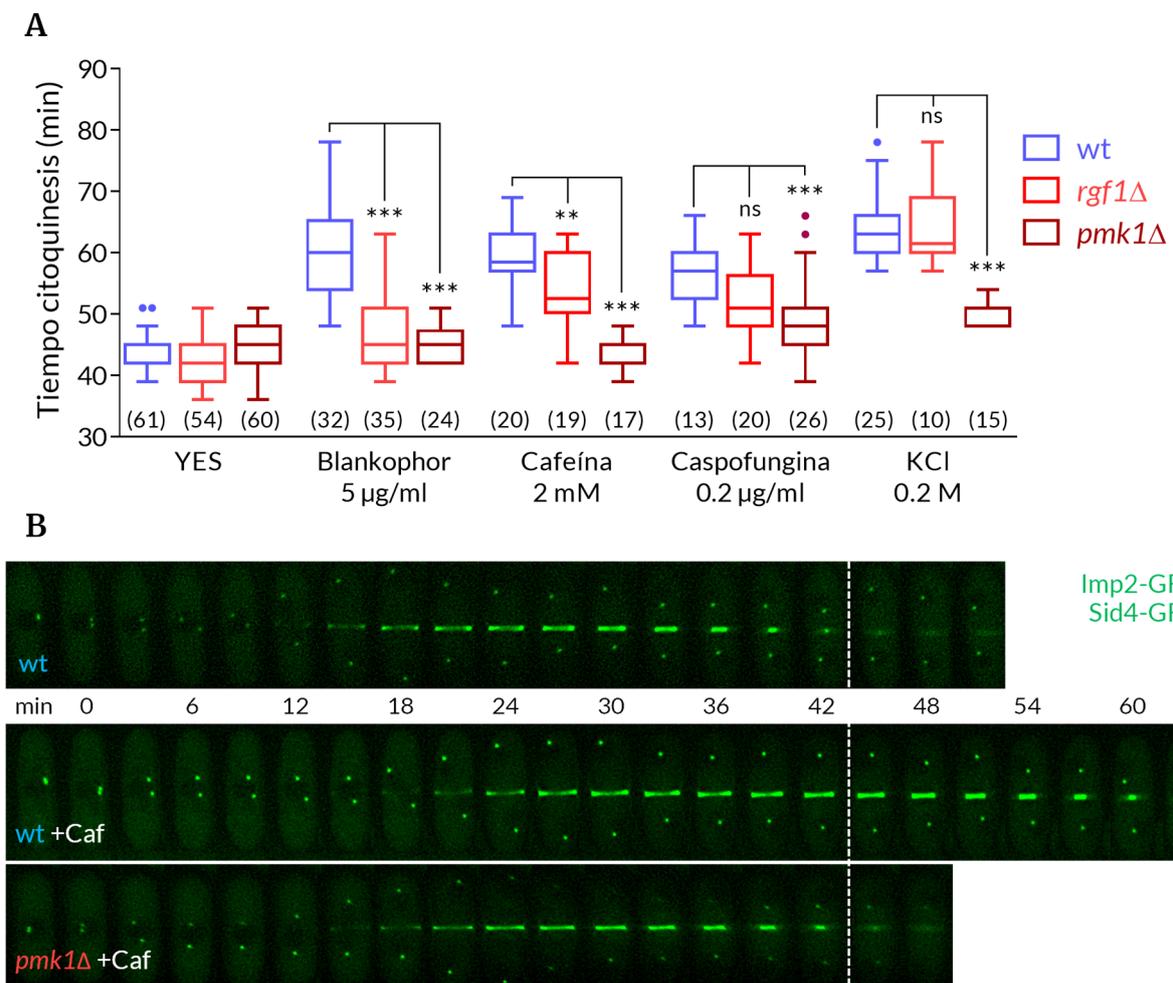


Figura 47 Además del BP, la cafeína, caspofungina y KCl también inducen un retraso en citoquinesis que depende de *Pmk1*. (A) Tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en cepas wt, *rgf1Δ* y *pmk1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP en condiciones normales (YES) y en presencia de BP 5 µg/ml, Caf 2 mM, Csp 0.2 µg/ml y KCl 0.2M. Los distintos compuestos se añadieron al comienzo de los time-lapses. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en DeltaVision y analizados con test de Šidák (ns no significativo, ** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$, (n)). (B) Imágenes de películas representativas de los datos mostrados (A), en este caso células wt y *pmk1Δ* tratadas con cafeína 2mM.

En el caso del estrés osmótico producido por el KCl no parece que la señal sea transducida a través de *Rgf1*, por lo que es probable que la agresión por estrés osmótico sea conducida por una vía independiente de *Rgf1*, quizá a través de *Rho2*. Esta posibilidad no ha sido estudiada.

También hemos visto diferencias en el retraso producido por el KCl con respecto los otros compuestos en el mutante *pmk1Δ*. Este mutante tiene también algo de retraso durante el tratamiento con KCl con respecto a sus condiciones basales (YES), aunque sin llegar a los tiempos de la cepa silvestre (Figura 47). Es posible que las nuevas condiciones osmóticas estuvieran originando un cambio en el ambiente celular que modificaría *per se* la citoquinesis al margen del retraso mediado por la ruta CIP; de hecho, la adición de KCl 1M produce una disminución del volumen celular y hace que los anillos se encojan y desensamblen, para luego volverse a formar (Okada *et al.* 2019). Los tiempos de citoquinesis de las células *pmk1Δ* tratadas con Csp presentan mayor dispersión que las de los otros casos (Figura 47); en este tratamiento encontramos algunas células lisadas en el cultivo, especialmente en el momento de la separación celular y también en la cepa silvestre, lo que nos estaría hablando de nuevo de efectos adicionales que se sumarían en global sobre el retraso que venimos definiendo.

Los cuatro compuestos analizados (BP, Caf, Csp y KCl) producen un incremento del tiempo de citoquinesis, aunque su relación con los mutantes de la ruta CIP presenta particularidades en cada caso. Esto no resulta extraño puesto que, aun induciendo los cuatro la activación de *Pmk1*, el estrés que producen sobre la célula es de distinta naturaleza. Las discrepancias vendrán definidas pues por el conjunto de efectos de cada compuesto; simplificarlos en una agresión concreta probablemente dista de lo que ocurre en realidad, y sin embargo agruparlos en sus similitudes nos ayuda a conocer la clase de respuesta que producen, centrándonos en este caso en la mediada por *Pmk1* durante citoquinesis.

En esta búsqueda de elementos comunes decidimos analizar la dinámica de los anillos de actomiosina. Hemos establecido que el efecto inducido por el BP es exclusivamente el retraso del inicio de la constricción. La Caf, Csp y el KCl aumentan también el tiempo de citoquinesis, pero no sabemos si su efecto es el mismo que el del BP. Medimos la progresión del diámetro del CAR a lo largo del tiempo en células tratadas con los tres nuevos compuestos y la comparamos con la condición sin tratamiento y con el efecto inducido por el BP (Figura 48).

La Caf, Csp y el KCl también producen un retraso del inicio de la constricción del CAR; las curvas que representan el diámetro del anillo inician su descenso más tarde en las células expuestas a las drogas. Este descenso coincide en los tres casos (a las concentraciones anteriormente referidas) de media en el minuto 27 ± 3 , lejos del minuto 21 ± 2 de la condición sin tratamiento (Tabla 3). Esta diferencia de unos 6 minutos es inferior a los 17 minutos de retraso que causa el tratamiento con BP. La discrepancia podría deberse a efectos de la concentración; puesto que ya hemos visto anteriormente que el bloqueo producido por BP se incrementa con la

dosis (ver [Figura 37](#)). También hemos visto que la Caf, Csp y el KCl provocan un descenso de la velocidad de constricción del CAR ([Tabla 3](#)).

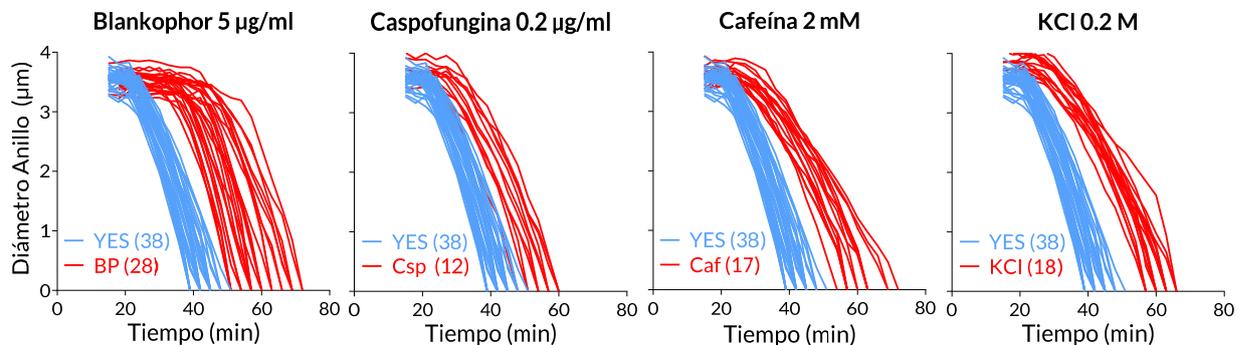


Figura 48 La cafeína, caspofungina y el KCl retrasan el inicio de la constricción del CAR y reducen su velocidad de cierre. Dinámicas de constricción de los anillos de la cepa silvestre wt que expresa Imp2-GFP y Sid4-GFP, en condiciones normales (YES) y en presencia de BP 5 µg/ml, Caf 2 mM, Csp 0.2 µg/ml y KCl 0.2M. Cada línea es un anillo al que medimos su diámetro en cada tiempo a partir de time-lapses capturados en el DeltaVision.

Constricción	YES	BP 5µg/ml	Caf 2mM	Csp 0,2µg/ml	KCl 0.2M
Inicio (min)	21 ± 2	38 ± 5	27 ± 3	27 ± 3	27 ± 3
Velocidad (nm/min)	154 ± 21	158 ± 31	97 ± 17	114 ± 13	95 ± 17

Tabla 3 Momento de inicio y velocidad de constricción del CAR en la cepa que expresa que expresa Imp2-GFP y Sid4-GFP en ausencia de estrés (YES) y en presencia de blankophor 5 µg/ml, cafeína 2 mM, Caspofungina 0.2 µg/ml y KCl 0.2M. El inicio de la constricción toma como referencia 0 min la duplicación de los SPBs. La velocidad está medida como el cambio del diámetro del CAR en función del tiempo, en el tramo lineal de la curva.

Que en estos compuestos veamos dos clases de respuestas sobre el anillo de actomiosina mientras que con BP únicamente se manifieste el del retraso del inicio de constricción no podemos sino achacarlo a la naturaleza de cada componente y a la diversidad de efectos que estos causen en la célula, aunque este es un terreno con más preguntas que respuestas.

Si la disminución de la velocidad de constricción del CAR es una respuesta activa de la célula o si es una consecuencia de cambios en la fisiología celular por los efectos del estrés y/o de la respuesta a dicho estrés, por ejemplo por cambios en la presión de turgencia (Proctor *et al.* 2012; Chang 2017), tampoco queda resuelto. Podemos de todas formas sugerir con los datos que tenemos que no se trata de un simple cambio en el entorno celular y que depende de la respuesta a la agresión. El hecho de que el mutante *pmk1Δ* no incremente su tiempo de citocinesis en

respuesta a estos compuestos (ver [Figura 47](#)) querría decir que anula los dos efectos, el retraso del inicio y la disminución de la velocidad, o dicho de otra forma, que ambos efectos son dependientes de *Pmk1*. Como pone de manifiesto el BP los dos efectos no están ligados, en este caso sólo tenemos uno que depende enteramente de *Pmk1*, y sin embargo en las otras condiciones *Pmk1* intervendría en una respuesta adicional, la bajada de la velocidad. Retrasar el inicio de la constricción y reducir su velocidad serían al final respuestas relacionadas con el control de la septación que media *Pmk1* ante agresiones que afectan a la integridad de la pared celular o el septo.

EL BLANKOPHOR, LA CASPOFUNGINA, LA CAFEÍNA Y EL KCL INDUCEN DEFECTOS DE SEPARACIÓN CELULAR EN EL MUTANTE *PMK1Δ*

Las células *pmk1Δ* presentan fenotipos ligados a la septación y al estrés. En el mutante *pmk1Δ* el porcentaje de células con septo es más alto que en la cepa silvestre y también aparece un pequeño porcentaje de células multiseptadas; ambos fenotipos se agravan con el incremento de la temperatura o en situaciones de estrés (Toda *et al.* 1996; Zaitsevskaya-Carter & Cooper 1997; Loewith *et al.* 2000). Para ver si el retraso que hemos descrito en citokuinesis tiene alguna consecuencia fisiológica examinamos el fenotipo de las células *pmk1Δ* después del tratamiento con BP, Caf, Csp y KCl.

En las condiciones de cultivo utilizadas hasta ahora, medio YES a 28°C, no habíamos detectado ningún fenotipo destacable, por lo que cambiamos las condiciones en favor de otras

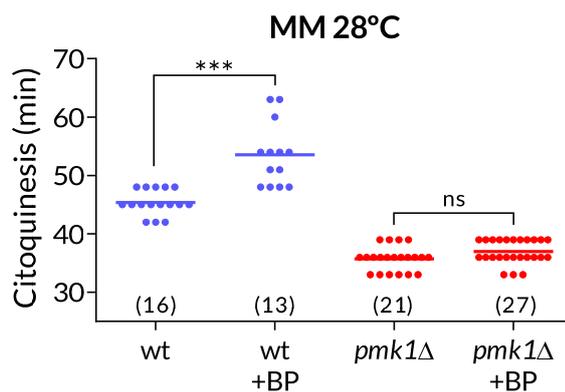


Figura 49 El blankophor produce un retraso de la citokuinesis también en medio mínimo. Tiempo que tarda en completarse la citokuinesis en cepas wt y *pmk1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP, en presencia y ausencia de BP 5µg/ml. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en Spinning Disk y analizados con test de Fisher (ns no significativo, *** $p < 0.0001$, (n))

en las que estos fenotipos se hacían más evidentes (Toda *et al.* 1996), esto es, medio mínimo (MM) a 31°C. Antes de comenzar con los experimentos en MM analizamos el tiempo que dura la citokuinesis en este medio en presencia de BP mediante time-lapse. Como se puede observar en la [Figura 49](#), también hay un retraso de la citokuinesis en MM y que este retraso depende de la presencia de *Pmk1*.

A continuación, tomamos muestras de cultivos creciendo en fase exponencial en MM a 31°C durante 16h (pasadas desde 25°C), y las fotografiamos *in vivo* utilizando la tinción de BP en el momento para marcar

los septos. En estas condiciones el mutante *pmk1Δ* empieza a manifestar ciertos defectos en septación. El porcentaje de células con 1 septo aumentó del 17% de la cepa silvestre a un 20% en el mutante. Además, en el mutante hay un 2% de células con más de un septo, que no se ven en la cepa silvestre (Figura 50B).

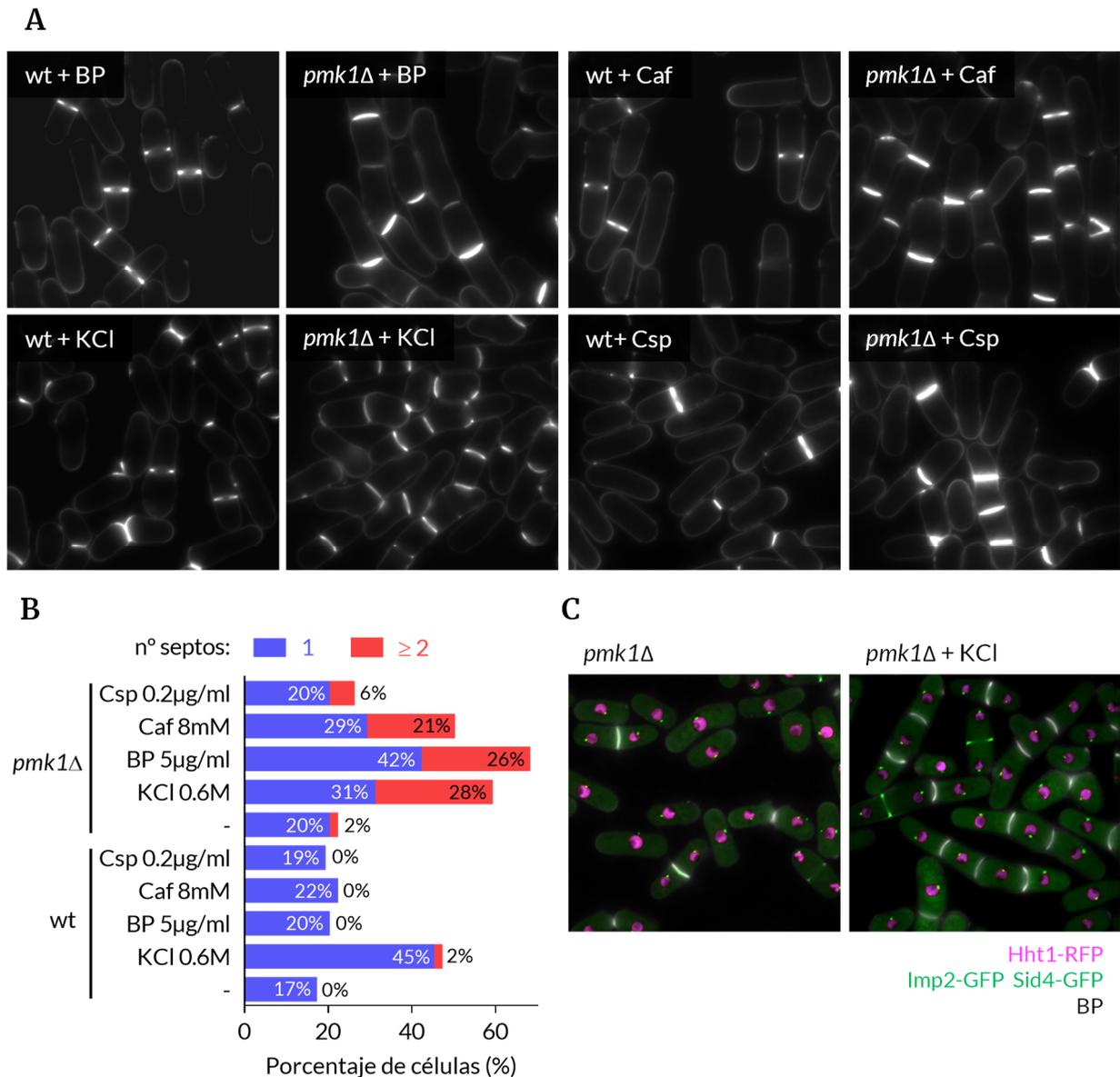


Figura 50 La presencia de blankophor, cafeína, caspofungina y KCl origina células encadenadas en el mutante *pmk1Δ*. (A) Imágenes de fluorescencia de células wt y *pmk1Δ* crecidas a 31°C durante 16h en MM en presencia de BP 5 μg/ml, Caf 2 mM, Csp 0.2 μg/ml y KCl 0.6M, y teñidas con BP en el momento de capturar las imágenes en DeltaVision. (B) Porcentaje de las células descritas en (A) que presenta uno (azul) o más septos (rojo) (>300 células/condición). (C) Imágenes de fluorescencia tomadas en DeltaVision de células *pmk1Δ* que expresan la variante de histona Hht1-RFP, Imp2-GFP, Sid4-GFP. Las células fueron incubadas en presencia y ausencia de KCl y teñidas con BP como en (A).

Cuando sobre estas condiciones de cultivo aplicamos el tratamiento con BP a 5 $\mu\text{g/ml}$, la misma concentración a la que se producía el fenotipo de retraso, y miramos las células a las 16h vemos que los fenotipos se agravan. El porcentaje de células *pmk1 Δ* con un septo se dispara al 42%, y además otro 26% de las células son muy largas y tienen varios septos por célula, separados de forma aproximadamente equidistante, y en algunos casos con ramificaciones (Figura 50A); estos defectos están casi completamente ausentes en la cepa silvestre (20% de células con un septo y ausencia de multiseptadas o ramificadas).

Los tratamientos con KCl, cafeína y caspofungina producen resultados similares en las respectivas cepas, entre los que destacan dos situaciones (Figura 50B). El tratamiento con KCl en la cepa silvestre incrementa el porcentaje de células con un septo a un 45% y (2%) de multiseptadas, mientras que en la cepa *pmk1 Δ* el número de células con un septo es similar pero las multiseptadas alcanzan el 28%. Esto podría indicar que este estrés hipertónico origina una situación que complica la separación celular pero que puede llegar a término gracias la presencia de *Pmk1*. Por otro lado, el incremento de células multiseptadas producido por la caspofungina en *pmk1 Δ* es solo del (6%). Curiosamente en MM y con una concentración de Caspofungina de 0.2 $\mu\text{g/ml}$, no vemos el fenotipo de lisis celular observado en los time-lapses en YES, lo que está de acuerdo con un efecto más suave.

Al margen de los detalles que diferencian los distintos tipos de estrés, la figura de *Pmk1* establece la relación entre el fenotipo de multiseptación en presencia de estrés y el efecto del retraso de la citoquinesis. Dicho de otra manera, en el mutante *pmk1 Δ* la ausencia de retraso ante estrés se correlaciona con la aparición a largo plazo de septos sin resolver.

Definimos así estos septos porque hemos mirado el estado de estas células multiseptadas marcando los núcleos celulares con la histona H3 con epítipo rojo, *Hht1-RFP*. Las células *pmk1 Δ* tratadas con KCl que describíamos como multiseptadas son en realidad células encadenadas (Figura 50C). Cada septo separa o bien un compartimento celular con un único núcleo, y por tanto una célula no separada, o con dos núcleos cuando esa célula está en mitosis, algo que podemos visualizar por la duplicación del SPB (*Sid4-GFP*) y la presencia del CAR (*Imp2-GFP*). Estos son por tanto septos mitóticos (no interfásicos) que se forman tras una mitosis exitosa, en tanto que la segregación nuclear no presenta defectos apreciables, lo que concuerda con el retraso en citoquinesis que hemos definido.

Pensamos que es la incapacidad del mutante para inducir el retraso en citoquinesis, y así garantizar la actuación de un hipotético mecanismo de control, lo que finalmente produce estos septos defectuosos. Esta idea favorece el modelo en el que estos defectos de separación celular tienen su origen en el comienzo de la septación. Por ello, más que defectos en la actuación de las glucanasas creemos que en este caso es la formación del septo la parte determinante para que el septo maduro se disuelva de forma adecuada (Martín-Cuadrado *et al.* 2003; García *et al.* 2005;

Martín-García & Santos 2016). Nuestros datos indican que la ruta CIP se activaría en respuesta a agresiones que afectan a la correcta formación del septo induciendo una parada antes de su invaginación a través del bloqueo del inicio de la constricción del CAR.

Nos preguntamos si esta respuesta de la ruta CIP se produce también en otras situaciones que afectan a la estabilidad del septo como es el caso de mutantes con defectos en la síntesis de la pared celular. Para ello analizamos el tiempo que dura la citoquinesis en la cepa *cwg1-1*, que tiene una mutación no letal en el gen *bgs4+*, una de las cuatro subunidades catalíticas de la β -glucán sintasa. Esta mutación confiere a las células el carácter termosensible, así como una reducción del β -glucano de la pared celular y de la actividad glucán sintasa a la temperatura restrictiva (Cortés *et al.* 2005). Además de estos fenotipos, en el mutante *cwg1-1* el tiempo que dura la citoquinesis es sensiblemente más largo que en la cepa silvestre (Muñoz *et al.* 2013). Nosotros hemos visto que este retraso se suprime parcialmente al delecionar *Pmk1* (Figura 51), lo que sugiere que diversas situaciones de estrés en septación producirían también la activación de la ruta CIP para inducir el retraso en citoquinesis.

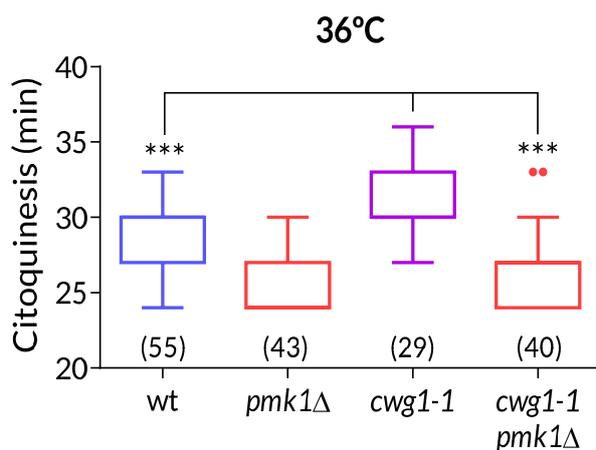


Figura 51 Pmk1 media en el retraso en citoquinesis del mutante *cwg1-1*. Tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en cepas wt, *pmk1*Δ, *cwg1-1* y *cwg1-1 pmk1*Δ que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP, crecidas previamente a 36°C durante 1.5h (vienen de 25°C). Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en el Spinnig Disk a 36°C y analizados con test de Fisher (***) $p < 0.0001$, (n)).

RELACIÓN DE LA MIOSINA CON EL RETRASO CAUSADO POR EL ESTRÉS EN SEPTACIÓN

El cierre del anillo de actomiosina es un proceso complejo que se produce gracias a la cooperación de dos actividades necesarias, la tensión generada por la interacción de las miosinas sobre los filamentos de actina y la síntesis acoplada del septo (Willet *et al.* 2015; Rincon & Paoletti 2016; Pollard & O'Shaughnessy 2019). Un bloqueo en la constricción del anillo como el que hemos descrito podría ser el resultado de una parada en uno de estos dos procesos, o en ambos.

Hemos descartado ya que el bloqueo de la síntesis del septo sea la causa de la parada. Sabemos que la síntesis del septo se inicia a tiempos normales aun en condiciones de bloqueo y que la señal de BP va aumentando lentamente con el tiempo (ver [Figura 40](#)). La propia naturaleza del BP como colorante que se une preferentemente a las regiones de pared celular que crecen activamente invita a pensar que el estrés producido a esta concentración tan baja solo se origina una vez que ha comenzado la síntesis del septo. Decidimos mirar entonces si era la actividad motriz de la miosina o la polimerización de las fibras de actina lo que se veía bloqueado en presencia de BP y que paraliza transitoriamente la constricción del CAR.

S. pombe presenta dos isoformas de la miosina II, *Myo2* es una miosina convencional y es esencial, mientras que *Myp2* tiene una estructura diferente y no es esencial. Ambas cadenas pesadas se unen a las dos cadenas ligeras *Cdc4* y *Rlc1* (Bezanilla *et al.* 1997; Le Goff *et al.* 2000; Motegi *et al.* 2000). *Myo2* es muy dinámica y se distribuye en nodos que capturan los filamentos de actina de nodos adyacentes. *Myp2* es prácticamente inmóvil y se incorpora al anillo ya ensamblado. Las células del mutante *myp2Δ* presentan retraso en constricción (Laplante *et al.* 2015), especialmente bajo condiciones de alto estrés salino (Okada *et al.* 2019).

Para saber si *Myp2* era la diana que estaría siendo frenada para retrasar la constricción del CAR medimos los tiempos de citoquinesis del mutante *myp2Δ* en ausencia y presencia de BP. Vimos que la presencia de BP produce un retraso adicional sobre el tiempo medio de constricción de *myp2Δ* (*myp2Δ*: 48 ± 5.5 min, *myp2Δ* +BP: 60 ± 5.9 min) ([Figura 52](#)), lo que sugiere que el retraso de *myp2Δ* y el del estrés de pared se dan por vías diferentes. Obtuvimos resultados similares al suprimir la cadena ligera *Rlc1*, componente regulador de *Myo2* y de *Myp2* ([Figura 52](#)). En conjunto estos datos indican que ni *Myp2* ni *Rlc1* son los responsables de la parada transitoria en la constricción del CAR producida por el BP.

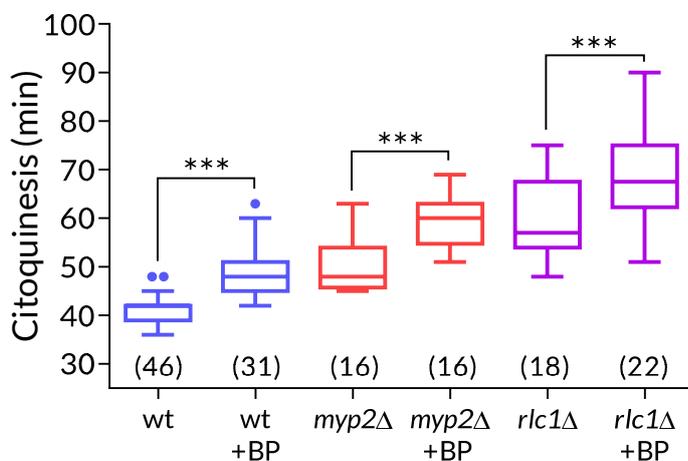


Figura 52 Los componentes de la miosina II *Myp2* y *Rlc1* no están involucrados en el retraso citoquinético frente a BP. Tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en cepas wt, *myp2Δ* y *rlc1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP en ausencia y en presencia de BP 5 μ g/ml. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en Spinning Disk y analizados con el test de Fisher (***) $p < 0.0001$, (n).

RELACIÓN DE LA ACTINA CON EL RETRASO CAUSADO POR EL ESTRÉS EN SEPTACIÓN

Dejando de lado la vía de la miosina estudiamos si el bloqueo del CAR podía venir dado por alteraciones en los procesos de remodelación de actina. Se sabe que tanto la polimerización como la despolimerización de los filamentos de actina son actividades necesarias para la integridad y constricción del CAR (Cheffings *et al.* 2016, 2019; Rincon & Paoletti 2016). La formina **Cdc12** nuclea y elonga los filamentos de actina (Chang *et al.* 1997; Kovar *et al.* 2003), mientras que la cofilina **Adf1** participa en la remodelación seccionando estos (Nakano & Mabuchi 2006).

Como las dos actividades son esenciales, utilizamos el mutante termosensible **cdc12-112**, el cual lleva una mutación puntual en el dominio FH2 (*Formin Homology 2*) que afecta a su actividad en el ensamblaje de actina (Coffman *et al.* 2013), y el mutante **adf1-1**, que está afectado en el desensamblaje y es también termosensible (Chen & Pollard 2011). Empleamos la misma estrategia seguida con los mutantes de miosina, comparando los tiempos de citoquinesis de estos mutantes en presencia y ausencia de BP, pero en este caso, al tratarse de mutantes termosensibles, realizamos los experimentos a la temperatura semi-restrictiva de 32°C.

En ambos mutantes la citoquinesis es más lenta que en la cepa silvestre a 32°C, lo que nos indica que el proceso se encuentra afectado en estas condiciones (**Figura 53A, B**). Sin embargo, nuevamente en las dos cepas, **adf1-1** y **cdc12-112**, la presencia de BP produce un retraso aditivo sobre sus respectivas condiciones basales. Si bien los datos del mutante **adf1-1** no dejaban lugar a dudas (**Figura 53A**), en el caso del mutante **cdc12-112** el retraso inducido por el BP no era proporcional al visto en la cepa silvestre, es decir, el BP producía un retraso, pero más leve que en el control (**Figura 53B**).

Repetimos entonces el experimento incrementando la temperatura hasta los 34°C para condicionar todavía más la función de **cdc12-112**, y medimos específicamente el tiempo desde la separación de los SPBs hasta el inicio de la constricción del CAR en lugar de la citoquinesis total. Esperábamos que si **Cdc12** fuera el responsable del retraso se acortarían las diferencias entre la cepa mutante tratada con BP y el control sin tratar. El incremento de la temperatura condiciona más la citoquinesis en el mutante **cdc12-112** lo que sugiere que sus defectos se concentran antes del inicio de la constricción. Pero igual que a 32°C, la adición de BP produce un retraso adicional (**Figura 53C**), lo que sugiere que no es **Cdc12** ni tampoco **Adf1** el efector involucrado en frenar la constricción ante la agresión por BP.

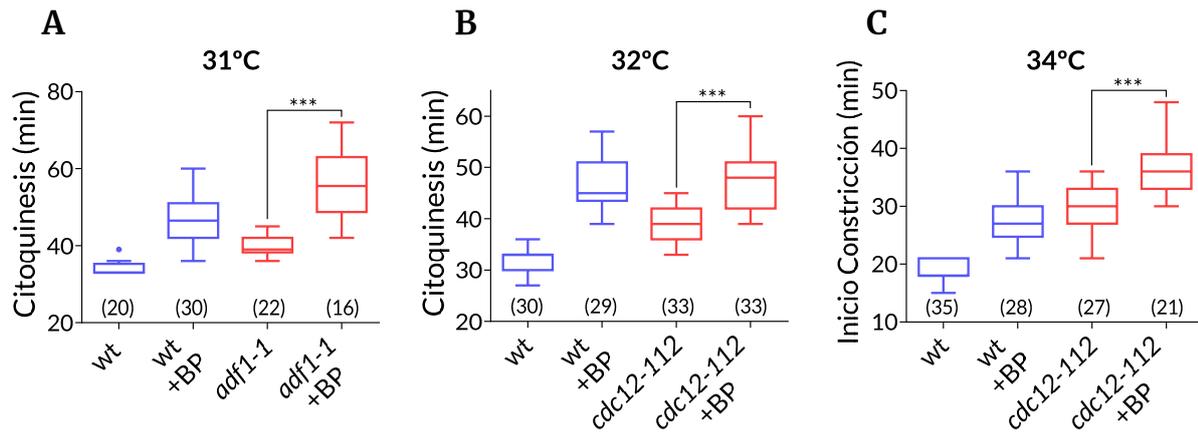


Figura 53 Ni la formina Cdc12 ni la cofilina Adf1 están involucradas en el retraso citoquinético frente a BP. (A, B) Tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en cepas wt, *adf1-1* y *cdc12-112* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP. Antes del time-lapse las células fueron incubadas durante 1h a 31°C (A) y 32°C (B) y el time-lapse se realizó en ausencia o en presencia de BP 5 µg/ml. (C) Se analizó el tiempo desde la separación de los SPBs hasta el inicio de la constricción en cepas wt y *cdc12-112* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP en presencia y ausencia de BP 5 µg/ml. Antes del time-lapse las células fueron incubadas durante 1h a 34°C y el time-lapse se realizó en ausencia o en presencia de BP 5 µg/ml. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en el Spinning Disk a las respectivas temperaturas y analizados con test t de Student (***) $p < 0.0001$, (n)).

Hasta ahora nuestras aproximaciones para encontrar el origen del bloqueo dentro de los componentes del CAR han producido resultados negativos. Sin embargo, esto no nos permite descartar por completo que la naturaleza de la parada venga del freno en la actividad de la actina o miosina, puesto que usamos mutantes que todavía conservan cierta actividad. Hay múltiples proteínas involucradas en estos sistemas que podrían ser posibles candidatos, otras miosinas como *Myo2* o *Myo51* (Laplante *et al.* 2015), forminas como *For3*, u otras proteínas de unión a actina como *Ain1* o *Fim1* (Mishra *et al.* 2014; Willet *et al.* 2015).

Llegado a este punto, continuar con la búsqueda del elemento responsable nos parecía una tarea ineficiente con esta metodología, más si planteamos que pudiera tratarse de un sistema redundante o sinérgico entre varios componentes. Decidimos tomar distancia y abordar el estudio del bloqueo no desde el elemento final basado en la naturaleza física del cierre del anillo, sino como una regulación de la transición del CAR a la fase de constricción. Este cambio de enfoque nos llevó a fijarnos en un mecanismo de control cuya descripción encajaba con nuestros resultados, y así resolver la siguiente duda: ¿está el bloqueo por BP mediado por el checkpoint de citoquinesis?

CLP1 Y EL CHECKPOINT DE CITOQUINESIS FRENTE AL BLOQUEO POR BLAKOPHOR

S. pombe tiene un mecanismo que controla la estabilidad de la maquinaria de división celular. Éste se conoce como checkpoint de citoquinesis y se activa frente a perturbaciones de los componentes del anillo, promoviendo su estabilización y el bloqueo de la progresión del ciclo celular (Le Goff *et al.* 1999; Liu *et al.* 2000). Esta respuesta depende de la fosfatasa **Clp1** y de la actividad SIN. **Clp1** mantendría el SIN activo para efectuar el bloqueo del ciclo celular en fase G2 mientras estabiliza el CAR (Mishra *et al.* 2004). De hecho, **Clp1** es sustrato de **Sid2**, la kinasa final de la ruta SIN, y la fosforilación de **Sid2** es necesaria para que **Clp1** se mantenga en el citoplasma durante el bloqueo (Chen *et al.* 2008); por su parte **Clp1** desfosforila a **Cdc11**, componente de reclutamiento del SIN, estableciendo un círculo de retroalimentación entre estos tres reguladores (Chen *et al.* 2013).

Existe cierta semejanza en la parada del CAR característica de este checkpoint con nuestros resultados con BP. Además, está descrito que **Pmk1** fosforila a **Clp1** *in vitro* y regula su localización núcleo/citoplásmica en respuesta a estrés oxidativo (Broadus & Gould 2012), por lo que nos preguntamos si **Clp1** estaría mediando el bloqueo de constricción causado por el BP. Si esta hipótesis es correcta esperaríamos que el mutante *clp1Δ* se comportara de manera similar al mutante *pmk1Δ* en lo referente al bloqueo causado por BP. Sin embargo, nuestros resultados indican justo lo contrario (Figura 54). En el mutante *clp1Δ*, en presencia de BP, la citoquinesis es considerablemente más lenta que en el control *clp1Δ* sin BP.

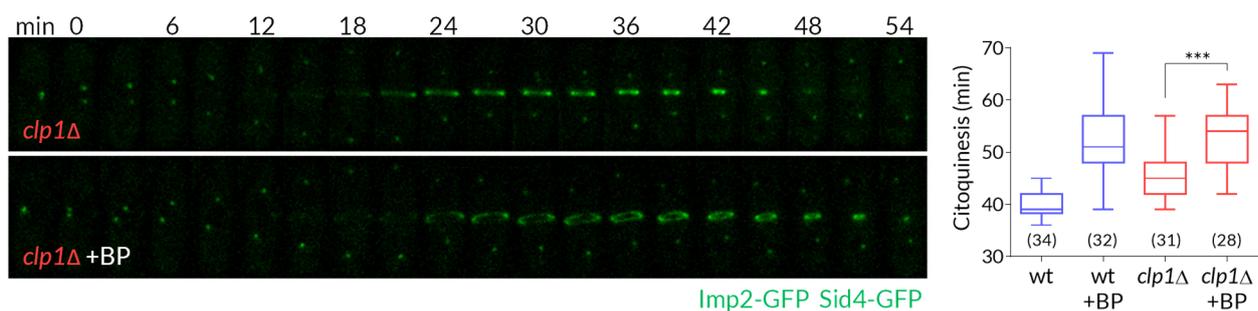


Figura 54 El retraso citoquinético y la estabilización del CAR causados por BP no dependen de la fosfatasa Clp1. Imágenes de time-lapse capturadas en Spinning Disk de células *clp1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP en presencia y ausencia de BP 5 μg/ml. Fotografías tomadas cada 2 minutos (se muestran cada 4). Derecha, tiempo que tarda en completarse la citoquinesis en las cepas wt y *clp1Δ* en esas condiciones, analizados con el test t de Student (***) $p < 0.0001$, (n).

Por otra parte, nos resultó curioso ver que el anillo no se disolvía estando parado incluso en ausencia de *Clp1* (Figura 54). *Clp1* interviene en dos aspectos del checkpoint de citoquinesis: la parada del ciclo celular y la estabilización del CAR. Esta fosfatasa es necesaria para evitar la catástrofe del CAR en presencia de bajas dosis de latrunculina A (LatA) y en el mutante de la glucán sintasa *cps1-191* defectivo en citoquinesis (Liu *et al.* 2000). En la cepa silvestre después del tratamiento con LatA, o en el mutante *cps1-191* los anillos mantienen su estructura para que eventualmente puedan completar la septación. Sin embargo, en las mismas condiciones en el mutante *clp1Δ* los anillos son inestables y terminan por disolverse (Mishra *et al.* 2004). En el caso del BP también vemos esta estabilización de los anillos, pues se mantienen parados sin contraerse, pero sin desensamblarse. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en respuesta a LatA o en el mutante *cps1-191*, la estabilidad del anillo frente al BP no depende de *Clp1*.

También examinamos si *Pmk1*, de quien depende el bloqueo por BP, participaba en la estabilización del CAR conferida por el checkpoint de citoquinesis. Para ello utilizamos el mutante *cps1-191*, que a 36°C presenta un bloqueo en la septación y a la vez un aumento del número de anillos estables, gracias a la activación del checkpoint (Mishra *et al.* 2004). Al deletar *Pmk1* sobre esta cepa y pasarla a la temperatura restrictiva vimos que la fracción de células con anillo (*Rlc1-tdTomato*) se incrementaba en el doble mutante *cps1-191 pmk1Δ* con respecto al sencillo *cps1-191* (Figura 55A).

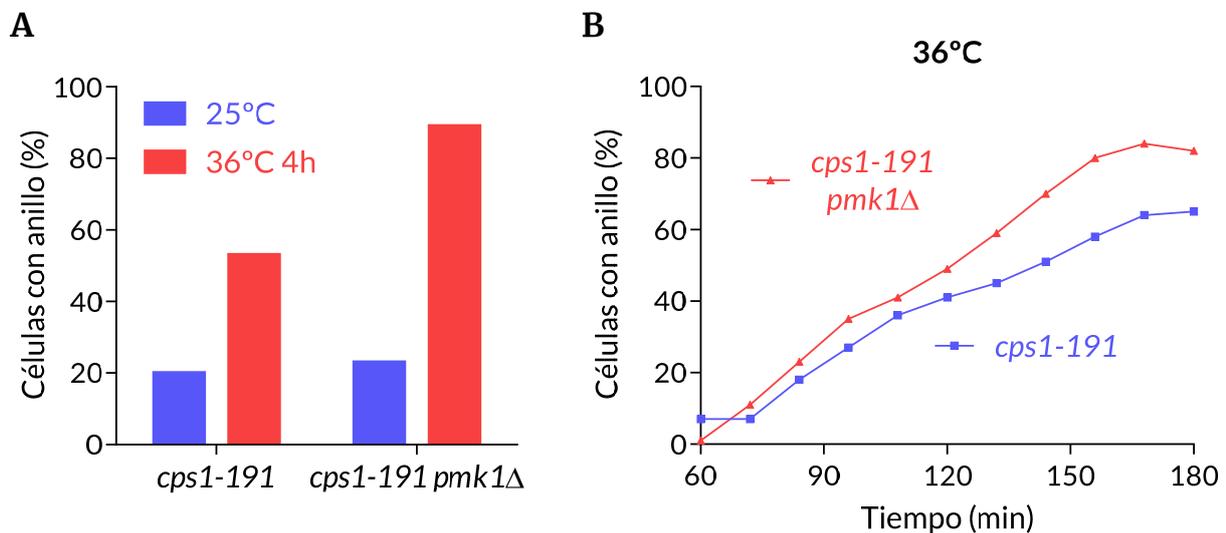


Figura 55 *Pmk1* es innecesario para estabilizar el CAR en el mutante *cps1-191*. Se analizó la fracción de células con anillo en cepas *cps1-191* y *cps1-191 pmk1Δ* que expresan *Imp2-GFP* y *Sid4-GFP*. (A) En condiciones basales (25°C) y después de 4h a 36°C (>300 células/condición). (B) Tomando fotos cada 15 minutos a 36°C (>80 células/condición). Datos cuantificados a partir de imágenes (A) y time-lapses (B) en DeltaVision.

Lo inesperado de este incremento nos llevó a examinar el bloqueo de las dos cepas por time-lapse en condiciones restrictivas. No parecía que en el doble *cps1-191 pmk1Δ* la citoquinesis fuera más lenta que en el sencillo *cps1-191*, o que menos células se saltaran dicho bloqueo, y sin embargo registramos cómo el porcentaje de células con presencia de anillo se incrementaba más rápido en la cepa que lleva la disrupción de *Pmk1* (Figura 55B). Esta diferencia la achacamos a la apreciación cualitativa de que el mutante *pmk1Δ* crece más rápido, por lo que habría más células que llegan antes a formar anillos. Para comprobar este supuesto deberíamos caracterizar las velocidades de crecimiento de estas cepas o analizarlas a partir de cultivos sincrónicos. Estos resultados muestran que ni *Pmk1* es necesario para estabilizar los anillos en el mutante *cps1-191*, ni *Clp1* participa en el bloqueo por BP. También sugieren que se trata de mecanismos de control diferentes respondiendo a agresiones distintas, la integridad del anillo a través de *Clp1* y la del septo mediante *Pmk1*.

Aun tratándose de respuestas diferentes, al ver en la parada por BP anillos bloqueados temporalmente ¿podemos decir que estos están estabilizados? Los mutantes que hemos identificado como mediadores de este proceso se saltan el bloqueo, pero en ningún caso hemos visto que en ausencia de *Rgf1* o de *Pmk1* se disuelva el anillo. Para analizar esta posibilidad examinamos la integridad/estabilidad de los anillos bloqueados por BP tratando las células con una concentración intermedia LatA (5 μ M) (Mishra *et al.* 2004). La LatA secuestra monómeros de actina e inhibe la polimerización. Para visualizar la actina utilizamos el péptido *LifeAct-GFP*, que se une a la actina monomérica y polimérica (Riedl *et al.* 2008; Huang *et al.* 2012), y medimos la estabilidad como la fracción de células que presentan actina en estructura anular en función del tiempo de tratamiento con LatA (Figura 56).

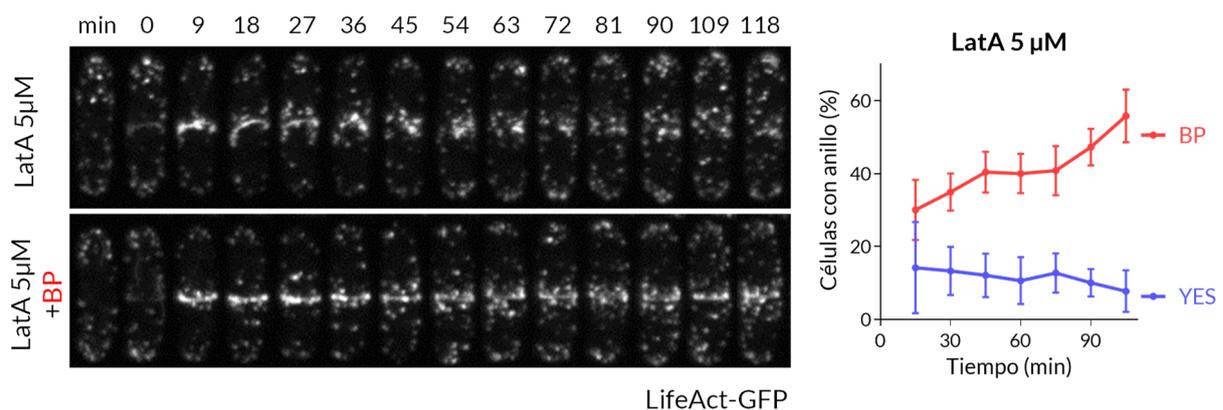


Figura 56 El tratamiento con BP estabiliza el anillo de actomiosina. Imágenes de time-lapse capturadas en Spinning Disk de células de tipo silvestre que expresan *LifeAct-GFP*, en presencia de Latrunculina A 5 μ M y con o sin BP 10 μ g/ml (añadido 30 minutos antes que la LatA). Tiempo 0 es la aparición del anillo. Derecha, fracción de estas células con presencia de anillos de *LifeAct-GFP* a lo largo de los tratamientos (Media \pm SD, n: 4 réplicas con > 20 células/réplica).

El tratamiento con LatA provoca una disminución del número de anillos. Sin embargo, cuando pretratamos las células con BP 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos, antes de añadir la LatA, el porcentaje de células con anillo de actina no solo no disminuye, sino que aumenta con el tiempo (Figura 56). En este experimento incrementamos la dosis habitual de BP a 10 $\mu\text{g/ml}$ para forzar más bloqueo. La exposición a BP hace que los anillos sean menos sensibles a LatA, lo que sugiere que el bloqueo de la constricción en respuesta al BP va acompañado de la estabilización del CAR.

Si la respuesta a BP implica una estabilización del CAR, pero el mutante *clp1 Δ* responde bloqueando los anillos de forma normal ¿Quién media entonces este efecto? ¿Qué puede estar regulando *Pmk1* para estabilizar el anillo de actomiosina? Puesto que *Sid2* es necesario para la estabilización del CAR en el checkpoint de citocinesis, nos preguntamos si tendría una función similar en el caso del bloqueo por BP.

El mutante *sid2-250* a temperatura restrictiva presenta células alargadas y multinucleadas junto con anillos inestables que se forman y desaparecen (Balasubramanian *et al.* 1998; Mishra *et al.* 2004). Nos preguntamos si la presencia de BP estabilizaría los anillos en el mutante *sid2-250*. Para ello medimos el porcentaje de anillos de *Imp2-GFP* en células *sid2-250* incubadas a 36°C durante 2 y 3h, en ausencia o en presencia de BP 10 $\mu\text{g/ml}$ añadido 30 minutos antes de tomar las muestras para inducir el bloqueo en las condiciones restrictivas. En la Figura 57 se muestran las fracciones de células con anillo en estos tratamientos y fotos de las células *sid2-250* control y tratadas con BP después de 3 h a 36°C.

Tanto las células *sid2-250* tratadas con BP como el control expresaron el mismo fenotipo, y la fracción de anillos se redujo por igual. Por tanto, la estabilización del CAR ante la presencia de BP requiere la actividad de la ruta SIN.

sid2-250 36°C

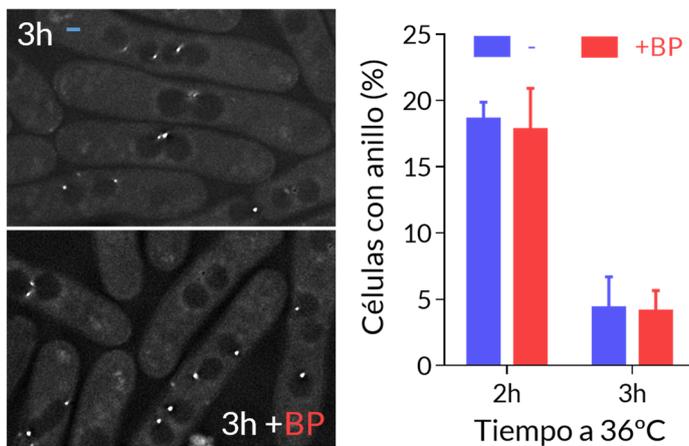


Figura 57 La kinasa de la ruta SIN Sid2 es necesaria para estabilizar el CAR en presencia de blankophor. Derecha, fracción de células *sid2-250* que expresan *Imp2-GFP* y *Sfi1-GFP* con anillo después de 2 y 3 horas a 36°C. Las células fueron tratadas o no con BP (10 $\mu\text{g/ml}$) 30 minutos antes de la captura de imágenes (Media \pm SD, n: 2 réplicas con > 150 células/réplica). Izquierda, imágenes de fluorescencia capturadas en DeltaVision representativas de estas células a las 3h a 36°C.

LA RUTA SIN COMO MEDIADOR DEL BLOQUEO DEL CAR FRENTE AL ESTRÉS EN SEPTACIÓN

Dado que la kinasa *Sid2* es necesaria para mantener la integridad del anillo como respuesta al BP era de esperar que la ruta SIN estuviera activa durante el bloqueo. La actividad de la ruta SIN está ligada a la localización de sus componentes ya que integra señales desde el SPB hacia la zona de división (Simanis 2015). Esta característica nos permite monitorizar su estado de activación mediante el seguimiento de la localización de algunos de sus componentes.

La localización de *Sid2* en la zona de división, así como la polarización de *Cdc7* a uno de los dos SPBs en anafase se consideran eventos que reflejan la activación de la ruta SIN (Johnson *et al.* 2012). Para visualizar el estado del SIN en respuesta a daños en la pared, miramos la localización de estos dos componentes en células wt y *rgf1Δ*, con o sin BP (Figura 58).

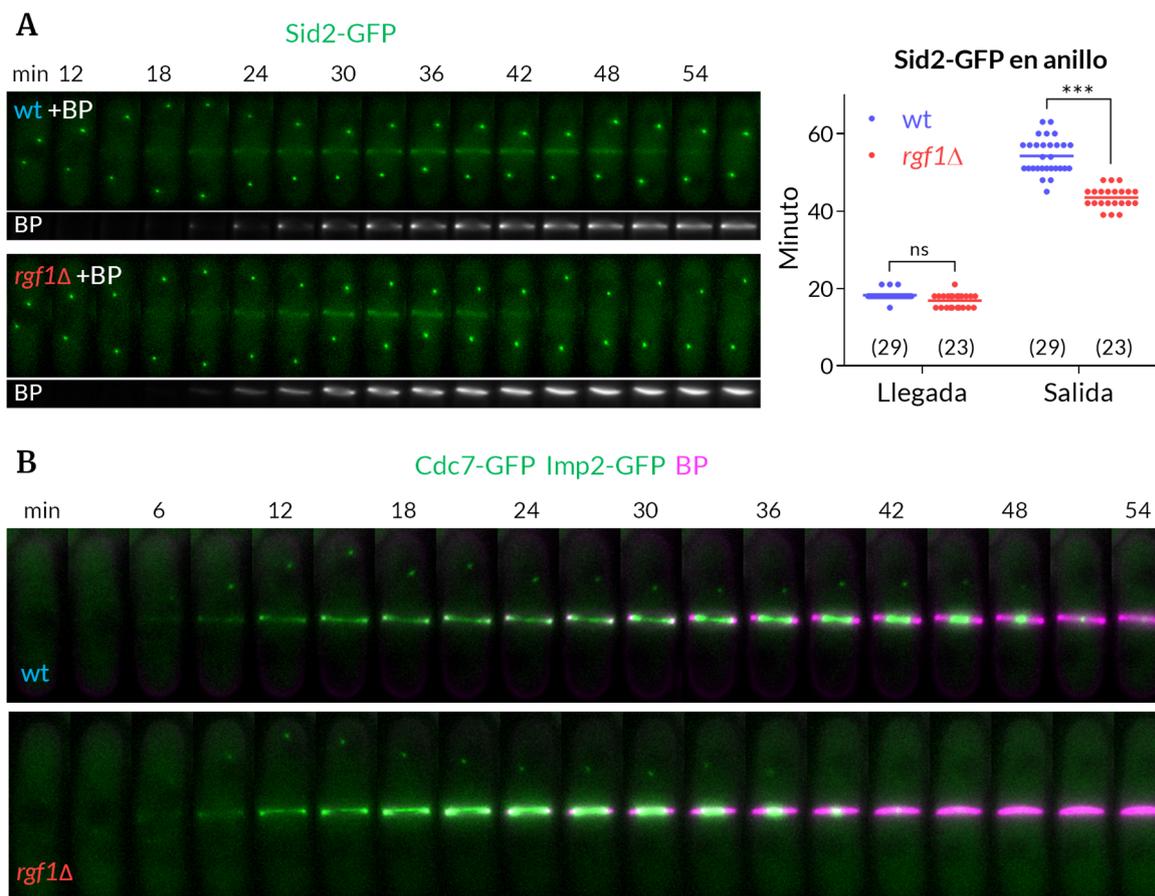


Figura 58 Localización de las kinasas Sid2 y Cdc7 durante el bloqueo por BP. Imágenes representativas de time-lapses de células wt y *rgf1Δ* que expresan Sid2-GFP (A) y Cdc7-GFP, Imp2-GFP (B) en presencia de BP 5 $\mu\text{g/ml}$ capturadas en DeltaVision. (A) Izquierda, se han omitido las imágenes de los primeros 9 minutos que comienzan con la separación de los SPBs. Derecha, tiempo de llegada y salida de Sid2-GFP a la zona del anillo, medido desde la separación de los SPBs. Datos analizados con el test t de Šidák (ns no significativo, *** $p < 0.0001$, (n)).

En células tratadas con BP, *Sid2-GFP* llega a la zona de división en anafase al mismo tiempo en ambas cepas (Figura 58A), mientras *Cdc7-GFP* se polariza rápidamente, acumulándose en el SPB nuevo tanto en la cepa silvestre como en el mutante *rgf1Δ* (Figura 58B). La localización de *Sid2* en el septo y la de *Cdc7* en el nSPB se mantienen hasta el final de la citoquinesis, que es cuando ambos desaparecen. Sin embargo, en presencia de BP *Sid2* tarda más tiempo en desaparecer del septo en la cepa silvestre que en el mutante *rgf1Δ* y lo mismo ocurre con *Cdc7* en el SPB (Figura 58). Esto es coherente con el mayor retraso que presentan los anillos de las células wt con respecto al mutante *rgf1Δ*.

A continuación, caracterizamos el perfil de esta respuesta midiendo la intensidad de *Cdc7-GFP* en ambos SPBs a lo largo de la citoquinesis, en células tratadas con BP con respecto a condiciones normales. En este caso usamos además de *Cdc7-GFP*, el marcador de SPB *Sad1-dsRed* como referencia para delimitar esta estructura. Como ocurría anteriormente, la polarización de *Cdc7* es rápida, cayendo su intensidad en uno de los SPB mientras se incrementa en el otro, y esto ocurre por igual en células con BP como sin él (Figura 59).

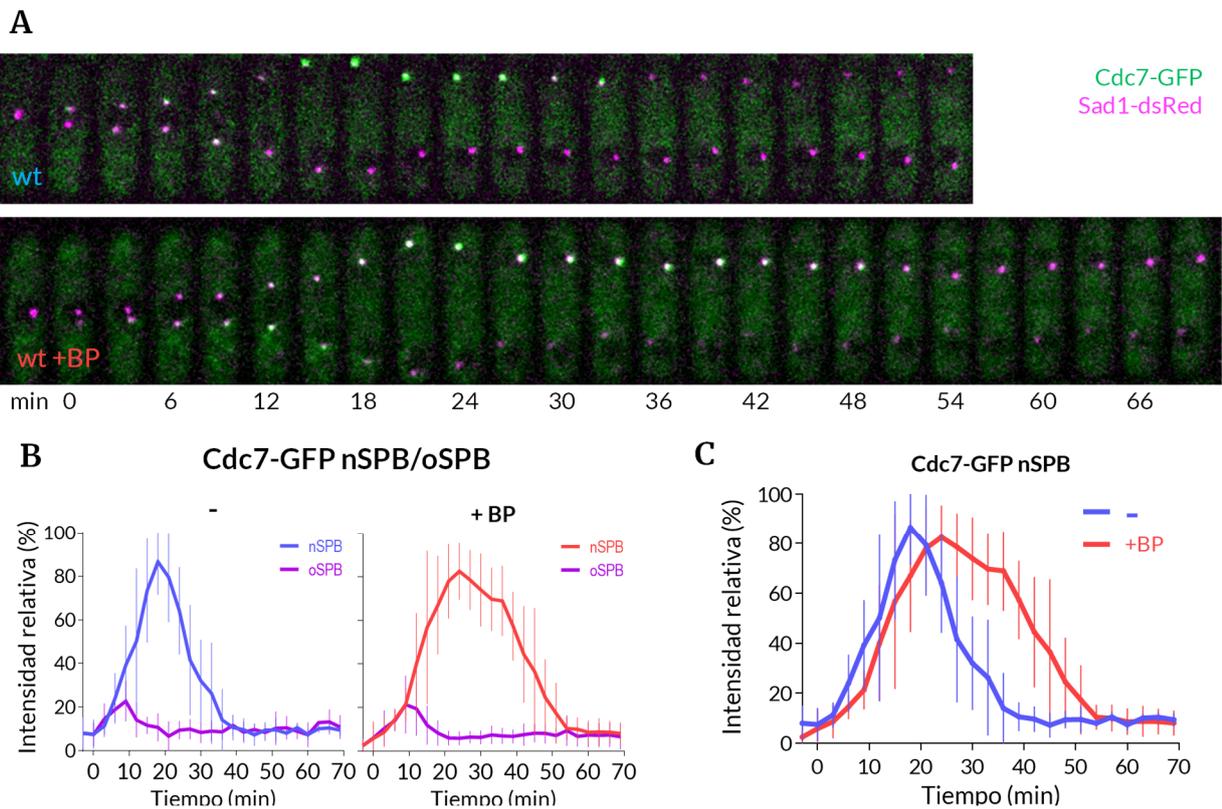


Figura 59 *Cdc7* permanece asociada al nSPB durante el bloqueo por BP. (A) Imágenes de time-lapse representativas obtenidas a partir de células wt que expresan *Cdc7-GFP* y *Sad1-dsRed* en presencia y ausencia de BP 5 µg/ml, capturadas en el Spinning Disk. (B) Medidas de la intensidad de fluorescencia de *Cdc7-GFP* en ambos SPBs a lo largo del tiempo obtenidas a partir de las células de (A) (Media ± SD, n: 12 células). (C) Superposición de las curvas de intensidad de *Cdc7-GFP* en los nSPBs de (B).

En este caso usamos además de **Cdc7-GFP**, el marcador de SPB **Sad1-dsRed** como referencia para delimitar esta estructura. Como ocurría anteriormente, la polarización de **Cdc7** es rápida, cayendo su intensidad en uno de los SPB mientras se incrementa en el otro, y esto ocurre por igual en células con BP como sin él (**Figura 59**).

La segunda mitad de la dinámica sí es diferente. En condiciones normales la intensidad de **Cdc7** crece hasta un pico máximo para caer inmediatamente igual de rápido, mientras que en presencia de BP este pico se transforma en una meseta (**Figura 59**). **Cdc7** se mantiene en su estado de máxima intensidad polarizada durante el bloqueo por BP para posteriormente caer hasta desaparecer.

Hemos visto que durante el tratamiento con BP la localización de **Sid2** y **Cdc7** presenta características de alta actividad SIN. Otra manera de seguir el estado de activación de **Sid2** es a través de la localización de **Clp1**, uno de sus efectores. **Clp1** es liberada del nucleolo al citoplasma en mitosis, donde es retenida de forma dependiente de la fosforilación por **Sid2**, y hacia el final de la citoquinesis vuelve a acumularse en el nucleolo (Chen *et al.* 2008).

Para monitorizar la liberación nuclear de **Clp1** en respuesta al tratamiento con BP utilizamos la cepa **Clp1-GFP** que expresa de manera endógena los marcadores **Imp2-GFP** y **Sid4-GFP**. Con la entrada en mitosis la intensidad de **Clp1** en el núcleo cae drásticamente y los niveles basales no se recuperan hasta que finaliza la constricción del CAR (**Figura 60**). El tratamiento con 5 $\mu\text{g/ml}$ de BP no afecta a la dinámica de liberación nuclear de **Clp1**, sin embargo, la proteína permanece excluida del núcleo mientras dura el bloqueo del CAR (**Figura 60**). En resumen, el BP induce la retención citoplásmica de **Clp1**, a su vez relacionada con la actividad persistente de **Sid2**.

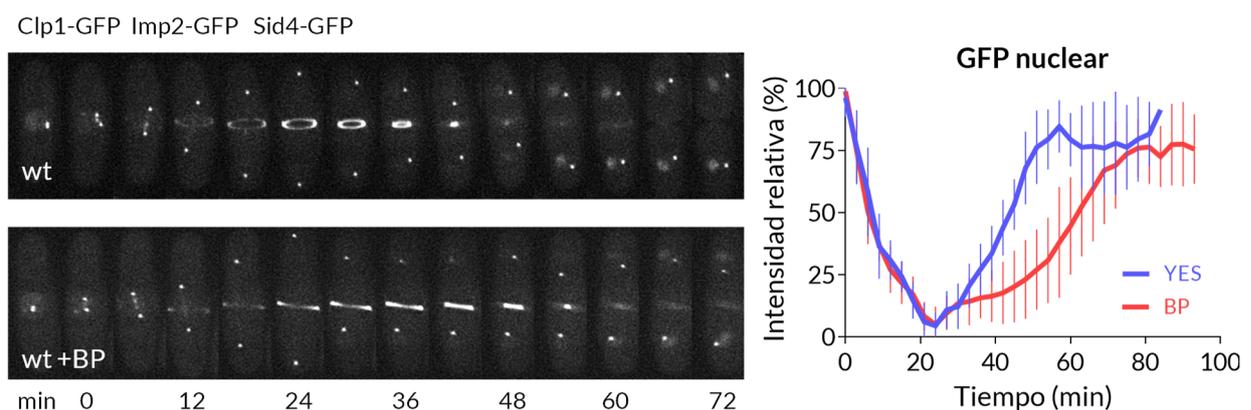


Figura 60 Clp1 permanece excluida del núcleo durante el bloqueo por BP. Imágenes de time-lapse en capturadas en DeltaVision de células wt que expresan Clp1-GFP, Imp2-GFP y Sid2-GFP en presencia y ausencia de BP 5 $\mu\text{g/ml}$. Derecha, intensidad de fluorescencia de la señal de GFP en la región nuclear de dichas células, tomada como un círculo de tamaño constante, a lo largo de la citoquinesis (Media \pm SD, n: 12 células).

Hemos visto que la actividad SIN se mantiene activa durante el bloqueo del CAR inducido por BP. Nos preguntamos si el SIN además de proporcionar estabilidad al anillo (ver [Figura 57](#)), también era responsable del propio retraso de citoquinesis. Examinamos si el BP modificaba la duración de la citoquinesis en el mutante *sid2-250* a 32°C, temperatura semi-restrictiva a la que sí es capaz de formar y contraer anillos. Los anillos de *Imp2-GFP* se formaron y contrajeron a tiempos normales en el mutante *sid2-250* a esta temperatura, tanto en ausencia como en presencia de BP, es decir, no mostraron el retraso característico inducido por la presencia de BP ([Figura 61](#)). Este resultado demuestra que *Sid2* es parte de la señalización que bloquea el CAR durante el estrés producido por BP.

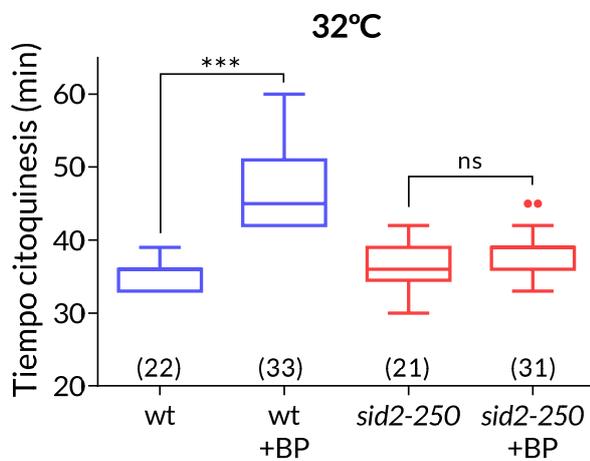


Figura 61 La kinasa Sid2 es necesaria para bloquear la citoquinesis como respuesta al blankophor. Tiempo que tardan en completar la citoquinesis las células de genotipo wt y *sid2-250* que expresan *Imp2-GFP* y *Sid2-GFP* en presencia y ausencia de BP 5 µg/ml a 32°C. Antes de iniciar el time-lapse las células se incubaron 1h a 32°C. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en el Spinning Disk a 32°C y analizados con test de Fisher (ns no significativo, *** $p < 0.0001$, (n)).

En conjunto estos resultados indican que:

- El retraso de la constricción del anillo causado por BP no es consecuencia de una baja actividad SIN, sino que, al contrario, está relacionado con el mantenimiento de la señal.
- *Rgf1* y la ruta CIP participan el mantenimiento de la actividad SIN ante el daño inducido por BP.
- El fin del bloqueo y por tanto el inicio de la constricción del CAR coincide con la caída de la actividad SIN.
- Este mantenimiento de actividad SIN correlaciona con el aumento de la estabilidad del CAR y el bloqueo del inicio de su constricción, siendo *Sid2*, la kinasa final de la ruta, necesaria para ambas respuestas.

A continuación, examinamos si el bloqueo en citoquinesis era dependiente, en lo referente a la ruta SIN, exclusivamente de *Sid2* o si otros integrantes de esta vía también eran necesarios para efectuar la parada. Utilizamos los mutantes termosensibles de las siguientes kinasas del SIN, *Cdc7*, la cual se une a la forma activa de la GTPasa *Spg1* (Sohrmann *et al.* 1998), y *Sid1*, que estaría por análisis de epistasia entre *Cdc7* y *Sid2* (Guertin *et al.* 2000).

A 32°C estos mutantes responden de manera diferente al BP, las células *cdc7-24* (Fankhauser & Simanis 1994) responden con un retraso de la citoquinesis proporcional al de la cepa control, mientras en el mutante *sid1-239* (Guertin *et al.* 2000) dicho retraso es más contenido, lo que sugiere que el bloqueo depende fundamentalmente de *Sid2* o del tramo “final” de la ruta SIN (Figura 62)

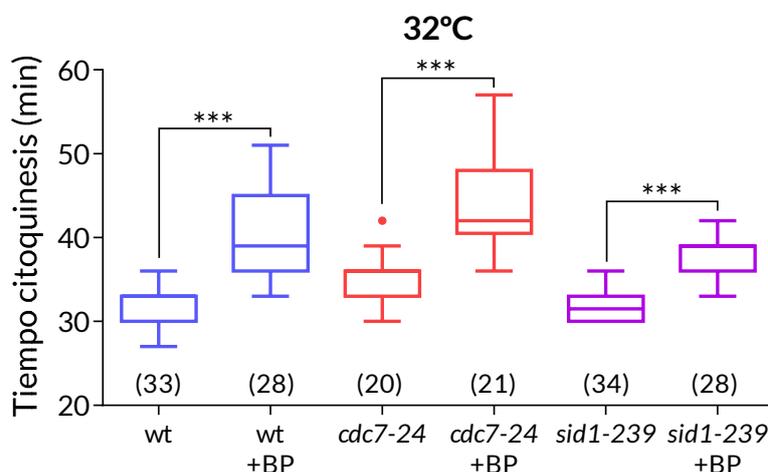


Figura 62 Efecto del bloqueo citoquinético por BP en mutantes de *Cdc7* y *Sid1*. Tiempo que tardan en completar la citoquinesis las células de genotipo wt, *cdc7-24* y *sid1-239* que expresan *Imp2-GFP* y *Sid2-GFP* en presencia y ausencia de BP 5 µg/ml a 32°C. Antes de iniciar el time-lapse las células se incubaron 1h a 32°C. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en el Spinning Disk a 32°C y analizados con test de Šidák (ns no significativo, *** $p < 0.0001$, (n)).

Finalmente, para establecer una relación entre *Pmk1* y *Sid2* quisimos comprobar si, en tanto que *Sid2* es necesaria para el bloqueo y que permanece activa durante este bloqueo, la activación ectópica de la ruta SIN era capaz de reestablecer la parada por BP en el mutante *pmk1Δ*. Empleamos para ello un mutante de *Cdc16*, quien actúa junto con *Byr4* como GAP de *Spg1*, la inactiva y establece la asimetría del SIN (Johnson *et al.* 2012). El mutante *cdc16-116* pierde la asimetría de *Cdc7*, forma septos en interfase y es capaz de mejorar los defectos de septación del mutante *clp1Δ* con *LatA* (Mishra *et al.* 2004).

Al analizar el tiempo que dura la citoquinesis en presencia de BP, vimos que en el doble mutante *cdc16-116 pmk1Δ* no se revierte la ausencia de retraso observada en el mutante *pmk1Δ* (Figura 63A). Este experimento se realizó a 32°C por lo que podría ser que *Cdc16* no estuviera suficientemente inactivado y por consiguiente *Spg1* no actuara como activador ectópico del SIN;

sin embargo, al forzar las condiciones y repetir el experimento a 36°C obtuvimos un resultado muy parecido (Figura 63B).

Otro dato curioso, es que comparado con el retraso en citoquinesis que vemos en la cepa silvestre a 32°C, la respuesta del mutante *cdc16-116* al BP es menor, es decir presenta menos retraso (Figura 63C).

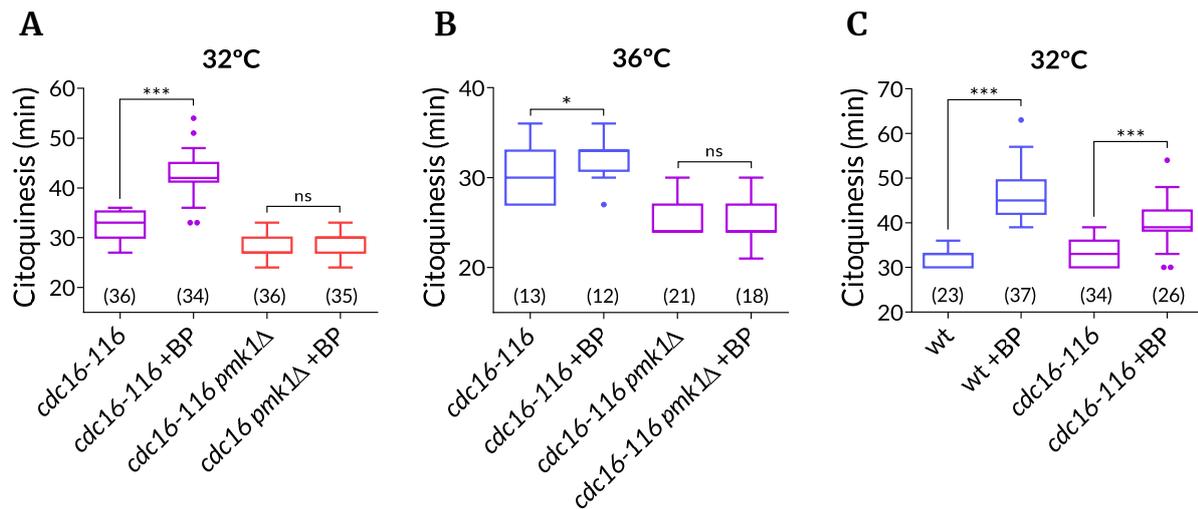


Figura 63 La mutación *cdc16-116* no es suficiente para restaurar el bloqueo en citoquinesis por BP en *pmk1Δ*. Tiempo que tardan en completar la citoquinesis las células de genotipo wt, *cdc16-116* y *cdc116 pmk1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid2-GFP en presencia y ausencia de BP 5 μg/ml a 32°C. Antes de iniciar el time-lapse a 32°C o a 36°C, las células se incubaron 1h a 32°C o a 36°C. Datos cuantificados a partir de time-lapses capturados en Spinning Disk a 32°C y 36°C y analizados con test de Fisher (ns no significativo, * p<0.05, *** p<0.0001, (n)).

Los tiempos mostrados están medidos a partir de los anillos contráctiles mitóticos, pero estos no son los únicos, puesto que en la cepa *cdc16-116* también se forman septos en interfase. Al examinar los anillos interfásicos, descubrimos que estos sufren un bloqueo de la constricción muy fuerte al ser expuestos a BP 5 μg/ml (Figura 64), en clara contraposición con los de la cepa *cdc16-116* sin tratar o los mitóticos de ambas condiciones que sí se contraen (Figura 63C). Además, estos anillos interfásicos bloqueados por BP sí son capaces de contraerse en el doble mutante *cdc16-116 pmk1Δ* (Figura 64).

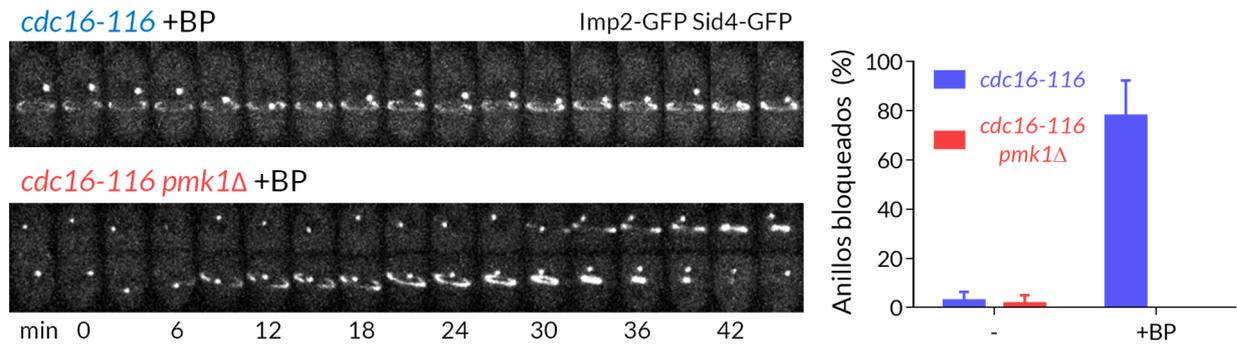


Figura 64 Los anillos interfásicos en el mutante *cdc16-116* no se contraen en presencia de BP, de forma dependiente de *Pmk1*. Imágenes de time-lapse de anillos interfásicos (hay un solo núcleo y SPB por compartimento celular). Las imágenes fueron obtenidas a partir de células *cdc16-116* y *cdc16-116 pmk1Δ* que expresan Imp2-GFP y Sid4-GFP, en presencia de BP 5 $\mu\text{g/ml}$ y capturadas en el Spinning Disk. Antes de iniciar el time-lapse a 36°C, las células se incubaron 1h a 36°C. Derecha, fracción de estas células con anillos que no se contraen en presencia y ausencia de BP 5 $\mu\text{g/ml}$ (Media \pm SD, n: 4 réplicas con > 13 células/réplica).

DISCUSIÓN

Las Rho-GTPasas y sus reguladores GEFs y GAPs controlan una gran variedad de procesos biológicos. Muchos, aunque no todos, implican la regulación del citoesqueleto de actina y la contractilidad de la miosina II. Dentro de estos, uno de los más importantes es la citoquinesis.

En células animales, la GTPasa **RhoA**, activada por el RhoGEF **Ect-2** en la zona del ecuador celular, crea un dominio asociado a la membrana que favorece la polimerización de actina y la activación de miosina II. De hecho, la activación ectópica de **Ect-2** es suficiente para reclutar y activar a **RhoA**, promoviendo la formación de un surco de división incluso en células interfásicas (Wagner & Glotzer 2016). La activación local de Rho-GTPasas en el surco de escisión también activa a forminas en *S. cerevisiae* y *Dictyostelium* (Kühn & Geyer 2014).

En *S. pombe* sabemos que la GTPasa **Rho1** participa en la formación del septo como subunidad reguladora de la actividad β -glucán sintasa (Cortés *et al.* 2016b). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ninguna función relacionada con la polimerización de actina, ni se conoce si tiene un papel en la formación y contracción del anillo de actomiosina en las primeras etapas de la citoquinesis. Uno de los problemas que plantea trabajar con **Rho1** es que resulta esencial para la viabilidad celular. Nosotros hemos marcado la proteína **Rho1** con **sfGFP** en 3 regiones internas diferentes, que según la estructura tridimensional de **RhoA** no forman parte de los dominios importantes (P-loop, Switch 1 y 2), y hemos visto que, aunque las proteínas recombinantes expresaban la **sfGFP** correctamente, no podían sustituir a proteína silvestre. Esto indica que no es fácil disponer de herramientas para estudiar la función de **Rho1**. De hecho, gran parte de lo que sabemos sobre su función se debe al estudio de sus reguladores GEFs y GAPs, que modulan la localización y la actividad de **Rho1** en momentos determinado del ciclo (Edreira *et al.* 2018).

En esta memoria se describe una nueva función de **Rgf1** y de **Rho1** en la respuesta a estrés durante la citoquinesis. Hemos visto que el daño en la pared celular desencadena una respuesta “tipo checkpoint” durante la citoquinesis que promueve un retraso en el inicio de la constricción del CAR. Este retraso depende de **Rgf1** y de **Rho1**, de la ruta de MAP quinasas que controla la integridad celular (CIP) y de la ruta que controla el inicio de la septación (SIN) (**Figura 65**).

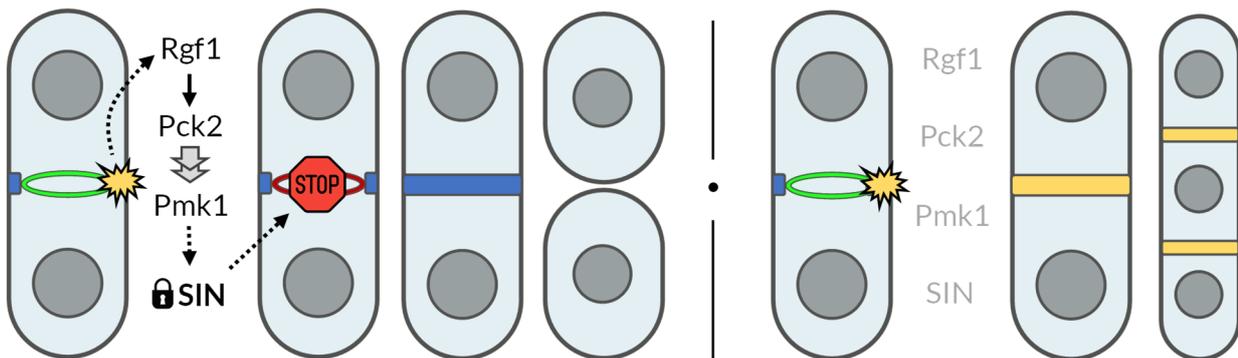


Figura 65 Modelo del retraso de la contracción del CAR frente al estrés en la pared celular. Frente al estrés en la pared se transduce una señal a través de **Rgf1** y **Pmk1** que bloquea la constricción del CAR de forma dependiente del mantenimiento de la actividad **SIN**. En ausencia de esta señalización el anillo se cierra prematuramente y el estrés persistente conduce a la aparición de células encadenadas.

Rgf1 se localiza cerca del CAR e interactúa con sus componentes

Este trabajo comenzó con el objetivo de identificar el papel del Rho-GEF **Rgf1** durante la citoquinesis. Los tres GEFs de **Rho1**, **Rgf1**, **Rgf2** y **Rgf3**, se localizan en el septo, pero solo se conoce la participación de **Rgf3** en este proceso (Tajadura *et al.* 2004; Morrell-Falvey 2005; Mutoh *et al.* 2005).

Nos preguntamos dónde, cómo y cuándo se detecta **Rgf1** durante el proceso de citoquinesis. Mediante experimentos de time-lapse y microscopía de superresolución hemos visto que **Rgf1** desaparece de los polos y se transloca a la región central, en la periferia del anillo, pero no en el propio anillo. Cuando empieza la contracción, **Rgf1** avanza hacia el interior en el borde del septo y va dejando un rastro que se distribuye como una placa de fluorescencia a medida que se cierra el CAR (**Figuras 27 y 28**).

Rgf1 aparece en la fase de maduración del CAR. En esta etapa el anillo mantiene su diámetro máximo, pero no permanece estático puesto que el intercambio de proteínas con el citoplasma es constante; por ejemplo en este intervalo aparecen las proteínas con motivo F-BAR (**Imp2**, **Pxl1**, **Fic1**) (Roberts-Galbraith *et al.* 2009), la miosina **Myp2** (Laplante *et al.* 2015) y la β -glucán sintasa **Bgs1** (Goss *et al.* 2014), entre otras.

Los experimentos de localización nos hicieron pensar que el mutante *rgf1Δ* podría presentar algún defecto en la etapa de invaginación de la membrana acoplada a la síntesis del septo. Sin embargo, en condiciones normales, la actividad de *Rgf1* en citoquinesis es prescindible; el mutante *rgf1Δ* no presenta fenotipos asociados a defectos en la formación o en la contracción del CAR, salvo las interacciones genéticas con componentes del anillo.

El blankophor bloquea temporalmente la citoquinesis y ese retraso depende de *Rgf1*, de *Rho1* y de la ruta de integridad.

Curiosamente empezamos a ver diferencias entre el mutante *rgf1Δ* y la cepa silvestre al teñir las células con calcoflúor/blankophor (BP). En presencia de BP el tiempo necesario para completar la citoquinesis era apreciablemente menor en el mutante *rgf1Δ* que en la cepa silvestre. Al intentar dilucidar la naturaleza de este fenotipo, observamos que la diferencia en la duración de la citoquinesis entre la cepa silvestre y el mutante *rgf1Δ* solo se veía en presencia de BP. Después de realizar múltiples experimentos y con diversos controles nos dimos cuenta de que es el BP el que induce un retraso en la cepa silvestre, y que el mutante *rgf1Δ* es refractario a dicho retraso.

La tinción con BP ha sido ampliamente utilizada para teñir la pared celular de levaduras tanto en *S. cerevisiae* (Roncero & Durán 1985) como en *S. pombe* (Ribas & Cortés 2016); siempre con la idea de que, aunque es un antifúngico, su utilización a baja concentración no interfiere con el crecimiento celular. Sin embargo, nosotros hemos visto que una concentración de BP igual o superior a 2.5 µg/ml, interfiere con la citoquinesis, induciendo un bloqueo transitorio de la misma.

Este retraso depende de la concentración de BP en el medio y se observa al monitorizar la mitosis/citoquinesis con diferentes combinaciones de marcadores fluorescentes. El retraso también aparece de forma independiente de la temperatura, tanto a 28°C como a 36°C, y en varios medios de cultivo, YES y MM. Estas evidencias aportan robustez a este efecto frente a las variaciones experimentales. Además, hemos comprobado que no depende de las propiedades fluorescentes del blankophor, pues sigue apareciendo aun sin excitación del compuesto.

Desde el principio sabíamos que el retraso inducido por BP depende de la presencia de *Rgf1* (ya que no ocurre en mutante *rgf1Δ*) pero poco a poco hemos ido caracterizando otras proteínas implicadas. Sabemos que el retraso depende de *Rho1* puesto que en el mutante *rho1-596* (Viana et al. 2013), este retraso es prácticamente inapreciable, y de la actividad GEF de *Rgf1*, puesto que el mutante *rgf1-PTTR*, mutado en el dominio catalítico, se comporta como el mutante nulo *rgf1Δ*.

También hemos visto que está implicada la ruta de MAPK de *Pmk1* o ruta de integridad, mientras que la ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK) aparentemente no interviene en el retraso. La ruta CIP está ramificada en el tramo superior y hemos visto que la respuesta al BP se

transmite a través de la vía **Rgf1-Rho1-Pck2-Pmk1**. Ni la GTPasa **Rho2** ni la proteína **Pck1**, que son también activadores de esta ruta, median en esta respuesta. Nos sorprendió que el mutante **rho2Δ** se comportara como la cepa silvestre en presencia BP, pues la activación de **Pmk1** frente a BP en un mutante **rho2Δ** se reduce a la mitad (Barba *et al.* 2008). Esto también ocurre en el mutante **pck2Δ** (Barba *et al.* 2008), en el que sí vemos diferencias. También sabemos que **Pck2** participa en la síntesis de β -glucano y de α -glucano, mientras que **Rho2** está relacionado exclusivamente con la síntesis de α -glucano (Calonge *et al.* 2000). Es muy probable que el efecto del BP se produzca a través del β -glucano y no del α -glucano (Cortés *et al.* 2007).

El BP retrasa el inicio de la constricción del CAR en la cepa silvestre.

Hemos visto que en la cepa silvestre el retraso producido por BP es específico de la fase de maduración. Esta es la etapa que se alarga, aproximadamente 15 minutos de media, mientras que tanto el tiempo que dura la formación como el de la constricción del CAR permanecen inalterados (Figura 41). El retraso en la fase de maduración prácticamente desaparece en los mutantes **rgf1Δ** y **pmk1Δ**, lo que indica de nuevo que **Rgf1** y **Pmk1** están implicados en la propagación de este efecto. La fase de maduración viene definida a nivel experimental por el final de la formación (en la que no hemos observado cambios) y el inicio de la constricción del CAR. A continuación, se exponen algunas de las razones por las que creemos que el BP retrasa el comienzo de la constricción y no los procesos de remodelación del anillo de la fase madurativa:

- Hemos visto que cada uno de los marcadores analizados (**Imp2**, **Myp2**, **Cdc7** y **Sid2**) aparece al mismo tiempo y en el mismo sitio en las células tratadas con o sin BP.
- Al mismo tiempo, el inicio de la septación tampoco está alterado, indicando que existe una actividad β GS competente.
- La constricción del CAR se mantiene bloqueada y, una vez iniciada, progresa sin alteraciones de velocidad.
- Los mutantes **rgf1Δ** y **pmk1Δ** no bloquean la constricción ni la ralentizan, lo que señala más hacia una respuesta activa de parada que a la ausencia de componentes esenciales para iniciar el cierre del CAR.

El bloqueo por BP retrasa la constricción del CAR, pero no el inicio de la septación, entendiendo por septación el comienzo y progresión de la síntesis del septo en la periferia celular, al margen de su invaginación. Hemos medido la incorporación de BP en el septo periférico durante el bloqueo y hemos visto que va aumentando con el tiempo hasta que comienza la constricción del CAR (Figura 40). Que la parada se produzca después del inicio de la síntesis del septo tiene sentido si entendemos que el BP estaría produciendo el daño

(desorganización de la pared) al ser incorporado en el propio septo, por lo que no podría disparar la respuesta hasta que comience su síntesis. Lo que nos parece más extraño es que la síntesis del septo prosiga durante el bloqueo, provocando la “acumulación” de septo en la periferia, aunque no vaya acompañada de ingresión/invaginación.

Según estos datos la actividad de **Bgs1** no estaría bloqueada en tanto que el BP se une de forma específica al $\beta(1,3)$ -D-glucano lineal, de cuya síntesis es responsable **Bgs1** (Cortés *et al.* 2007). Tampoco estaría bloqueada la actividad de **Bgs4**. El mutante *cwg1-1* (*bgs4*) presenta un retraso en citoquinesis a la temperatura restrictiva, pero curiosamente en estas condiciones la síntesis del septo en la periferia no se para (Muñoz *et al.* 2013). **Bgs4** llega con la constricción del CAR (Cortés *et al.* 2018) y nosotros hemos visto que el retraso citoquinético de este mutante es revertido en ausencia de **Pmk1**, lo que hace improbable que sea esta proteína la que se vea frenada por la parada. Sería interesante de todos modos comprobar si el mutante *cwg1-1*, responde al tratamiento con BP y saber cómo se localiza **Bgs4** durante el bloqueo en la cepa silvestre.

Estos hechos, junto a la estabilización del CAR (medido por la resistencia a la LatA que propicia la presencia de BP), favorecen la idea de que el origen del bloqueo está en la parada del CAR y no del septo. Tendríamos una actividad β GS competente que se vería constreñida por el bloqueo del avance del anillo. Aunque el septo origine la fuerza para la invaginación del surco, nuestro modelo de bloqueo de constricción por el CAR está en concordancia con las propuestas de una síntesis del septo mecanosensible (Chang 2017; O’Shaughnessy & Thiyagarajan 2018; Pollard & O’Shaughnessy 2019).

Pmk1 integra las señales de diferentes tipos de estrés que afectan a la pared celular y retrasan la citoquinesis

Hemos visto que agentes como la caspofungina, la cafeína y el KCl producen un retraso en la citoquinesis similar al del BP, y que este retraso también depende de **Pmk1**. Estas sustancias provocan daños en la pared celular y/o cambios en el medio a los que la pared celular tiene que adaptarse. Por otra parte, el retraso en citoquinesis que presenta el mutante *cwg1-1*, también es suprimido parcialmente al delecionar a **Pmk1**. En este caso el daño en la pared celular es consecuencia de una actividad β GS defectuosa que termina con la “lisis explosiva” durante la separación celular (Muñoz *et al.* 2013). Estos datos apoyan la existencia de una respuesta tipo “checkpoint” que se activa en presencia de distintos tipos de estrés que afectan a la pared celular y que es capaz de retrasar la constricción del CAR.

Rgf1, **Rho1** y **Pck2** participan en la transducción de la señal inducida por BP en la pared celular hasta **Pmk1**. Sin embargo, en los otros compuestos como la caspofungina o la cafeína, la participación de **Rgf1** no está tan clara. El mutante *rgf1 Δ* , presenta una respuesta intermedia que

podría indicar que la transducción de la señal va a la vez a través de otros activadores. Resulta particularmente rara la situación con KCl. La respuesta de bloqueo frente a este compuesto no depende de *Rgf1* pero sí de *Pmk1*; sin embargo, la activación (fosforilación) de *Pmk1* frente a KCl se ve totalmente abolida al deletar a *Rgf1* (García *et al.* 2009b), algo que también sucede en el mutante *rho2Δ* (Barba *et al.* 2008). Tal vez se trate de respuestas no equivalentes, una rápida que se daría de forma generalizada en el cultivo frente a dosis altas de KCl (0.6 M) (Barba *et al.* 2008; García *et al.* 2009b), y otra, la que vemos nosotros, frente a cambios menores en la presión de turgencia (0.2 M KCl). De hecho, a esta concentración no detectamos cambios en el volumen celular o aberraciones en la integridad del anillo, algo que sí sucede a altas dosis de KCl (Okada *et al.* 2019).

El BP y los compuestos que producen estrés en la pared celular provocan la acumulación de gran cantidad de células multiseptadas o encadenadas en el mutante *pmk1Δ*, pero no en la cepa silvestre (Figura 50). Este fenotipo es el resultado de un fallo en la etapa final de separación celular y sugiere que, si el estrés en la pared celular se produce durante la citoquinesis, la ruta CIP se encarga de retrasar el inicio de la constricción, lo que permitiría ganar tiempo para que se activen los programas de reparación. Al mismo tiempo, *Pmk1* también induce la expresión de genes de respuesta a estrés, algunos de los cuales podrían servir para corregir la pared dañada y reiniciar la citoquinesis incluso en condiciones de estrés (Chen *et al.* 2003; Takada *et al.* 2007).

¿Qué está sucediendo durante la parada de constricción? No existe una explicación satisfactoria para el fenotipo de células encadenadas y septos engrosados observado en el mutante *pmk1Δ* (Toda *et al.* 1996; Zaitsevskaya-Carter & Cooper 1997). Se ha propuesto que *Pmk1* podría participar en la regulación negativa de la formación del septo, a través de la interacción con componentes de la ruta SIN y las glucán sintetasas, o que pudiera regular a las glucanasas (Madrid *et al.* 2006). Además, la delección de *Pmk1* suprime el fenotipo de multiseptación del mutante *cdc4-8* (cadena ligera de la miosina II), de forma dependiente de *Nrd1*, aunque no suprime el mismo fenotipo en los mutantes *myo2-E1* y *myp2Δ*, ni la actividad de *Pmk1* correlaciona con la abundancia del mRNA de *Cdc4* (Sato *et al.* 2009).

A continuación, planteamos algunas ideas sobre lo que podría o no podría estar ocurriendo durante el bloqueo de la constricción en relación con nuestros datos:

- Eliminar la droga del septo para que no interfiera con la estructura. Esta idea parece improbable pues la síntesis del septo no se ve detenida durante el bloqueo, y en lo que dura el bloqueo más compuesto está siendo incorporado; por tanto, el bloqueo resultaría contraproducente, cuando no es el caso.
- Reforzar el septo. Este supuesto se basa en los datos de fluorescencia de BP, y con ello de septo, en la periferia, que son más elevados en las células paradas que en aquellas sin parar. Resultaría coherente tal vez si habláramos de defectos que terminan en la lisis

celular por la región del septo, pero nos encontramos ante el caso contrario, septos que no se disuelven.

- Remodelar el septo periférico. Si estos compuestos interfieren con la conformación del glucano del septo, esto podría hacer que este fuera menos accesible a la actividad hidrolítica de las glucanasas (Martín-Cuadrado *et al.* 2008). Este periodo de bloqueo podría permitir una remodelación o síntesis *de novo* de cadenas de glucano correctas, o destrucción de las que son anómalas. Además, se ha visto que **Pmk1**, junto a **Rgf1** y **Wsc1**, participan en la homeostasis del grosor de la pared (Davì *et al.* 2018). Esto podría contribuir al control de la estructura del septo para asegurar una posterior separación efectiva.
- Adaptar las condiciones internas. Las células podrían modificar, por ejemplo, su presión de turgencia para adaptarse al estrés antes de iniciar la constricción, algo que se ha visto influye en la velocidad de este proceso (Proctor *et al.* 2012), que sería necesario para la separación celular (Atilgan *et al.* 2015) y que podría relacionarse con fenotipos de multiseptación (Morris *et al.* 2019). Este podría ser el caso para los compuestos probados que reducen la velocidad de constricción, pero parece poco probable en el caso del BP, pues la constricción progresa a la misma velocidad.
- Incrementar la expresión de las glucanasas o regular su transporte.

El estrés de la pared celular controla la contracción de CAR a través de la señalización del SIN

Hasta ahora hemos visto que **Pmk1** bloquea la contracción del CAR en respuesta al estrés en la pared celular. Pero otra cuestión es ¿cómo se lleva a cabo este bloqueo? En el proceso podrían participar proteínas que son componentes físicos del anillo o bien proteínas reguladoras que pueden conectar distintas vías entre sí (Cheffings *et al.* 2016; Pollard 2017).

Nuestra idea ha sido mirar si el bloqueo producido por BP se dejaba de dar en los mutantes de actina **adf1-1** y **cdc12-112**, además de en los de miosinas **rlc1Δ** y **myp2Δ**. En todos los mutantes analizados se producía el retraso siempre mayor que el del propio mutante en ausencia de BP. Sin embargo, sí obtuvimos un resultado positivo al analizar el efecto del BP en un mutante de **Sid2**. Este mutante no presenta el retraso típico producido por el BP, lo cual sugiere que la vía CIP podría actuar promoviendo el mantenimiento de la actividad de SIN.

Otro dato que apoya esta idea es que el bloqueo de la constricción producido por el estrés de la pared se correlaciona con una señal SIN prolongada, donde **Cdc7** permanece en el nuevo SPB durante más tiempo y el tiempo de retención citoplásmico para **Clp1** es más largo. Es cierto

que tanto la activación inicial del SIN cómo su desactivación una vez comenzada la constricción se dan por igual al margen del bloqueo, lo que no aclara si el mantenimiento de la señal del SIN es el origen o solo una consecuencia de la parada. Sin embargo, también hemos visto que *Sid2* es el componente crucial en dicha respuesta, pues en un mutante *sid2-250* desaparecen tanto el bloqueo de la constricción (Figura 61), como la estabilización del CAR (Figura 57). Creemos pues que el mantenimiento de la alta actividad SIN es la causa y no la consecuencia del bloqueo de la septación y del retraso en la constricción del anillo.

Las implicaciones de la ruta SIN durante la septación no han sido del todo esclarecidas, debido en parte a la falta de conocimiento sobre los sustratos de esta vía que participan en la formación del septo. La sobreactivación de la ruta por el mutante *cdc16-116* puede inducir la septación incluso en interfase (Cerutti & Simanis 1999; Hachet & Simanis 2008). Sin embargo la ruta SIN no parece ser necesaria para iniciar la formación del anillo (Wu *et al.* 2003); hasta en las condiciones más restrictivas los mutantes *sid2-250* y *spg1-B8* comienzan a ensamblar un anillo, aunque este se disuelve antes de contraer (Hachet & Simanis 2008). Se había descrito que el pico de actividad SIN coincide con el inicio de la constricción del anillo, pero sin establecer una relación de causalidad (Dey & Pollard 2018). Los trabajos sobre el checkpoint de citoquinesis ya habían señalado que la actividad SIN es necesaria para estabilizar el CAR frente a sus agresiones (Trautmann *et al.* 2001; Mishra *et al.* 2004), pero no hacían mención a la progresión del anillo. Nosotros describimos aquí una nueva función de la ruta SIN cómo inhibidor del inicio de la constricción del CAR en presencia de estrés en la pared celular.

De acuerdo a nuestros resultados con el bloqueo, el pico de actividad del SIN no se da con la constricción del CAR; sube como en condiciones normales, pero se mantiene en su estado máximo hasta que empieza a caer justo en el momento en que se inicia la constricción (Figuras 59 y 60). Proponemos que la alta actividad SIN está realmente inhibiendo la constricción del CAR, probablemente a través de la estabilización de este, y que sería el descenso de esta actividad lo que liberaría al anillo del bloqueo y señalaría el inicio de la constricción.

En el trabajo de (Dey & Pollard 2018) no encuentran que la sobreactivación del SIN con el mutante *cdc16-116* modifique los tiempos de las tres etapas del CAR, sin embargo, en esas condiciones se pierde la polaridad de *Cdc7* en los SPBs. Como indican estos autores, el número total de moléculas de esta kinasa se reparte por igual en albos SPBs, lo que equivale a decir que habría la mitad de *Cdc7* activo en el nSPB. Esta puede ser la razón de que este mutante *cdc16-116* se comporte de forma similar a uno de pérdida de función con respecto al bloqueo por BP cuando hay anillos mitóticos (2 SPBs), mientras que responde con un bloqueo excesivo de los anillos interfásicos (1 SPB) (Figura 64).

Si el bloqueo por BP es dependiente del SIN, no lo es de la fosfatasa *Clp1*, y por tanto descartamos que se trate del mismo checkpoint que el de citoquinesis. A pesar de que *Clp1* es

retenida en el citoplasma durante el bloqueo de la constricción, éste puede darse por igual aun en la delección de la fosfatasa. Por esto y porque no vemos relación de *Pmk1* con el mutante *cps1-191*, creemos que el checkpoint de septación que hemos descrito respondería a agresiones del septo y no del anillo como lo hace el de *Clp1*. La retención citoplásmica de *Clp1* se debería a la alta actividad SIN que origina la parada. Igual que ocurre con el checkpoint de citoquinesis, en el bloqueo por BP se da una estabilización del CAR, que podría ser lo que frene su constricción; sería interesante repetir el experimento en el que vemos que el BP confiere resistencia de los anillos a LatA en fondos mutantes *clp1Δ* para ver únicamente los efectos de la vía que estudiamos.

Otra cuestión que arroja el mantenimiento del SIN y la similitud con el checkpoint de citoquinesis es si el bloqueo, además de en el CAR, se da también a nivel del ciclo celular. El checkpoint de *Clp1* detiene el ciclo en G₂; es de suponer que frente a las agresiones que describimos también se dé una parada similar en tanto que igualmente interviene *Sid2*. A falta de un examen de este posible bloqueo, otros datos que apoyan esta hipótesis son: que las células bloqueadas detienen completamente su crecimiento, que no hayamos visto en ningún caso situaciones de múltiples núcleos, ni en bloqueos prolongados ni en las células encadenadas del mutante *pmk1Δ*, y que de darse dicha parada de ciclo esta dependería de *Sid2*, pues las células *sid2-250* a temperatura restrictiva se vuelven multinucleadas aun en presencia de BP.

Desconocemos el mecanismo por el que la ruta SIN estaría bloqueando la constricción del CAR. Los resultados de estabilización del anillo y la resistencia frente a LatA sugieren un papel relacionado con la dinámica de la actina (Mendes Pinto *et al.* 2012; O'Shaughnessy & Thiyagarajan 2018; Cheffings *et al.* 2019). Como ya se ha comentado antes, hemos visto que en los mutantes de actina *adf1-1* y *cdc12-112* y de miosinas *rlc1Δ* y *myp2Δ* se produce el bloqueo en presencia de BP. Podríamos continuar la búsqueda de las proteínas responsables de la parada a partir de otros genes en los que se ha descrito un fenotipo de retraso en el inicio de la constricción del CAR (Pombase, FYPO:0004653): *acp2⁺*, *arp3⁺*, *arti⁺*, *blt1⁺*, *cyk3⁺*, *myo1⁺*, *myo2⁺*, *sbg1⁺*, *wsp1⁺*; además de los reguladores *gef1⁺* y *rga7⁺*.

Finalmente es interesante destacar que además del papel de *RhoA* (ortólogo de *Rho1*) como activador de las forminas, *RhoA* es un regulador negativo de la ruta HIPPO (ortóloga en mamíferos a la ruta SIN de *S.pombe* y a la ruta MEN de *S.cerevisiae*) (Plouffe *et al.* 2016). Se ha visto por primera vez que cuando se elimina *RhoA*, la quinasa final de la ruta *LATS1/2* (ortóloga de *Sid2*) y el factor de transcripción por debajo de esta, *YAP/TAZ*, permanecen altamente fosforilados. En ausencia de suero la ruta Hippo se activa y *YAP/TAZ* es fosforilado y secuestrado en el citoplasma. Esto último también ocurre al eliminar *RhoA*, que el factor de transcripción se queda en el citoplasma y es inactivo transcripcionalmente incluso en presencia de suero (Plouffe *et al.* 2016).

Nuestro trabajo en *S. pombe* presenta ciertas similitudes con el papel de **RhoA** en la ruta Hippo. **Rho1** y la ruta CIP controlan el SIN en presencia de estrés, lo que retrasa la constricción del anillo y da tiempo a que se induzcan los programas de adaptación. Comprender la relación entre **Rho1** y la ruta SIN en levaduras es un paso importante y sería muy útil para comprender la interacción entre **RhoA** y la ruta Hippo en mamíferos.

CONCLUSIONES

1. El estrés en la pared celular desencadena una respuesta de “tipo checkpoint” que retrasa el inicio de la constricción del CAR.
2. Este retraso depende de la GTPasa **Rho1**, su GEF **Rgf1**, la cascada de integridad celular CIP y la ruta de inicio de septación SIN.
3. **Rgf1** se localiza en la membrana muy cerca del CAR en citoquinesis y llega cuando el CAR está ya formado, durante la etapa madurativa antes de la septación.
4. En condiciones de estrés en la pared celular las células que carecen de la MAPK **Pmk1** no responden con el bloqueo del CAR y septan de forma prematura, mostrando un fenotipo de células encadenadas.
5. **Sid2** participa en la estabilización y el bloqueo de la constricción del CAR independientemente de **Clp1**.

6

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE *Schizosaccharomyces pombe*

Este trabajo se ha realizado enteramente con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Las cepas empleadas están recogidas en la siguiente tabla, donde se detalla su genotipo y procedencia.

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN
PG40	<i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>his3D1</i> , <i>ura4D18</i> , <i>ade6M210</i> , <i>h-</i>	Colección YSM
YS5261	<i>rgf1-EnvyGFP:leu1+</i> , <i>sid4-mcherry:hph</i> , <i>rlc1-tdTomato:nat</i> , <i>rgf1::kanMX6</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
TE149	<i>sid2-250</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>rgf1::nat</i> , <i>h-</i>	Este trabajo
NG241	<i>cdc15-140</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>h-</i>	Colección YSM
NG319	<i>cdc3-6</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>h+</i>	Colección YSM
TE301	<i>cdc11-119</i> , <i>rgf1::nat</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>h-</i>	Este trabajo
TE519	<i>cdc15-140</i> , <i>rlc1-tdTomato:nat</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>leu1-32</i> , <i>his3D1</i>	Este trabajo
TE348	<i>cdc11-119</i> , <i>rgf1::kanMX6</i> , <i>rlc1-tdTomato:nat</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i>	Este trabajo
SM213	<i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i> , <i>h+</i>	Colección YSM
SM341	<i>rgf1::nat</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i> , <i>h+</i>	Colección YSM

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN
YS864	<i>cdc4-8, leu1-32, h+</i>	Nurse P.
TE377	<i>cdc4-8, rgf1::kanMX6, leu1-32, h+</i>	Este trabajo
YS862	<i>rlc1::kanMX6, ura4D18, leu1-32, ade6M210, h-</i>	Simanis V.
TE389	<i>rgf1::nat, rlc1::kanMX6, ura4D18, leu1-32, ade6M210, h+</i>	Este trabajo
YS586	<i>cdc15-140, leu1-32, h-</i>	Valdivieso M.H.
NG203	<i>cdc15-140, rgf1::kanMX6</i>	Colección YSM
TE264	<i>imp2::ura4+, leu1-32, ura4D18, ade6M210, h+</i>	Sazer S.
TE454	<i>rgf1::nat, imp2::ura4+, leu1-32</i>	Este trabajo
YS865	<i>cdc12-112, ura4D18, h+</i>	Nurse P.
TE251	<i>cdc12-112, rgf1::nat, h-</i>	Este trabajo
SM440	<i>nda3-KM311, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, rgf1::nat, leu1-32, h+</i>	Colección YSM
TE558	<i>mid2::ura4+, rgf1::nat, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, ura4D18,</i>	Este trabajo
TE249	<i>leu1::GFP-atb2:ura4+, rlc1-tdTomato:nat, leu1-32, ura4D18, his3D1, h+</i>	Cortés J.C.G.
TE257	<i>rgf1::kanMX6, leu1::GFP-atb2:ura4+, rlc1-tdTomato:natMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
TE478	<i>imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, ura4D18, leu1-32, h-</i>	Este trabajo
TE495	<i>rgf1::nat, imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, ura4D18, leu1-32, h-</i>	Este trabajo
TE399	<i>mEGFP-myo2:kanMX6, sid4-mCherry:hph, leu1-32, ura4D18, h+</i>	Este trabajo
TE566	<i>myp2-GFP:kanMX6, sfi1-GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
RC34	<i>leu1-32::rgf1-PTTR-GFP:leu1+, rlc1-tdTomato:nat, sid4-mCherry:hph, rgf1::kanMX6, leu1-32</i>	Este trabajo
TE470	<i>LactC2-GFP:nat, sad1-GFP:kanMX6, leu1-32, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
TE472	<i>rgf1::nat, LactC2-GFP:nat, sad1-GFP:kanMX6, leu1-32, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
TE402	<i>rgf1::nat, mEGFP-myo2:kanMX6, sid4-mCherry:hph, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
TE580	<i>rho1-596:nat, imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN
TE549	<i>sty1::ura4+</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE491	<i>pmk1::ura4+</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>h-</i>	Este trabajo
TE585	<i>pmk1::ura4+</i> , <i>mEGFP-myo2:kanMX6</i> , <i>sid4-mcherry:hph</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
TE418	<i>rho2::natMX6</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE493	<i>pck1::kanMX6</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE500	<i>pck2::kanMX6</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE551	<i>pmk1::kanMX6</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i> , <i>ade6M210</i> , <i>h-</i>	Perez P.
TE541	<i>pmk1::ura4+</i> , <i>hht1-RFP:kanMX6</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
TE562	<i>cwg1-1</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE564	<i>cwg1-1</i> , <i>pmk1::ura4+</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE552	<i>myp2::ura4+</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE615	<i>rlc1::kanMX6</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
YS5154	<i>adfi-1</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE592	<i>cdc12-112</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
TE507	<i>clp1::kanMX6</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>leu1-32</i> , <i>h-</i>	Este trabajo
TE505	<i>cps1-191</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i> , <i>h+</i>	Este trabajo
TE525	<i>cps1-191</i> , <i>pmk1::ura4+</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>leu1:sid4-GFP</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
EM352	<i>pact1-LifeAct-GFP:leu1</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i> , <i>h-</i>	Balasubramanian M. K.
RC8	<i>sid2-250</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>sfi1-GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
YS826	<i>sid2-GFP:ura4+</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6M210</i> , <i>ura4D18</i> , <i>h+</i>	Simanis V.
TE427	<i>rgf1::nat</i> , <i>sid2-GFP:ura4+</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6M210</i> , <i>ura4D18</i> , <i>h+</i>	Este trabajo
TE413	<i>cdc7-GFP:ura4+</i> , <i>imp2-GFP:kanMX6</i> , <i>h+</i>	Este trabajo

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN
TE414	<i>rgf1::nat, cdc7-GFP:ura4+, imp2-GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
TE513	<i>cdc7-GFP:ura4+, sad1-dsRed:nat, ura4D18, h+</i>	Este trabajo
TE527	<i>clp1-GFP:kanMX6, imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, h+</i>	Este trabajo
TE484	<i>imp2-GFP:kanMX6, sfi1-GFP:kanMX6, ura4D18, leu1-32, h-</i>	Este trabajo
TE613	<i>cdc7-24, imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, leu1-32</i>	Este trabajo
TE611	<i>sid1-239, imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, leu1-32</i>	Este trabajo
TE597	<i>cdc16-116, imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
TE598	<i>cdc16-116, pmk1::ura4+, imp2-GFP:kanMX6, leu1:sid4-GFP, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo

Tabla 4 Estirpes utilizadas en este trabajo

MÉTODOS GENÉTICOS

Para la construcción de dobles mutantes, o la introducción en determinadas cepas de proteínas integradas en el genoma marcadas con algún epítipo o proteína fluorescente, se realizaron cruces genéticos entre las cepas parentales correspondientes. Se analizaron las colonias resultantes y se seleccionaron los clones que portaban las mutaciones de interés, los marcadores, epítipos, así como las auxotrofías y el tipo sexual adecuado.

Conjugación

Los experimentos de conjugación se realizaron utilizando estirpes heterotálicas de distinto sexo (h+ y h-). Para inducir los cruces las cepas se sembraron en placas de YES hasta alcanzar la fase estacionaria (48 horas). A continuación, se recogieron aproximadamente el mismo número de células de la estirpe h+ y h- y se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (20 µl). La mezcla se extendió en una placa de medio MEA. Los cigotos se forman al cabo de entre 12 y 20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 2 días de incubación a 28°C.

Aislamiento de ascosporas al azar

Para liberar las esporas se hicieron suspensiones en agua estéril de las mezclas de conjugación incubadas durante 2 días a 28°C en placas de MEA, y se trataron con 1 µl de β-glucuronidasa arilsulfatasa (Roche) durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Este tratamiento destruye la pared celular de las células vegetativas y las ascas, sin afectar a las ascosporas, que poseen una pared más resistente.

Se realizaron las diluciones apropiadas para obtener entre 100 y 1000 esporas por placa y se extendieron en placas de YES. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C o 28°C. Mediante réplica en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado, que posteriormente se comprobaron por PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneCycler (Bio-Rad). Dependiendo de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos empleados y del tamaño del producto esperado se realizaron modificaciones sobre el siguiente protocolo estándar de reacción:

- Desnaturalización inicial: 3 minutos a 98°C
- 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 segundos a 95°C
 - Anillamiento: 45 segundos a 55°C
 - Extensión: 1-3 minutos a 72°C
- Extensión final: 5 minutos a 72°C

Las mezclas de reacción están compuestas por una mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, cada uno a una concentración final de 200 µM), los dos oligonucleótidos (1 µM cada uno), MgCl₂ 3 mM, Taq-polimerasa (BIOTAQ, Ecogen) 0.2 u/µl y el tampón de reacción suministrado con la enzima. Sobre esta mezcla se resuspendieron fracciones pequeñas de colonias de las cepas a analizar, para emplear a modo de DNA molde. Los oligonucleótidos empleados (suministrados por SIGMA o Life Technologies) se recogen en la tabla mostrada a continuación.

GEN	SECUENCIA	NOMBRE
<i>rgf1</i> ⁺	CAAGGGTATGTGGTCTGG	Rom2-3'ext
<i>pmk1</i> ⁺	TTCTGTCTGAACGAGAGCCAC	Pmk1 5'ext F
<i>pck2</i> ⁺	CGTACCCGCGATTATTGACG	Pck2 5'ext F
<i>rho2</i> ⁺	CTGCATACGACGCTCAGCTA	Rho2 5'ext F2
<i>rlc1</i> ⁺	GACTGTACGGAAGTGTGTAGGA	Rlc1 5'ext F
<i>clp1</i> ⁺	GTATTCAGAGGCGGCGTGTT	Clp1 5'ext F
<i>myp2</i> ⁺	AAAGCCAGCACGGTACTTCG	Myp2 5'ext F
<i>NatMX6</i>	TGAAGGACCCATCCAGTGCCT	Nat2
<i>NatMX6</i>	GCGCTCTACATGAGCATGCCCT	Nat3
<i>KanMX6</i>	CGGATTCAGTCGTCACTCATGGTG	Kan3
<i>KanMX6</i>	AGAAACAACCTCTGGCGCATCGG	Kan2b
<i>ura4</i> ⁺	GCAAGAGACCACGTCCC	M10
<i>ura4</i> ⁺	CTGGTGGCCTTAGGT	M13
<i>his3</i> ⁺	GTGTTCGCTAATTGCGC	M22

Tabla 5 Oligonucleótidos de comprobación empleados en este trabajo.

CONDICIONES DE CULTIVO

Empleamos los métodos genéticos y medios de cultivos estándar para *Schizosaccharomyces pombe* (Moreno *et al.* 1991). Crecimos las células en medio rico YES o medio selectivo MM suplementado con los requerimientos apropiados, ya sea a 25°C, 28°C o 32°C de acuerdo a la naturaleza de cada cepa.

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de *S. pombe*. Estos se obtienen inoculando colonias aisladas, cuyas características genéticas se habían comprobado anteriormente, en 5 ml del medio correspondiente. El cultivo se incubaba en agitación orbital a la temperatura apropiada hasta que las células entran en fase estacionaria temprana. A continuación, se inocula con este cultivo otro mayor, teniendo en cuenta el tiempo de generación de la levadura en cada condición.

El crecimiento de la levadura en medio líquido se controló midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2001, y recurriendo a tablas de

calibración obtenidas previamente. Según estas tablas, una densidad óptica (DO_{600}) de 1.0 se corresponde aproximadamente con 10^7 células/ml.

Inducción de estrés

Empleamos los compuestos listados en la siguiente tabla para inducir situaciones de estrés en la célula.

NOMBRE COMÚN	ACRÓNIMO	SOLUCIÓN STOCK	PROVEEDOR	NOMBRE COMERCIAL
Blankophor	BP	10 mg/ml en agua	Bayer	Blankophor BA 267%
Cloruro potásico	KCl	Añadido en forma de sal	Merck	Potassium chloride
Cafeína	Caf	0.5 M en agua	Sigma-Aldrich	Caffeine, SigmaUltra
Caspofungina	Csp	2.5 mg/ml en agua	Sigma-Aldrich	Caspofungin diacetate
Latrunculina A	Lata	10 mM en DMSO	Sigma-Aldrich	Latrunculin A

Tabla 6 Soluciones stock de los compuestos añadidos a los medios de cultivo.

Para el seguimiento *in vivo* de la respuesta al estrés preparamos una dilución a la concentración descrita en cada caso, en 2 ml de YES, a partir de la solución stock. Usamos esta dilución para la resuspensión y lavado y mantenimiento de las células en su preparación inmediatamente antes de la captura de imágenes (ver apartado time-lapse).

El efecto de la exposición continuada a estrés se determinó empleando cultivos crecidos hasta fase logarítmica en MM+suplementos a 25°C. Realizamos las diluciones de los cultivos en el mismo medio, añadiendo en cada caso el compuesto especificado. Usamos un tiempo de duplicación de entre 4 y 5 horas para los cálculos del pase, y dejamos crecer las células a 31°C durante 16h hasta alcanzar una DO de 0.4 – 0.6. Pasado este tiempo, fotografiamos las células con tinción de calcoflúor directamente en el microscopio DeltaVision.

Ensayo de crecimiento en gota

Los ensayos de crecimiento de cepas termosensibles se realizaron en placas de YES incubadas a las temperaturas indicadas en cada caso. Las cepas de estudio se sembraron en placas de YES a 25°C hasta alcanzar la fase estacionaria (48 horas). Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 μ l de agua estéril a DO 2.0 y se realizaron seis diluciones seriadas 1:5. Se

utilizó un replicador (SIGMA) para colocar una gota de cada concentración (aproximadamente 3 μ l) sobre las placas. De esta forma, se sembraron aproximadamente 6×10^4 células en la gota inicial, 1.2×10^4 células en la primera dilución, 2.4×10^3 en la segunda, 4.8×10^2 en la tercera, 100 en la cuarta y 20 en la última. Las placas fueron incubadas de 2 a 5 días dependiendo de la temperatura.

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron por lo general con el sistema Personal DeltaVision (Applied Precision), equipado con un microscopio invertido Olympus IX71 (Olympus), objetivo Plan Apo 100x/1.40 de inmersión en aceite y cámara CoolSnap HQ2 (Photometrics). El sistema está controlado por el software SoftWoRx Resolve 3D (Applied Precision).

Las imágenes de superresolución se obtuvieron con el microscopio confocal Spinning disk Olympus IXplore SpinSR SoRa (Olympus), compuesto por el microscopio Olympus IX83 (Olympus), objetivo U Plan Super Apocromático 100x/1.45 de inmersión en aceite y cámara sCMOS ORCA Flash 4.0 V3 (Hamamatsu).

Empleamos cultivos celulares en fase logarítmica temprana cultivados a 25°C, 28°C o 32°C de acuerdo a los requerimientos de cada cepa. En el caso de cepas termosensibles, las cultivamos a la temperatura permisiva para luego cambiarlas durante el tiempo especificado (entre 1 y 3 horas) a la temperatura restrictiva. Concentramos las células centrifugando 1 ml de cultivo a 3.500 g durante 1 min y las resuspendemos en 2-10 μ l del mismo medio. Tomamos fotos de 10 secciones en Z espaciadas cada 0.4 μ m.

Tinción de blankophor

Utilizamos el blankophor (Blankophor BA 267%, Bayer) como marcador del septo. Centrifugamos 1 ml de cultivo a 3.500 rpm durante 1 min, y resuspendemos las células en el volumen apropiado (2-10 μ l) de una dilución de blankophor en PBS a 50 μ g/ml, preparada a partir de una solución stock a 10 mg/ml.

Preparamos la solución stock disolviendo el blankophor, que viene en forma de polvo, en agua a una concentración de 10 mg/ml. Utilizamos unas gotas de KOH 10M para facilitar su total disolución. Esterilizamos la solución por filtración y la guardamos protegida de la luz a temperatura ambiente hasta 1 mes. En ocasiones, al día siguiente de la preparación se observa blankophor precipitado, situación que corregimos con la adición de otras gotas de KOH 10M.

Time-Lapse

Para la obtención de imágenes en tiempo real empleamos los dos microscopios siguientes, el sistema DeltaVision descrito anteriormente y un microscopio confocal Spinning disk. Este consta del sistema Spinning disk (Roper Scientific) con microscopio Olympus IX81 (Olympus), cabezal confocal CSU-X1 (Yokogawa), platina motorizada con piezo en Z (ASI), objetivo Plan Apo 100x/1.40 de inmersión en aceite y una cámara Evolve (Photometrics) controlado por el software MetaMorph Premier (Molecular Devices).

La decisión entre emplear un equipo u otro responde a los datos que deseamos obtener en cada experimento concreto. La configuración del Spinning disk hace de este un sistema rápido y de alta sensibilidad. Dichas propiedades nos permiten capturar un gran número de fotografías durante el intervalo temporal de 3 minutos que establecemos entre tomas, con reducida excitación. Así, podemos capturar en una misma sesión, imágenes en stack de varias condiciones experimentales que corren simultáneamente, minimizando la variabilidad experimental. Por su parte, el equipo DeltaVision tiene menor sensibilidad y rapidez, pero en contrapartida captura imágenes de mayor resolución, lo que nos permite mejorar el detalle de las estructuras a analizar, a costa de realizar los experimentos de forma no simultánea. De acuerdo a las características descritas, empleamos el sistema Spinning disk para experimentos en los que nos interesa contar los tiempos en varias condiciones o cepas a la vez, mientras que reservamos el sistema DeltaVision para analizar en detalle procesos o estructuras, como puede ser la dinámica de constricción de los anillos.

Creemos además que la diferencia en resolución de los dos equipos puede estar dando cuenta de las diferencias en los tiempos de citoquinesis que vemos al usar un sistema u otro. En el equipo DeltaVision, la separación de los SPBs es un evento que se puede resolver antes que en el Spinning disk (requiere que estén menos separados para identificarlos como tal), mientras que en el cierre del anillo ocurre de manera opuesta, vemos un punto único “más tarde” en el equipo de mayor resolución. Ambos efectos se estarían sumando para hacer que los tiempos medidos en el sistema DeltaVision fueran mayores, y más exactos, que los del Spinning disk.

A nivel operativo, recogemos 1 ml de cultivos celulares en fase exponencial (DO 0.3-0.6) por centrifugación (3500 g, 1 min), y resuspendemos las células en 300 μ l de medio YES. Cuando el experimento se hace en condiciones de estrés, añadimos previamente a este medio de resuspensión los compuestos correspondientes. Pasamos esta suspensión celular a uno de los ocho pocillos de una cámara μ -Slide (IBIDI), que previamente ha sido recubierta con 5 μ l de lectina de soja a 1 mg/ml (Sigma-Aldrich). Dejamos que las células se adhieran a la lectina del fondo del pocillo durante 2 minutos antes de retirar el medio. Inmediatamente lavamos este pocillo 3 veces con 300 μ l de medio y finalizamos añadiendo 300 μ l del mismo medio (que

contiene el compuesto de estrés si procede). Llevamos a cabo la captura de imágenes en atmósfera controlada a 28°C. En el caso de emplear cepas termosensibles, las cultivamos a 25°C, y las cambiamos a la temperatura descrita 1 hora antes de pasarlas a la cámara y obtener las imágenes, manteniendo el sistema de captura también a la temperatura apropiada durante todo el experimento. En el equipo DeltaVision capturamos 7 secciones de 0.6 μm de intervalo en Z en hasta 3 regiones diferentes cada 3 minutos. En el equipo Spinning disk tomamos 10 secciones de 0.4 μm de intervalo en Z en hasta 16 regiones (usualmente 4 regiones por 4 pocillos) cada 3 min. El tiempo total de captura es por lo general de 2 horas, aunque puede ser extendido o acortado según la velocidad de los eventos a estudiar.

ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS

Análisis de imágenes

Las imágenes capturadas en el sistema DelvaVision están corregidas por deconvolución 3D con el software softWoRx (GE Healthcare) bajo los siguientes parámetros: coeficiente conservador, 10 iteraciones y filtro de ruido medio. Los montajes para mostrar las fotografías, así como los análisis de las mismas se realizaron con la distribución Fiji de ImageJ (Schindelin *et al.* 2012)

Las fotografías se presentan como la proyección máxima de las secciones en Z con fines de facilitar la visualización; cuando las empleamos para fines de cuantificación utilizamos en su lugar la suma de las proyecciones. En todas las series de time-lapse utilizamos la separación de los SPBs como tiempo cero de referencia. Definimos el tiempo de compleción de la citoquinesis como el tiempo entre la separación de los SPBs y el cierre completo del CAR. El tiempo de las tres etapas del CAR se define en base a los siguientes criterios:

- Formación: desde la aparición de los nodos hasta que la señal del anillo presenta una morfología discreta y fluorescencia uniforme.
- Maduración: desde la señal de anillo uniforme hasta el primer cambio en su diámetro.
- Constricción: desde el cambio de diámetro hasta su cierre completo como punto único.

Medimos el diámetro del anillo trazando una línea sobre el mismo en las proyecciones máximas de las imágenes obtenidas por time-lapse en el sistema DeltaVision. La velocidad de constricción del CAR se obtuvo mediante regresión lineal en el tramo donde esta es constante, es decir, excluyendo los primeros valores de la curva, en los que se inicia y acelera la contracción.

La fluorescencia total de **Cdc7-GFP** en los SPBs a lo largo de la citoquinesis se midió a través de la suma de proyecciones de las secciones tomadas en el sistema Spinning disk. Empleamos

una región vacía de células para determinar el promedio de fluorescencia de fondo, que restamos a las imágenes. Usamos la señal de **Sad1-DsRed** como guía para identificar ambos SPBs, los seleccionamos con un círculo de 5 píxeles de diámetro ($0.37 \mu\text{m}^2$) y medimos la intensidad total de fluorescencia en el canal de la GFP. Una vez obtenidos todos los datos, los normalizamos como porcentajes en base a sus valores máximos y mínimos.

La fluorescencia total de la señal de BP en el septo se midió a través de la suma de proyecciones de las secciones tomadas en el sistema DeltaVision. Empleamos una región vacía de células para determinar el promedio de fluorescencia de fondo, que restamos a las imágenes. Seleccionamos la región periférica donde aparece la primera señal de BP con un círculo de 5 píxeles de diámetro (86 nm^2) y medimos la intensidad total de fluorescencia en el canal del DAPI. Usamos la misma región para determinar la fluorescencia en los frames previos, desde antes de la aparición de la señal hasta la separación de los SPBs, y de los siguientes, hasta la separación celular.

La intensidad nuclear de **Clp1-GFP** a lo largo del tiempo se midió utilizando la proyección de la suma de las secciones tomadas en el sistema DeltaVision. Empleamos una región vacía de células para determinar el promedio de fluorescencia de fondo, que restamos a las imágenes. Utilizamos la señal de **Sid4-GFP** como marcador de los SPBs para localizar el núcleo. Seleccionamos el núcleo dentro de un círculo de 42 píxeles de diámetro ($6.14 \mu\text{m}^2$) que contiene a Sid4 en su periferia, y medimos la intensidad total del canal verde en estas regiones. Una vez obtenidos todos los datos, los normalizamos como porcentajes en base a sus valores máximos y mínimos.

Representación gráfica y análisis de datos

La representación gráfica de los datos y los test estadísticos se realizaron con Prism 6.0 (GraphPad Software). Empleamos el box-plot de Tukey (Frigge *et al.* 1989) como representación gráfica de la tendencia central y desviación de los datos de tiempos. Con los datos de porcentajes utilizamos la representación de la media y desviación estándar en gráficos de barras. La notación “n” se refiere al número de células medidas en cada ocasión, salvo que se indique otra cosa. Definimos significancia estadística por un p-valor igual o menor a 0.05. En las parejas de datos que muestran una distribución normal empleamos el test t para muestras no apareadas, o el test de Mann-Whitney para distribuciones no normales. En los casos con más de dos conjuntos de datos utilizamos el test ANOVA seguido de los correspondientes test de Fisher, en el caso de datos tomados a la vez, o de los test de Šidák corregidos para comparaciones múltiples, para los experimentos no simultáneos (Glantz 2005)

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Zapata, D., Petraitiene, R. & Petraitis, V. (2015). Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 61 Suppl 6, pp. S604-611
- Akamatsu, M., Berro, J., Pu, K.-M., Tebbs, I.R. & Pollard, T.D. (2014). Cytokinetic nodes in fission yeast arise from two distinct types of nodes that merge during interphase. *The Journal of Cell Biology*, vol. 204 (6), pp. 977-988
- Alcaide-Gavilán, M., Lahoz, A., Daga, R.R. & Jimenez, J. (2014). Feedback regulation of SIN by Etd1 and Rho1 in fission yeast. *Genetics*, vol. 196 (2), pp. 455-470
- Almonacid, M., Celton-Morizur, S., Jakubowski, J.L., Dingli, F., Loew, D., Mayeux, A., Chen, J.-S., Gould, K.L., Clifford, D.M. & Paoletti, A. (2011). Temporal control of contractile ring assembly by Plo1 regulation of myosin II recruitment by Mid1/anillin. *Current biology: CB*, vol. 21 (6), pp. 473-479
- Almonacid, M., Moseley, J.B., Janvore, J., Mayeux, A., Fraiser, V., Nurse, P. & Paoletti, A. (2009). Spatial control of cytokinesis by Cdr2 kinase and Mid1/anillin nuclear export. *Current biology: CB*, vol. 19 (11), pp. 961-966
- Arasada, R. & 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*, vol. 8 (5), pp. 1533-1544
- Arellano, M., Coll, P.M. & Pérez, P. (1999a). RHO GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. *Microscopy Research and Technique*, vol. 47 (1), pp. 51-60
- Arellano, M., Durán, A. & Pérez, P. (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *The EMBO journal*, vol. 15 (17), pp. 4584-4591
- Arellano, M., Duran, A. & Perez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, vol. 110 (Pt 20), pp. 2547-2555
- Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Duran, A. & Perez, P. (1999b). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *Journal of Cell Science*, vol. 112 (Pt 20), pp. 3569-3578
- Atay, O. & Skotheim, J.M. (2017). Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways. *The Journal of Cell Biology*, vol. 216 (2), pp. 317-330
- Atilgan, E., Magidson, V., Khodjakov, A. & Chang, F. (2015). Morphogenesis of the Fission Yeast Cell through Cell Wall Expansion. *Current biology: CB*, vol. 25 (16), pp. 2150-2157
- Bähler, J., Steever, A.B., Wheatley, S., Wang, Y. I., Pringle, J.R., Gould, K.L. & McCollum, D. (1998). Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *The Journal of Cell Biology*, vol. 143 (6), pp. 1603-1616
- Balasubramanian, M.K., Bi, E. & Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Current biology: CB*, vol. 14 (18), pp. R806-818
- Balasubramanian, M.K., Hirani, B.R., Burke, J.D. & Gould, K.L. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* cdc3+ gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, vol. 125 (6), pp. 1289-1301
- Balasubramanian, M.K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K.C.Y., Naqvi, N.I., He, X., Sazer, S. & Gould, K.L. (1998). Isolation and Characterization of New Fission Yeast Cytokinesis Mutants. *Genetics*, vol. 149 (3), pp. 1265-1275

- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto, M., Cansado, J. & Yeast Physiology Group (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cellular Signalling*, vol. 20 (4), pp. 748-757
- Bassi, Z.I., Audusseau, M., Riparbelli, M.G., Callaini, G. & D'Avino, P.P. (2013). Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110 (24), pp. 9782-9787
- Berlin, A., Paoletti, A. & Chang, F. (2003). Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *The Journal of Cell Biology*, vol. 160 (7), pp. 1083-1092
- Bezanilla, M., Forsburg, S.L. & Pollard, T.D. (1997). Identification of a second myosin-II in *Schizosaccharomyces pombe*: Myp2p is conditionally required for cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 8 (12), pp. 2693-2705
- Boddy, M.N. & Russell, P. (2001). DNA replication checkpoint. *Current biology: CB*, vol. 11 (23), pp. R953-956
- Bohnert, K.A. & Gould, K.L. (2011). On the cutting edge: post-translational modifications in cytokinesis. *Trends in Cell Biology*, vol. 21 (5), pp. 283-292
- Bohnert, K.A. & Gould, K.L. (2012). Cytokinesis-Based Constraints on Polarized Cell Growth in Fission Yeast. (Toczyski, D. P., ed.) *PLoS Genetics*, vol. 8 (10), p. e1003004
- Bohnert, K.A., Grzegorzewska, A.P., Willet, A.H., Vander Kooi, C.W., Kovar, D.R. & Gould, K.L. (2013). SIN-dependent phosphoinhibition of formin multimerization controls fission yeast cytokinesis. *Genes & Development*, vol. 27 (19), pp. 2164-2177
- Bos, J.L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, vol. 129 (5), pp. 865-877
- Broadus, M.R. & Gould, K.L. (2012). Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23 (20), pp. 4118-4128
- Buchsbaum, R.J. (2007). Rho activation at a glance. *Journal of Cell Science*, vol. 120 (Pt 7), pp. 1149-1152
- Buck, V., Quinn, J., Soto Pino, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B.A. & Millar, J.B. (2001). Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 12 (2), pp. 407-419
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V. & Berenjeno, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, vol. 29 (4), pp. 356-370
- Calonge, T.M., Arellano, M., Coll, P.M. & Perez, P. (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Microbiology*, vol. 47 (2), pp. 507-518
- Calonge, T.M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I. & Perez, P. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Rho2p GTPase Regulates Cell Wall α -Glucan Biosynthesis through the Protein Kinase Pck2p. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 11 (12), pp. 4393-4401
- Calvo, I.A., Gabrielli, N., Iglesias-Baena, I., García-Santamarina, S., Hoe, K.-L., Kim, D.U., Sansó, M., Zuin, A., Pérez, P., Ayté, J. & Hidalgo, E. (2009). Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. *PLoS One*, vol. 4 (8), p. e6619
- Cargnello, M. & Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, vol. 75 (1), pp. 50-83
- Carnero, E., Ribas, J.C., García, B., Durán, A. & Sánchez, Y. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Molecular & general genetics: MGG*, vol. 264 (1-2), pp. 173-183
- Celton-Morizur, S., Racine, V., Sibarita, J.-B. & Paoletti, A. (2006). Pom1 kinase links division plane position to cell polarity by regulating Mid1p cortical distribution. *Journal of Cell Science*, vol. 119 (Pt 22), pp. 4710-4718

- Cerutti, L. & Simanis, V. (1999). Asymmetry of the spindle pole bodies and spg1p GAP segregation during mitosis in fission yeast. *Journal of Cell Science*, vol. 112 (Pt 14), pp. 2313-2321
- Chang, F. (2017). Forces that shape fission yeast cells. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 28 (14), pp. 1819-1824
- Chang, F., Drubin, D. & Nurse, P. (1997). cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *The Journal of Cell Biology*, vol. 137 (1), pp. 169-182
- Chang, F. & Martin, S.G. (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 1 (1), p. a001347
- Chang, L. & Gould, K.L. (2000). Sid4p is required to localize components of the septation initiation pathway to the spindle pole body in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97 (10), pp. 5249-5254
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G. & Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell*, vol. 47 (4), pp. 497-510
- Cheffings, T.H., Burroughs, N.J. & Balasubramanian, M.K. (2016). Actomyosin Ring Formation and Tension Generation in Eukaryotic Cytokinesis. *Current biology: CB*, vol. 26 (15), pp. R719-R737
- Cheffings, T.H., Burroughs, N.J. & Balasubramanian, M.K. (2019). Actin turnover ensures uniform tension distribution during cytokinetic actomyosin ring contraction. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 30 (8), pp. 933-941
- Chen, C.-T., Feoktistova, A., Chen, J.-S., Shim, Y.-S., Clifford, D.M., Gould, K.L. & McCollum, D. (2008). The SIN Kinase Sid2 Regulates Cytoplasmic Retention of the *S. pombe* Cdc14-like Phosphatase Clp1. *Current Biology*, vol. 18 (20), pp. 1594-1599
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. & Bähler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 14 (1), pp. 214-229
- Chen, J.S., Broadus, M.R., McLean, J.R., Feoktistova, A., Ren, L. & Gould, K.L. (2013). Comprehensive proteomics analysis reveals new substrates and regulators of the fission yeast clp1/cdc14 phosphatase. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, vol. 12 (5), pp. 1074-1086
- Chen, Q. & Pollard, T.D. (2011). Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring. *The Journal of Cell Biology*, vol. 195 (3), pp. 485-498
- Chen, R.E. & Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1773 (8), pp. 1311-1340
- Cherfils, J. & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, vol. 93 (1), pp. 269-309
- Chew, T.G., Huang, J., Palani, S., Sommese, R., Kamnev, A., Hatano, T., Gu, Y., Oliferenko, S., Sivaramakrishnan, S. & Balasubramanian, M.K. (2017). Actin turnover maintains actin filament homeostasis during cytokinetic ring contraction. *The Journal of Cell Biology*, p. jcb.201701104
- Clifford, D.M., Wolfe, B.A., Roberts-Galbraith, R.H., McDonald, W.H., Yates, J.R. & Gould, K.L. (2008). The Clp1/Cdc14 phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related Mid1. *The Journal of Cell Biology*, vol. 181 (1), pp. 79-88
- Coffman, V.C., Nile, A.H., Lee, I.-J., Liu, H. & Wu, J.-Q. (2009). Roles of Formin Nodes and Myosin Motor Activity in Mid1p-dependent Contractile-Ring Assembly during Fission Yeast Cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 20 (24), pp. 5195-5210
- Coll, P.M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. & Perez, P. (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 14 (1), pp. 313-323
- Consonni, S.V., Maurice, M.M. & Bos, J.L. (2014). DEP domains: structurally similar but functionally different. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 15 (5), pp. 357-362

- Cortés, J.C.G., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A. & Ribas, J.C. (2005). The novel fission yeast (1,3) β -D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci*, vol. 118 (1), pp. 157-174
- Cortés, J.C.G., Konomi, M., Martins, I.M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Osumi, M., Durán, A. & Ribas, J.C. (2007). The (1,3) β -d-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Molecular Microbiology*, vol. 65 (1), pp. 201-217
- Cortés, J.C.G. & McCollum, D. (2009). Proper timing of cytokinesis is regulated by *Schizosaccharomyces pombe* Etd1. *The Journal of Cell Biology*, vol. 186 (5), pp. 739-753
- Cortés, J.C.G., Pujol, N., Sato, M., Pinar, M., Ramos, M., Moreno, B., Osumi, M., Ribas, J.C. & 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. (Gould, K. L., ed.) *PLOS Genetics*, vol. 11 (7), p. e1005358
- Cortés, J.C.G., Ramos, M., Konomi, M., Barragán, I., Moreno, M.B., Alcaide-Gavilán, M., Moreno, S., Osumi, M., Pérez, P. & Ribas, J.C. (2018). Specific detection of fission yeast primary septum reveals septum and cleavage furrow ingression during early anaphase independent of mitosis completion. (McCollum, D., ed.) *PLOS Genetics*, vol. 14 (5), p. e1007388
- Cortés, J.C.G., Ramos, M., Osumi, M., Pérez, P. & Ribas, J.C. (2016a). Fission yeast septation. *Communicative & Integrative Biology*, vol. 9 (4), p. e1189045
- Cortés, J.C.G., Ramos, M., Osumi, M., Pérez, P. & Ribas, J.C. (2016b). The Cell Biology of Fission Yeast Septation. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, vol. 80 (3), pp. 779-791
- Cortés, J.C.G., Sato, M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Clemente-Ramos, J.A., Ramos, M., Okada, H., Osumi, M., Durán, A. & Ribas, J.C. (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *The Journal of Cell Biology*, vol. 198 (4), pp. 637-656
- Courtemanche, N., Pollard, T.D. & Chen, Q. (2016). Avoiding artefacts when counting polymerized actin in live cells with LifeAct fused to fluorescent proteins. *Nature Cell Biology*, vol. 18 (6), pp. 676-683
- Cruz, S., Muñoz, S., Manjón, E., García, P. & Sanchez, Y. (2013). The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *MicrobiologyOpen*, p. n/a-n/a
- Daga, R.R. & Chang, F. (2005). Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102 (23), pp. 8228-8232
- Daga, R.R., Lahoz, A., Muñoz, M.J., Moreno, S. & Jimenez, J. (2005). Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *The EMBO journal*, vol. 24 (13), pp. 2436-2446
- Davì, V., Tanimoto, H., Ershov, D., Haupt, A., De Belly, H., Le Borgne, R., Couturier, E., Boudaoud, A. & Minc, N. (2018). Mechanosensation Dynamically Coordinates Polar Growth and Cell Wall Assembly to Promote Cell Survival. *Developmental Cell*, vol. 45 (2), pp. 170-182.e7
- Davidson, R., Laporte, D. & Wu, J.-Q. (2015). Regulation of Rho-GEF Rgf3 by the arrestin Art1 in fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 26 (3), pp. 453-466
- Davidson, R., Pontasch, J.A. & Wu, J.-Q. (2016). Sbg1 Is a Novel Regulator for the Localization of the β -Glucan Synthase Bgs1 in Fission Yeast. *PloS One*, vol. 11 (11), p. e0167043
- Degols, G., Shiozaki, K. & Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16 (6), pp. 2870-2877
- Dekker, N., Speijer, D., Grün, C.H., van den Berg, M., de Haan, A. & Hochstenbach, F. (2004). Role of the α -Glucanase Agn1p in Fission-Yeast Cell Separation. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 15 (8), pp. 3903-3914
- DerMardirossian, C. & Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology*, vol. 15 (7), pp. 356-363
- Dey, S.K. & Pollard, T.D. (2018). Involvement of the septation initiation network in events during cytokinesis in fission yeast. *Journal of Cell Science*, vol. 131 (16)

- Dischinger, S., Krapp, A., Xie, L., Paulson, J.R. & Simanis, V. (2008). Chemical genetic analysis of the regulatory role of Cdc2p in the *S. pombe* septation initiation network. *Journal of Cell Science*, vol. 121 (6), pp. 843-853
- Doi, A., Kita, A., Kanda, Y., Uno, T., Asami, K., Satoh, R., Nakano, K. & Sugiura, R. (2015). Geranylgeranyltransferase Cwg2-Rho4/Rho5 module is implicated in the Pmk1 MAP kinase-mediated cell wall integrity pathway in fission yeast. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, vol. 20 (4), pp. 310-323
- Dvorsky, R. & Ahmadian, M.R. (2004). Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO reports*, vol. 5 (12), pp. 1130-1136
- East, D.A. & Mulvihill, D.P. (2011). Regulation and function of the fission yeast myosins. *Journal of Cell Science*, vol. 124 (Pt 9), pp. 1383-1390
- Edreira, T., Manjón, E. & Sánchez, Y. (2018). The Function of Fission Yeast Rho1-GEFs in the Control of Cell Growth and Division. En: Tanabe, S. (ed.) *Peripheral Membrane Proteins*. InTech,
- Egel, R. (2013). *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe: Genetics, Genomics and Beyond*. Springer Science & Business Media.
- English, J.G., Shellhammer, J.P., Malahe, M., McCarter, P.C., Elston, T.C. & Dohlman, H.G. (2015). MAPK feedback encodes a switch and timer for tunable stress adaptation in yeast. *Science Signaling*, vol. 8 (359), p. ra5
- Fang, Y., Jaiseng, W., Ma, Y., Hu, L., Yamazaki, S., Zhang, X., Hayafuji, T., Shi, L. & Kuno, T. (2014). E3 Ubiquitin Ligase Pub1 Is implicated in Endocytosis of a GPI-Anchored Protein Ecm33 in Fission Yeast. *PLoS ONE*, vol. 9 (1). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085238>
- Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K. & Simanis, V. (1995). The *S. pombe* cdc15 gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell*, vol. 82 (3), pp. 435-444
- Fankhauser, C. & Simanis, V. (1994). The cdc7 protein kinase is a dosage dependent regulator of septum formation in fission yeast. *The EMBO journal*, vol. 13 (13), pp. 3011-3019
- Fantes, P.A. & Hoffman, C.S. (2016). A Brief History of Schizosaccharomyces pombe Research: A Perspective Over the Past 70 Years. *Genetics*, vol. 203 (2), pp. 621-629
- Feoktistova, A., Morrell-Falvey, J., Chen, J.-S., Singh, N.S., Balasubramanian, M.K. & Gould, K.L. (2012). The fission yeast septation initiation network (SIN) kinase, Sid2, is required for SIN asymmetry and regulates the SIN scaffold, Cdc11. (Li, R., ed.) *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23 (9), pp. 1636-1645
- Free, S.J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics*, vol. 81, pp. 33-82
- Frigge, M., Hoaglin, D.C. & Iglewicz, B. (1989). Some Implementations of the Boxplot. *The American Statistician*, vol. 43 (1), pp. 50-54
- Furge, K.A., Wong, K., Armstrong, J., Balasubramanian, M. & Albright, C.F. (1998). Byr4 and Cdc16 form a two-component GTPase-activating protein for the Spg1 GTPase that controls septation in fission yeast. *Current biology: CB*, vol. 8 (17), pp. 947-954
- Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K. & Russell, P. (1998). Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes & Development*, vol. 12 (10), pp. 1464-1473
- Gammons, M.V., Renko, M., Johnson, C.M., Rutherford, T.J. & Bienz, M. (2016). Wnt Signalosome Assembly by DEP Domain Swapping of Dishevelled. *Molecular Cell*, vol. 64 (1), pp. 92-104
- García, I., Jiménez, D., Martín, V., Durán, A. & Sánchez, Y. (2005). The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in Schizosaccharomyces pombe. *Biology of the Cell*, vol. 97 (7), pp. 569-576
- García, P., García, I., Marcos, F., de Garibay, G.R. & Sánchez, Y. (2009a). 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*, vol. 181 (4), pp. 1321-1334

- García, P., Tajadura, V., García, I. & Sánchez, Y. (2006a). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17 (4), pp. 1620-1631
- García, P., Tajadura, V., García, I. & Sánchez, Y. (2006b). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast (Chichester, England)*, vol. 23 (13), pp. 1031-1043
- García, P., Tajadura, V. & Sanchez, Y. (2009b). The Rho1p Exchange Factor Rgf1p Signals Upstream from the Pmk1 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Fission Yeast. (Boone, C., ed.) *Molecular Biology of the Cell*, vol. 20 (2), pp. 721-731
- George, V.T., Brooks, G. & Humphrey, T.C. (2007). Regulation of Cell Cycle and Stress Responses to Hydrostatic Pressure in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 18 (10), pp. 4168-4179
- Glantz, S. (2005). *Primer of Biostatistics: Sixth Edition*. 6 edition. New York: McGraw-Hill Medical.
- Glotzer, M. (2017). Cytokinesis in Metazoa and Fungi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 9 (10), p. a022343
- González-Rubio, G., Fernández-Acero, T., Martín, H. & Molina, M. (2019). Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases (MKPs) in Fungal Signaling: Conservation, Function, and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20 (7)
- Goss, J.W., Kim, S., Bledsoe, H. & Pollard, T.D. (2014). Characterization of the roles of Blt1p in fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 25 (13), pp. 1946-1957
- Gould, K.L. & Simanis, V. (1997). The control of septum formation in fission yeast. *Genes & Development*, vol. 11 (22), pp. 2939-2951
- Grallert, A., Connolly, Y., Smith, D.L., Simanis, V. & Hagan, I.M. (2012). The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1. *Nature Cell Biology*, vol. 14 (7), pp. 738-745
- Gräub, R., Hilti, N., Niederberger, C. & Schweingruber, M.E. (2003). Ksg1, a homologue of the phosphoinositide-dependent protein kinase 1, controls cell wall integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Basic Microbiology*, vol. 43 (6), pp. 473-482
- Grün, C.H., Hochstenbach, F., Humbel, B.M., Verkleij, A.J., Sietsma, J.H., Klis, F.M., Kamerling, J.P. & Vliegthart, J.F.G. (2005). The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology*, vol. 15 (3), pp. 245-257
- Gu, Y. & Oliferenko, S. (2015). Comparative biology of cell division in the fission yeast clade. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 28, pp. 18-25
- Guertin, D.A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K.L. & McCollum, D. (2000). The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *The EMBO journal*, vol. 19 (8), pp. 1803-1815
- Gupta, S., Govindaraghavan, M. & McCollum, D. (2014). Cross talk between NDR kinase pathways coordinates cytokinesis with cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, vol. 13 (8), pp. 1104-1112
- Gupta, S., Mana-Capelli, S., McLean, J.R., Chen, C.-T., Ray, S., Gould, K.L. & McCollum, D. (2013). Identification of SIN pathway targets reveals mechanisms of crosstalk between NDR kinase pathways. *Current biology: CB*, vol. 23 (4), pp. 333-338
- Guzman-Vendrell, M., Baldissard, S., Almonacid, M., Mayeux, A., Paoletti, A. & Moseley, J.B. (2013). Blt1 and Mid1 provide overlapping membrane anchors to position the division plane in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 33 (2), pp. 418-428
- Hachet, O., Berthelot-Grosjean, M., Kokkoris, K., Vincenzetti, V., Moosbrugger, J. & Martin, S.G. (2011). A phosphorylation cycle shapes gradients of the DYRK family kinase Pom1 at the plasma membrane. *Cell*, vol. 145 (7), pp. 1116-1128
- Hachet, O. & Simanis, V. (2008). Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes & Development*, vol. 22 (22), pp. 3205-3216
- Hagan, I. & Yanagida, M. (1995). The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *The Journal of Cell Biology*, vol. 129 (4), pp. 1033-1047

- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochemical Society Transactions*, vol. 40 (6), pp. 1378-1382
- Harigaya, Y. & Yamamoto, M. (2007). Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, vol. 15 (5), pp. 523-537
- Haupt, A. & Minc, N. (2017). Gradients of phosphatidylserine contribute to plasma membrane charge localization and cell polarity in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 28 (1), pp. 210-220
- Hercyk, B.S., Onwubiko, U.N. & Das, M.E. (2019). Coordinating Septum Formation and the Actomyosin Ring during Cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Microbiology*,
- Hersch, M., Hachet, O., Dalessi, S., Ullal, P., Bhatia, P., Bergmann, S. & Martin, S.G. (2015). Pom1 gradient buffering through intermolecular auto-phosphorylation. *Molecular Systems Biology*, vol. 11 (7), p. 818
- Hiraoka, Y., Toda, T. & Yanagida, M. (1984). The NDA3 gene of fission yeast encodes beta-tubulin: a cold-sensitive *nda3* mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell*, vol. 39 (2 Pt 1), pp. 349-358
- Hirata, D., Nakano, K., Fukui, M., Takenaka, H., Miyakawa, T. & Mabuchi, I. (1998). Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role of a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *Journal of Cell Science*, vol. 111 (Pt 2), pp. 149-159
- Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. & 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*. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 14 (9), pp. 3617-3627
- Hoffman, C.S., Wood, V. & Fantes, P.A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics*, vol. 201 (2), pp. 403-423
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 66 (2), pp. 300-372
- Hou, M.C., Salek, J. & McCollum, D. (2000). Mob1p interacts with the Sid2p kinase and is required for cytokinesis in fission yeast. *Current biology: CB*, vol. 10 (10), pp. 619-622
- Huang, C.Y. & Ferrell, J.E. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93 (19), pp. 10078-10083
- Huang, J., Huang, Y., Yu, H., Subramanian, D., Padmanabhan, A., Thadani, R., Tao, Y., Tang, X., Wedlich-Soldner, R. & Balasubramanian, M.K. (2012). Nonmedially assembled F-actin cables incorporate into the actomyosin ring in fission yeast. *The Journal of Cell Biology*, vol. 199 (5), pp. 831-847
- Huang, Y., Yan, H. & Balasubramanian, M.K. (2008). Assembly of normal actomyosin rings in the absence of Mid1p and cortical nodes in fission yeast. *The Journal of Cell Biology*, vol. 183 (6), pp. 979-988
- Humbel, B.M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S.A. & Osumi, M. (2001). In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)*, vol. 18 (5), pp. 433-444
- Jin, Q.-W., Zhou, M., Bimbo, A., Balasubramanian, M.K. & McCollum, D. (2006). A Role for the Septation Initiation Network in Septum Assembly Revealed by Genetic Analysis of *sid2-250* Suppressors. *Genetics*, vol. 172 (4), pp. 2101-2112
- Johnson, A.E., McCollum, D. & Gould, K.L. (2012). Polar opposites: Fine-tuning cytokinesis through SIN asymmetry. *Cytoskeleton*, vol. 69 (10), pp. 686-699
- Jourdain, I., Brzezińska, E.A. & Toda, T. (2013). Fission Yeast Nod1 Is a Component of Cortical Nodes Involved in Cell Size Control and Division Site Placement. *PLOS ONE*, vol. 8 (1), p. e54142
- Kashiwazaki, J., Yoneda, Y., Mutoh, T., Arai, R., Yoshida, M. & Mabuchi, I. (2019). A unique kinesin-like protein, Klp8, is involved in mitosis and cell morphology through microtubule stabilization. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*,

- Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L. & Pollard, T.D. (2003). The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *The Journal of Cell Biology*, vol. 161 (5), pp. 875–887
- Krapp, A., Collin, P., Cano Del Rosario, E. & Simanis, V. (2008). Homeostasis between the GTPase Spg1p and its GAP in the regulation of cytokinesis in *S. pombe*. *Journal of Cell Science*, vol. 121 (Pt 5), pp. 601–608
- Krapp, A., Schmidt, S., Cano, E. & Simanis, V. (2001). *S. pombe* cdc11p, together with sid4p, provides an anchor for septation initiation network proteins on the spindle pole body. *Current biology: CB*, vol. 11 (20), pp. 1559–1568
- Kühn, S. & Geyer, M. (2014). Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases*, vol. 5 (3), p. e983876
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. & Francois, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular Microbiology*, vol. 61 (5), pp. 1147–1166
- Lambert, S. & Carr, A.M. (2013). Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 23 (2), pp. 132–139
- Langerak, P. & Russell, P. (2011). Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 366 (1584), pp. 3562–3571
- Laplante, C., Berro, J., Karatekin, E., Hernandez-Leyva, A., Lee, R. & Pollard, T.D. (2015). Three myosins contribute uniquely to the assembly and constriction of the fission yeast cytokinetic contractile ring. *Current biology: CB*, vol. 25 (15), pp. 1955–1965
- Laporte, D., Coffman, V.C., Lee, I.-J. & Wu, J.-Q. (2011). Assembly and architecture of precursor nodes during fission yeast cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, vol. 192 (6), pp. 1005–1021
- Laporte, D., Ojkic, N., Vavylonis, D. & Wu, J.-Q. (2012). α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23 (16), pp. 3094–3110
- Le Goff, X., Motegi, F., Salimova, E., Mabuchi, I. & Simanis, V. (2000). The *S. pombe* rlc1 gene encodes a putative myosin regulatory light chain that binds the type II myosins myo3p and myo2p. *Journal of Cell Science*, vol. 113 (23), pp. 4157–4163
- Le Goff, X., Woollard, A. & Simanis, V. (1999). Analysis of the cps1 gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and General Genetics MGG*, vol. 262 (1), pp. 163–172
- Leupold, U. (1949). *Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei Schizosaccharomyces Pombe*. Luno.
- Levin, D.E. (2005). Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 69 (2), pp. 262–291
- Levin, J.D. & Demple, B. (1996). In vitro detection of endonuclease IV-specific DNA damage formed by bleomycin in vivo. *Nucleic Acids Research*, vol. 24 (5), pp. 885–889
- Li, C., Furge, K.A., Cheng, Q. & 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. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275 (19), pp. 14381–14387
- Lipshtat, A., Jayaraman, G., He, J.C. & Iyengar, R. (2010). Design of versatile biochemical switches that respond to amplitude, duration, and spatial cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107 (3), pp. 1247–1252
- Liu, J., Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S. & 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*. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13 (3), pp. 989–1000
- Liu, J., Wang, H. & Balasubramanian, M.K. (2000). A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, vol. 113 (Pt 7), pp. 1223–1230

- Liu, J., Wang, H., McCollum, D. & Balasubramanian, M.K. (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, vol. 153 (3), pp. 1193-1203
- Liu, M., Bi, F., Zhou, X. & Zheng, Y. (2012). Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends in Cell Biology*, vol. 22 (7), pp. 365-373
- Liu, Y., Lee, I.-J., Sun, M., Lower, C.A., Runge, K.W., Ma, J. & Wu, J.-Q. (2016). Roles of the novel coiled-coil protein Rng10 in septum formation during fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 27 (16), pp. 2528-2541
- Liu, Y., McDonald, N.A., Naegele, S.M., Gould, K.L. & Wu, J.-Q. (2019). The F-BAR Domain of Rga7 Relies on a Cooperative Mechanism of Membrane Binding with a Partner Protein during Fission Yeast Cytokinesis. *Cell Reports*, vol. 26 (10), pp. 2540-2548.e4
- Lock, A., Rutherford, K., Harris, M.A., Hayles, J., Oliver, S.G., Bähler, J. & Wood, V. (2019). PomBase 2018: user-driven reimplementations of the fission yeast database provides rapid and intuitive access to diverse, interconnected information. *Nucleic Acids Research*, vol. 47 (D1), pp. D821-D827
- Loewith, R., Hubberstey, A. & Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, vol. 113 (Pt 1), pp. 153-160
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y. & Sugiura, R. (2006). Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17 (12), pp. 5028-5037
- Ma, Y., Sugiura, R., Koike, A., Ebina, H., Sio, S.O. & Kuno, T. (2011). Transient Receptor Potential (TRP) and Cch1-Yam8 Channels Play Key Roles in the Regulation of Cytoplasmic Ca²⁺ in Fission Yeast. *PLoS ONE*, vol. 6 (7). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022421>
- Madrid, M., Fernández-Zapata, J., Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Gacto, M. & Cansado, J. (2013). Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. *BMC microbiology*, vol. 13, p. 34
- Madrid, M., Jimenez, R., Sanchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Perez, P. & Cansado, J. (2015). Multiple layers of regulation influence cell integrity control by the PKC ortholog Pck2 in fission yeast. *Journal of Cell Science*, vol. 128 (2), pp. 266-280
- Madrid, M., Núñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. & Cansado, J. (2007). Stress-activated Protein Kinase-mediated Down-Regulation of the Cell Integrity Pathway Mitogen-activated Protein Kinase Pmk1p by Protein Phosphatases. (Chang, F., ed.) *Molecular Biology of the Cell*, vol. 18 (11), pp. 4405-4419
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M. & Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281 (4), pp. 2033-2043
- Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. & Cansado, J. (2016). Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Scientific Reports*, vol. 6, p. 37515
- Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Soto, T., Franco, A., Gómez-Gil, E., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Pérez, P. & Cansado, J. (2017). Differential functional regulation of protein kinase C (PKC) orthologs in fission yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 292 (27), pp. 11374-11387
- Magidson, V. & Khodjakov, A. (2013). Circumventing photodamage in live-cell microscopy. *Methods in cell biology*, vol. 114. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407761-4.00023-3>
- Magnelli, P.E., Cipollo, J.F. & Robbins, P.W. (2005). A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Analytical Biochemistry*, vol. 336 (2), pp. 202-212
- Mana-Capelli, S., McLean, J.R., Chen, C.-T., Gould, K.L. & McCollum, D. (2012). The kinesin-14 Klp2 is negatively regulated by the SIN for proper spindle elongation and telophase nuclear positioning. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23 (23), pp. 4592-4600

- Mangione, M.C. & Gould, K.L. (2019). Molecular form and function of the cytokinetic ring. *Journal of Cell Science*, vol. 132 (12), p. jcs226928
- Manjón, E., Edreira, T., Muñoz, S. & Sánchez, Y. (2017). Rgf1p (Rho1p GEF) is required for double-strand break repair in fission yeast. *Nucleic Acids Research*, vol. 45 (9), pp. 5269–5284
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J.M., Ruiz, C., Nombela, C. & Molina, M. (2000a). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275 (2), pp. 1511–1519
- Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A. & Sánchez, Y. (2003). Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, vol. 2 (1), pp. 159–169
- Martín, V., Ribas, J.C., Carnero, E., Durán, A. & Sánchez, Y. (2000b). bgs2+, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Molecular Microbiology*, vol. 38 (2), pp. 308–321
- Martín-Cuadrado, A.B., Dedo, J.E.D., Medina-Redondo, M.D., Fontaine, T., Rey, F.D., Latgé, J.P. & Aldana, C.R.V.D. (2008). The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Molecular Microbiology*, vol. 69 (1), pp. 188–200
- Martín-Cuadrado, A.B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Aldana, C.R.V. de & Rey, F. del (2003). The endo- β -1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, vol. 116 (9), pp. 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. & 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. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16 (10), pp. 4867–4881
- Martínez-Soto, D. & Ruiz-Herrera, J. (2017). Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. *Revista Iberoamericana De Micología*, vol. 34 (4), pp. 192–202
- Martín-García, R., Arribas, V., Coll, P.M., Pinar, M., Viana, R.A., Rincón, S.A., Correa-Bordes, J., Ribas, J.C. & Pérez, P. (2018). Paxillin-Mediated Recruitment of Calcineurin to the Contractile Ring Is Required for the Correct Progression of Cytokinesis in Fission Yeast. *Cell Reports*, vol. 25 (3), pp. 772–783.e4
- Martín-García, R., Coll, P.M. & Pérez, P. (2014). F-BAR domain protein Rga7 collaborates with Cdc15 and Imp2 to ensure proper cytokinesis in fission yeast. *Journal of Cell Science*, vol. 127 (Pt 19), pp. 4146–4158
- Martín-García, R. & Santos, B. (2016). The price of independence: cell separation in fission yeast. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 32 (4), p. 65
- Matsuo, Y., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. & Kawamukai, M. (2004). Genetic analysis of chs1+ and chs2+ encoding chitin synthases from *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 68 (7), pp. 1489–1499
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S. & Yoshida, M. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Biotechnology*, vol. 24 (7), pp. 841–847
- McDonald, N.A., Lind, A.L., Smith, S.E., Li, R. & Gould, K.L. (2017). Nanoscale architecture of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *eLife*, vol. 6
- Mendes Pinto, I., Rubinstein, B., Kucharavy, A., Unruh, J.R. & Li, R. (2012). Actin Depolymerization Drives Actomyosin Ring Contraction during Budding Yeast Cytokinesis. *Developmental Cell*, vol. 22 (6), pp. 1247–1260
- Merlini, L., Dudin, O. & Martin, S.G. (2013). Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biology*, vol. 3 (3), p. 130008
- Militello, R. & Colombo, M.I. (2013). Small GTPases as regulators of cell division. *Communicative & Integrative Biology*, vol. 6 (5), p. e25460

- Millar, J.B., Buck, V. & Wilkinson, M.G. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & Development*, vol. 9 (17), pp. 2117–2130
- Minc, N. (2019). Cell wall dynamics in the control of fission yeast growth and morphogenesis. *Proceedings of 10th Fission Yeast meeting*, Barcelona, julio 14 2019. Barcelona
- Mishra, M., Huang, J. & Balasubramanian, M.K. (2014). The yeast actin cytoskeleton. *FEMS microbiology reviews*, vol. 38 (2), pp. 213–227
- Mishra, M., Karagiannis, J., Sevugan, M., Singh, P. & Balasubramanian, M.K. (2005). The 14–3–3 protein rad24p modulates function of the cdc14p family phosphatase clp1p/flp1p in fission yeast. *Current biology: CB*, vol. 15 (15), pp. 1376–1383
- Mishra, M., Karagiannis, J., Trautmann, S., Wang, H., McCollum, D. & 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*. *Journal of Cell Science*, vol. 117 (Pt 17), pp. 3897–3910
- Mitchison, J.M. & Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, vol. 75, pp. 357–376
- Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology*, vol. 194, pp. 795–823
- Morrell-Falvey, J.L. (2005). Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *Journal of Cell Science*, vol. 118 (23), pp. 5563–5573
- Morrell-Falvey, 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. & Gould, K.L. (2004). Sid4p-Cdc11p assembles the septation initiation network and its regulators at the *S. pombe* SPB. *Current biology: CB*, vol. 14 (7), pp. 579–584
- Morris, Z., Sinha, D., Poddar, A., Morris, B. & Chen, Q. (2019). Fission yeast TRP channel Pkd2p localizes to the cleavage furrow and regulates cell separation during cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 30 (15), pp. 1791–1804
- Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A. & Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature*, vol. 459 (7248), pp. 857–860
- Motegi, F., Nakano, K. & Mabuchi, I. (2000). Molecular mechanism of myosin-II assembly at the division site in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, vol. 113 (Pt 10), pp. 1813–1825
- Mulvihill, D.P. & Hyams, J.S. (2002). Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. *Journal of Cell Science*, vol. 115 (Pt 18), pp. 3575–3586
- Muñoz, J., Cortés, J.C.G., Sipiczki, M., Ramos, M., Clemente-Ramos, J.A., Moreno, M.B., Martins, I.M., Pérez, P. & Ribas, J.C. (2013). Extracellular cell wall $\beta(1,3)$ glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J Cell Biol*, vol. 203 (2), pp. 265–282
- Muñoz, S., Manjón, E., García, P., Sunnerhagen, P. & Sánchez, Y. (2014a). The checkpoint-dependent nuclear accumulation of Rho1p exchange factor Rgf1p is important for tolerance to chronic replication stress. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 25 (7), pp. 1137–1150
- Muñoz, S., Manjón, E. & Sánchez, Y. (2014b). The putative exchange factor Gef3p interacts with Rho3p GTPase and the septin ring during cytokinesis in fission yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 289 (32), pp. 21995–22007
- Mutoh, T., Nakano, K. & 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 to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, vol. 10 (12), pp. 1189–1202
- Nabeshima, K., Nakagawa, T., Straight, A.F., Murray, A., Chikashige, Y., Yamashita, Y.M., Hiraoka, Y. & Yanagida, M. (1998). Dynamics of Centromeres during Metaphase–Anaphase Transition in Fission Yeast: Dis1 Is Implicated in Force Balance in Metaphase Bipolar Spindle. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 9 (11), pp. 3211–3225

- Nakano, K., Arai, R. & 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 to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, vol. 2 (11), pp. 679-694
- Nakano, K. & Mabuchi, I. (2006). Actin-depolymerizing Protein Adf1 Is Required for Formation and Maintenance of the Contractile Ring during Cytokinesis in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17 (4), pp. 1933-1945
- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. & Mabuchi, I. (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, vol. 8 (4), pp. 357-370
- Nguyen, A.N., Ikner, A.D., Shiozaki, M., Warren, S.M. & Shiozaki, K. (2002). Cytoplasmic localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13 (8), pp. 2651-2663
- Nguyen, A.N. & Shiozaki, K. (1999). Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes & Development*, vol. 13 (13), pp. 1653-1663
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, vol. 344 (6266), pp. 503-508
- Nurse, P., Thuriaux, P. & Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & general genetics: MGG*, vol. 146 (2), pp. 167-178
- Okada, H., Wloka, C., Wu, J.Q. & Bi, E. (2019). Distinct Roles of Myosin-II Isoforms in Cytokinesis under Normal and Stressed Conditions. *iScience*, vol. 14, pp. 69-87
- Opalko, H.E. & Moseley, J.B. (2017). Dynamic regulation of Cdr1 kinase localization and phosphorylation during osmotic stress. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 292 (45), pp. 18457-18468
- O'Shaughnessy, B. & Thiyagarajan, S. (2018). Mechanisms of contractile ring tension production and constriction. *Biophysical Reviews*, vol. 10 (6), pp. 1667-1681
- Padte, N.N., Martin, S.G., Howard, M. & Chang, F. (2006). The cell-end factor pom1p inhibits mid1p in specification of the cell division plane in fission yeast. *Current biology: CB*, vol. 16 (24), pp. 2480-2487
- Palani, S., Chew, T.G., Ramanujam, S., Kamnev, A., Harne, S., Chapa-y-Lazo, B., Hogg, R., Sevugan, M., Mishra, M., Gayathri, P. & Balasubramanian, M.K. (2017). Motor Activity Dependent and Independent Functions of Myosin II Contribute to Actomyosin Ring Assembly and Contraction in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Biology*, vol. 27 (5), pp. 751-757
- Papadakis, M.A. & Workman, C.T. (2015). Oxidative stress response pathways: Fission yeast as archetype. *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 41 (4), pp. 520-535
- Pelham, R.J. & Chang, F. (2002). Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature*, vol. 419 (6902), pp. 82-86
- Perez, P. & Cansado, J. (2010). Cell Integrity Signaling and Response to Stress in Fission Yeast. *Current Protein & Peptide Science*, vol. 11 (8), pp. 680-692
- Perez, P., Cortés, J.C.G., Cansado, J. & Ribas, J.C. (2018). Fission yeast cell wall biosynthesis and cell integrity signalling. *The Cell Surface*, vol. 4, pp. 1-9
- Perez, P., Portales, E. & Santos, B. (2015). Rho4 interaction with exocyst and septins regulates cell separation in fission yeast. *Microbiology (Reading, England)*, vol. 161 (Pt 5), pp. 948-959
- Perez, P. & Rincón, S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *The Biochemical Journal*, vol. 426 (3), pp. 243-253
- Perez, P., Soto, T., Gómez-Gil, E. & Cansado, J. (2019). Functional interaction between Cdc42 and the stress MAPK signaling pathway during the regulation of fission yeast polarized growth. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*,

- Piala, A.T., Humphreys, J.M. & Goldsmith, E.J. (2014). MAP kinase modules: the excursion model and the steps that count. *Biophysical Journal*, vol. 107 (9), pp. 2006–2015
- Pinar, M., Coll, P.M., Rincón, S.A. & Pérez, P. (2008). Schizosaccharomyces pombe Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 19 (4), pp. 1727–1738
- Plouffe, S.W., Meng, Z., Lin, K.C., Lin, B., Hong, A.W., Chun, J.V. & Guan, K.-L. (2016). Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Molecular Cell*, vol. 64 (5), pp. 993–1008
- Pollard, L.W., Onishi, M., Pringle, J.R. & Lord, M. (2012). Fission yeast Cyk3p is a transglutaminase-like protein that participates in cytokinesis and cell morphogenesis. *Molecular biology of the cell*, vol. 23 (13), pp. 2433–2444
- Pollard, T.D. (2017). Nine unanswered questions about cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, vol. 216 (10), pp. 3007–3016
- Pollard, T.D. & O'Shaughnessy, B. (2019). Molecular Mechanism of Cytokinesis. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 88 (1), p. annurev-biochem-062917-012530
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews. Cancer*, vol. 6 (10), pp. 789–802
- Proctor, S.A., Minc, N., Boudaoud, A. & Chang, F. (2012). Contributions of Turgor Pressure, the Contractile Ring, and Septum Assembly to Forces in Cytokinesis in Fission Yeast. *Current Biology*, vol. 22 (17), pp. 1601–1608
- Pu, K.-M., Akamatsu, M. & Pollard, T.D. (2015). The septation initiation network controls the assembly of nodes containing Cdr2p for cytokinesis in fission yeast. *Journal of Cell Science*, vol. 128 (3), pp. 441–446
- Quinn, J., Findlay, V.J., Dawson, K., Millar, J.B.A., Jones, N., Morgan, B.A. & Toone, W.M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13 (3), pp. 805–816
- Rachfall, N., Johnson, A.E., Mehta, S., Chen, J.-S. & Gould, K.L. (2014). Cdk1 promotes cytokinesis in fission yeast through activation of the septation initiation network. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 25 (15), pp. 2250–2259
- Ren, L., Willet, A.H., Roberts-Galbraith, R.H., McDonald, N.A., Feoktistova, A., Chen, J.-S., Huang, H., Guillen, R., Boone, C., Sidhu, S.S., Beckley, J.R. & Gould, K.L. (2015). The Cdc15 and Imp2 SH3 domains cooperatively scaffold a network of proteins that redundantly ensure efficient cell division in fission yeast. (Lew, D. J., ed.) *Molecular Biology of the Cell*, vol. 26 (2), pp. 256–269
- Revilla-Guarinos, M.T., Martín-García, R., Villar-Tajadura, M.A., Estravis, M., Coll, P.M. & Pérez, P. (2016). Rga6 is a Fission Yeast Rho GAP Involved in Cdc42 Regulation of Polarized Growth. *Molecular Biology of the Cell*,
- Ribas, J.C. & Cortés, J.C.G. (2016). Imaging Septum Formation by Fluorescence Microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1369, pp. 73–85
- Ribas, J.C., Diaz, M., Duran, A. & Pere, P. (1991). Isolation and characterization of Schizosaccharomyces pombe mutants defective in cell wall (1-3)beta-D-glucan. *Journal of Bacteriology*, vol. 173 (11), pp. 3456–3462
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M. & Wedlich-Soldner, R. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods*, vol. 5 (7), pp. 605–607
- Rincon, S.A., Bhatia, P., Bicho, C., Guzman-Vendrell, M., Fraiser, V., Borek, W.E., Alves, F. de L., Dingli, F., Loew, D., Rappsilber, J., Sawin, K.E., Martin, S.G. & Paoletti, A. (2014). Pom1 regulates the assembly of Cdr2-Mid1 cortical nodes for robust spatial control of cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, vol. 206 (1), pp. 61–77
- Rincon, S.A., Estravis, M., Dingli, F., Loew, D., Tran, P.T. & Paoletti, A. (2017). SIN-Dependent Dissociation of the SAD Kinase Cdr2 from the Cell Cortex Resets the Division Plane. *Current biology: CB*, vol. 27 (4), pp. 534–542

- Rincon, S.A. & Paoletti, A. (2016). Molecular control of fission yeast cytokinesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 53, pp. 28–38
- Rispail, N., Soanes, D.M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., Perez-Nadales, E., Poli, A., Sartorel, E., Valiante, V., Yang, M., Beffa, R., Brakhage, A.A., Gow, N.A.R., Kahmann, R., Lebrun, M.-H., Lenasi, H., Perez-Martin, J., Talbot, N.J., Wendland, J. & Di Pietro, A. (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal genetics and biology: FG & B*, vol. 46 (4), pp. 287–298
- Roberts-Galbraith, R.H., Chen, J.-S., Wang, J. & Gould, K.L. (2009). The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *The Journal of Cell Biology*, vol. 184 (1), pp. 113–127
- Roberts-Galbraith, R.H., Ohi, M.D., Ballif, B.A., Chen, J.-S., McLeod, I., McDonald, W.H., Gygi, S.P., Yates, J.R. & Gould, K.L. (2010). Dephosphorylation of F-BAR protein Cdc15 modulates its conformation and stimulates its scaffolding activity at the cell division site. *Molecular Cell*, vol. 39 (1), pp. 86–99
- Rodríguez-Gabriel, M.A. & Russell, P. (2005). Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, vol. 4 (8), pp. 1396–1402
- Roncero, C. & Durán, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology*, vol. 163 (3), pp. 1180–1185
- Roncero, C. & Sánchez, Y. (2010). Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum. *Yeast (Chichester, England)*, vol. 27 (8), pp. 521–530
- Rosenberg, J.A., Tomlin, G.C., McDonald, W.H., Snyderman, B.E., Muller, E.G., Yates, J.R. & Gould, K.L. (2006). Ppc89 links multiple proteins, including the septation initiation network, to the core of the fission yeast spindle-pole body. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17 (9), pp. 3793–3805
- Rossmann, K.L., Der, C.J. & Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 6 (2), pp. 167–180
- Rossmann, K.L. & Sondek, J. (2005). Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 30 (4), pp. 163–165
- Rüthnick, D. & Schiebel, E. (2016). Duplication of the Yeast Spindle Pole Body Once per Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 36 (9), pp. 1324–1331
- Sabatinos, S.A. & Forsburg, S.L. (2010). Molecular Genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 759–795.
- Salas-Pino, S. & Daga, R.R. (2019). Spatiotemporal control of spindle disassembly in fission yeast. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 76 (18), pp. 3543–3551
- Salat-Canela, C., Paulo, E., Sánchez-Mir, L., Carmona, M., Ayté, J., Oliva, B. & Hidalgo, E. (2017). Deciphering the role of the signal- and Sty1 kinase-dependent phosphorylation of the stress-responsive transcription factor Atf1 on gene activation. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 292 (33), pp. 13635–13644
- Sánchez-Mir, L., Franco, A., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Villar-Tajadura, M.A., Soto, T., Pérez, P., Gacto, M. & Cansado, J. (2012). Biological Significance of Nuclear Localization of Mitogen-activated Protein Kinase Pmk1 in Fission Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287 (31), pp. 26038–26051
- Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Madrid, M., Viana, R.A., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P. & Cansado, J. (2014). Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS One*, vol. 9 (1), p. e88020
- Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H. & Sugiura, R. (2009). Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 20 (9), pp. 2473–2485

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, vol. 9 (7), pp. 676–682
- Schmidt, S., Sohrmann, M., Hofmann, K., Woollard, A. & Simanis, V. (1997). The Spg1p GTPase is an essential, dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes & Development*, vol. 11 (12), pp. 1519–1534
- Sengar, A.S., Markley, N.A., Marini, N.J. & Young, D. (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17 (7), pp. 3508–3519
- Sethi, K., Palani, S., Cortés, J.C.G., Sato, M., Sevugan, M., Ramos, M., Vijaykumar, S., Osumi, M., Naqvi, N.I., Ribas, J.C. & Balasubramanian, M. (2016). A New Membrane Protein Sbg1 Links the Contractile Ring Apparatus and Septum Synthesis Machinery in Fission Yeast. *PLoS Genetics*, vol. 12 (10). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006383>
- Shimoda, C. (2004). Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *Journal of Cell Science*, vol. 117 (Pt 3), pp. 389–396
- Shiozaki, K. & Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature*, vol. 378 (6558), pp. 739–743
- Shiozaki, K. & Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes & Development*, vol. 10 (18), pp. 2276–2288
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. & Russell, P. (1998). Heat stress activates fission yeast Spc1/StyI MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 9 (6), pp. 1339–1349
- Simanis, V. (2015). Pombe's thirteen - control of fission yeast cell division by the septation initiation network. *Journal of Cell Science*, vol. 128 (8), pp. 1465–1474
- Skau, C.T. & Kovar, D.R. (2010). Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. *Current biology: CB*, vol. 20 (16), pp. 1415–1422
- Sohrmann, M., Schmidt, S., Hagan, I. & Simanis, V. (1998). Asymmetric segregation on spindle poles of the *Schizosaccharomyces pombe* septum-inducing protein kinase Cdc7p. *Genes & Development*, vol. 12 (1), pp. 84–94
- Soto, T., Beltrán, F.F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J.B.A., Vicente-Soler, J., Cansado, J. & Gacto, M. (2002). Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry*, vol. 269 (20), pp. 5056–5065
- Soto, T., Villar-Tajadura, M.A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P. & Cansado, J. (2010). Rga4 Modulates the Activity of the Fission Yeast Cell Integrity MAPK Pathway by Acting as a Rho2 GTPase-activating Protein. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285 (15), pp. 11516–11525
- Sparks, C.A., Mophew, M. & McCollum, D. (1999). Sid2p, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, vol. 146 (4), pp. 777–790
- Stachowiak, M.R., Laplante, C., Chin, H.F., Guirao, B., Karatekin, E., Pollard, T.D. & O'Shaughnessy, B. (2014). Mechanism of cytokinetic contractile ring constriction in fission yeast. *Developmental Cell*, vol. 29 (5), pp. 547–561
- Stark, B.C., Sladewski, T.E., Pollard, L.W. & Lord, M. (2010). Tropomyosin and myosin-II cellular levels promote actomyosin ring assembly in fission yeast. *Molecular biology of the cell*, vol. 21 (6), pp. 989–1000
- Sugawara, T., Takahashi, S., Osumi, M. & Ohno, N. (2004). Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, vol. 339 (13), pp. 2255–2265
- Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S.O. & Kuno, T. (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature*, vol. 424 (6951), pp. 961–965
- Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H. & Kuno, T. (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*, vol. 399 (6735), pp. 479–483

- Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M. & Kuno, T. (1998). pmp1+, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *The EMBO Journal*, vol. 17 (1), pp. 140-148
- Swulius, M.T., Nguyen, L.T., Ladinsky, M.S., Ortega, D.R., Aich, S., Mishra, M. & Jensen, G.J. (2018). Structure of the fission yeast actomyosin ring during constriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 115 (7), pp. E1455-E1464
- Taira, K., Umikawa, M., Takei, K., Myagmar, B.-E., Shinzato, M., Machida, N., Uezato, H., Nonaka, S. & Kariya, K. (2004). The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279 (47), pp. 49488-49496
- Tajadura, V. (2004). *Caracterización de rgf3+: regulador de Rho1p en Schizosaccharomyces pombe*. (Tesis doctoral). Universidad de Salamanca.
- Tajadura, V., García, B., García, I., García, P. & Sánchez, Y. (2004). Schizosaccharomyces pombe Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall beta-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *Journal of Cell Science*, vol. 117 (Pt 25), pp. 6163-6174
- Takada, H., Nishida, A., Domae, M., Kita, A., Yamano, Y., Uchida, A., Ishiwata, S., Fang, Y., Zhou, X., Masuko, T., Kinoshita, M., Kakehi, K. & Sugiura, R. (2010). The Cell Surface Protein Gene ecm33+ Is a Target of the Two Transcription Factors Atf1 and Mbx1 and Negatively Regulates Pmk1 MAPK Cell Integrity Signaling in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 21 (4), pp. 674-685
- Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Kuno, T. & Sugiura, R. (2007). Atf1 Is a Target of the Mitogen-activated Protein Kinase Pmk1 and Regulates Cell Integrity in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 18 (12), pp. 4794-4802
- Tanaka, K., Petersen, J., MacIver, F., Mulvihill, D.P., Glover, D.M. & Hagan, I.M. (2001). The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in Schizosaccharomyces pombe. *The EMBO Journal*, vol. 20 (6), pp. 1259-1270
- Tasto, J.J., Morrell, J.L. & Gould, K.L. (2003). An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *The Journal of cell biology*, vol. 160 (7), pp. 1093-1103
- Tebbs, I.R. & Pollard, T.D. (2013). Separate roles of IQGAP Rng2p in forming and constricting the Schizosaccharomyces pombe cytokinetic contractile ring. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 24 (12), pp. 1904-1917
- Thiyagarajan, S., Munteanu, E.L., Arasada, R., Pollard, T.D. & O'Shaughnessy, B. (2015). The fission yeast cytokinetic contractile ring regulates septum shape and closure. *Journal of Cell Science*, vol. 128 (19), pp. 3672-3681
- Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. & Kuno, T. (1996). The fission yeast pmk1+ gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16 (12), pp. 6752-6764
- Toda, T., Shimanuki, M. & Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *The EMBO journal*, vol. 12 (5), pp. 1987-1995
- Trautmann, S. & McCollum, D. (2005). Distinct Nuclear and Cytoplasmic Functions of the S. pombe Cdc14-like Phosphatase Clp1p/Flp1p and a Role for Nuclear Shuttling in Its Regulation. *Current Biology*, vol. 15 (15), pp. 1384-1389
- Trautmann, S., Wolfe, B.A., Jorgensen, P., Tyers, M., Gould, K.L. & McCollum, D. (2001). Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Current Biology*, vol. 11 (12), pp. 931-940
- Ueyama, T. (2019). Rho-Family Small GTPases: From Highly Polarized Sensory Neurons to Cancer Cells. *Cells*, vol. 8 (2)

- Vavylonis, D., Wu, J.-Q., Hao, S., O'Shaughnessy, B. & Pollard, T.D. (2008). Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 319 (5859), pp. 97-100
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294 (5545), pp. 1299-1304
- Viana, R.A., Pinar, M., Soto, T., Coll, P.M., Cansado, J. & Pérez, P. (2013). Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics*, vol. 195 (2), pp. 421-432
- Villar-Tajadura, M.A., Coll, P.M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B. & Pérez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Molecular Microbiology*, vol. 70 (4), pp. 867-881
- Wachowicz, P., Chasapi, A., Krapp, A., Cano Del Rosario, E., Schmitter, D., Sage, D., Unser, M., Xenarios, I., Rougemont, J. & Simanis, V. (2015). Analysis of *S. pombe* SIN protein association to the SPB reveals two genetically separable states of the SIN. *Journal of Cell Science*, vol. 128 (4), pp. 741-754
- Wagner, E. & Glotzer, M. (2016). Local RhoA activation induces cytokinetic furrows independent of spindle position and cell cycle stage. *The Journal of Cell Biology*, vol. 213 (6), pp. 641-649
- Wang, N., Wang, M., Zhu, Y.-H., Grosel, T.W., Sun, D., Kudryashov, D.S. & Wu, J.-Q. (2015). The Rho-GEF Gef3 interacts with the septin complex and activates the GTPase Rho4 during fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 26 (2), pp. 238-255
- Warbrick, E. & Fantès, P.A. (1991). The wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal*, vol. 10 (13), pp. 4291-4299
- Wennerberg, K., Rossman, K.L. & Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, vol. 118 (Pt 5), pp. 843-846
- Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W.M., Shieh, J.C., Toda, T., Millar, J.B. & Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & Development*, vol. 10 (18), pp. 2289-2301
- Willet, A.H., DeWitt, A.K., Beckley, J.R., Clifford, D.M. & Gould, K.L. (2019). NDR Kinase Sid2 Drives Anillin-like Mid1 from the Membrane to Promote Cytokinesis and Medial Division Site Placement. *Current biology: CB*, vol. 29 (6), pp. 1055-1063.e2
- Willet, A.H., McDonald, N.A. & Gould, K.L. (2015). Regulation of contractile ring formation and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 28, pp. 46-52
- Wood, E. & Nurse, P. (2015). Sizing up to divide: mitotic cell-size control in fission yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 31, pp. 11-29
- Wu, J.-Q., Kuhn, J.R., Kovar, D.R. & Pollard, T.D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Developmental Cell*, vol. 5 (5), pp. 723-734
- Wu, J.-Q. & Pollard, T.D. (2005). Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 310 (5746), pp. 310-314
- Wu, J.-Q., Sirotkin, V., Kovar, D.R., Lord, M., Beltzner, C.C., Kuhn, J.R. & Pollard, T.D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *The Journal of Cell Biology*, vol. 174 (3), pp. 391-402
- Xu, W. & He, X. (2010). DEEP Insights through the DEP Domain. *Structure (London, England: 1993)*, vol. 18 (10), pp. 1223-1225
- Yamashita, A., Sakuno, T., Watanabe, Y. & Yamamoto, M. (2017). Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Meiosis. *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2017 (9), p. pdb.top079855
- Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X. & 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*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278 (49), pp. 48821-48830

- Ye, Y., Lee, I.-J., Runge, K.W. & Wu, J.-Q. (2012). Roles of putative Rho-GEF Gef2 in division-site positioning and contractile-ring function in fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23 (7), pp. 1181-1195
- Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A. & Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 319 (5860), pp. 210-213
- Zaitsevskaya-Carter, T. & Cooper, J.A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *The EMBO Journal*, vol. 16 (6), pp. 1318-1331
- Zambon, P., Palani, S., Kamnev, A. & Balasubramanian, M.K. (2017). Myo2p is the major motor involved in actomyosin ring contraction in fission yeast. *Current biology: CB*, vol. 27 (3), pp. R99-R100
- Zheng, S., Dong, F., Rasul, F., Yao, X., Jin, Q., Zheng, F. & Fu, C. (2018). Septins regulate the equatorial dynamics of the separation initiation network kinase Sid2p and glucan synthases to ensure proper cytokinesis. *The FEBS Journal*, vol. 285 (13), pp. 2468-2480
- Zhou, X., Ma, Y., Kato, T. & Kuno, T. (2012). A Measurable Activation of the bZIP Transcription Factor Atf1 in a Fission Yeast Strain Devoid of Stress-activated and Cell Integrity Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Activities. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287 (28), pp. 23434-23439
- Zhou, Z., Munteanu, E.L., He, J., Ursell, T., Bathe, M., Huang, K.C. & Chang, F. (2015). The contractile ring coordinates curvature-dependent septum assembly during fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 26 (1), pp. 78-90
- Zhu, Y.-H., Ye, Y., Wu, Z. & Wu, J.-Q. (2013). Cooperation between Rho-GEF Gef2 and its binding partner Nod1 in the regulation of fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 24 (20), pp. 3187-3204