



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Señalización por nutrientes y autofagia en
Schizosaccharomyces pombe

D. Armando Jesús Pérez Díaz

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Señalización por nutrientes y autofagia en
Schizosaccharomyces pombe

Autor: D. Armando Jesús Pérez Díaz

Director/es: D. José Cansado Vizoso y D.^a María Isabel Madrid
Mateo.



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Armando Jesús Pérez Díaz

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Molecular y Biotecnología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Señalización por nutrientes y autofagia en *Schizosaccharomyces pombe*.

y dirigida por,

D./Dña. José Cansado Vizoso

D./Dña. María Isabel Madrid Mateo

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 19 de septiembre de 2023

Firmado por Armando Jesús Pérez
Díaz el día 19/09/2023 con un
certificado emitido por FNMT

Fdo.: Armando Jesús Pérez Díaz

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar estas palabras con el discurso que hizo Ana Milán en la entrega de los premios Ondas, pues representa cada instante de mi vida y, sobre todo, en esta última etapa. El discurso dice así: «Estoy necesitando toda mi vida para aprender a hacer las cosas medio bien. Quizás por eso siempre me ha gustado el alma de la gente rara, los folios arrugados. Porque solo hay una manera de ser un folio liso: no saliendo del paquete. Nosotros estamos llenos de dudas, de errores y de fuegos artificiales. Y aunque a veces no sabemos ni por dónde nos da el aire, nos atrevemos a volar. Nosotros, que llevamos el mapa grabado en forma de cicatrices, somos la sal de la vida, el tequila del día a día y el limón. Este premio (o en este caso, tesis) es para todos aquellos que han compartido sus movidas conmigo. Para todos aquellos que tienen el corazón hecho un nudo y la cabeza en otra parte. Para mi familia y amigos, si es que no son lo mismo. Nos hemos llorado lo malo, brindado lo regular y bebido lo bueno. Hemos cantado en el coche y jugado a las cartas y sobre todo, a todos os he reñido alguna vez. Os quiero con todo mi corazón».

Adquirir esta filosofía no hubiera sido fácil sin el cariño, apoyo, amor y energía de mucha gente, mi gente. Por todo eso, y mucho más, en las líneas siguientes quiero agradecer a todos y cada uno haber sido mi alimento y energía cuando yo flaqueaba. Por esto doy mi reconocimiento y agradecimiento a:

Primeramente, **mi familia**. Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible. Indiscutiblemente, mis padres, ellos han sido la fuerza motriz detrás de todo este trabajo. Sin su esfuerzo, trabajo y sacrificio, nada de esto hubiera sido posible. Y aunque muchas veces no recuerden la palabra «autofagia», ellos han sido mis ganas y energía en todo momento. También mi abuela, que aunque sé que no leerás estas líneas, siempre te estaré agradecido por cuidarme, quererme y animarme. Allá donde estés sigues presente en mi mente, y en mi corazón. Gracias a mi madre y a ti, he llegado a ser quién soy. Finalmente, esta aventura no hubiera sido posible sin mis tíos y primos (Familia De Manuel Díaz), gracias por acogerme en vuestra vida todos estos años, y por haber convertido vuestro hogar en mi hogar.

Aunque haya alquilado un piso, mi domicilio postal durante estos siete años ha sido realmente el Ala A del **departamento** de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología en el Campus de Espinardo de la Universidad de Murcia. Decenas de paquetes de Amazon, Correos y otras compañías así lo certifican. En esos laboratorios he pasado muchos momentos felices, de euforia, de llanto, de rabia y de impotencia; contando, en muchas ocasiones, como único aliciente, con mi pasión por esta línea de investigación que un día comenzó a crecer en mis manos. Esa pasión, mil veces cuestionada, denigrada y pisoteada, ha sido mi escudera fiel en la lucha contra la precariedad. Ella me daba las fuerzas para luchar

por un sueño, hubiera o no apoyo y comprensión. Ella me ha hecho fuerte, me ha enseñado a transformarme y a seguir luchando por quien quiero ser, y por vivir en paz conmigo mismo, sin cumplir las expectativas de nadie. Primeramente, debo agradecer a Mariano Gacto haber sido el primero en fijarse en mí y en mi potencial, acogiéndome cuando nadie lo hacía. Una vez dentro del departamento, conocí a los que serían los directores de este trabajo. Como en todas las relaciones humanas, con nuestros más y nuestros menos, tanto José Cansado como Marisa Madrid han estado ahí siempre brindándome un trato cordial, formándome y apoyándome cuando atravesaba los momentos más difíciles. Gracias por aportarme siempre un punto de vista crítico y objetivo, por vuestra apertura a la innovación docente y a la divulgación.

Asimismo, gracias también a Jero, Alejandro y Tere, por todo su asesoramiento, su apertura a la divulgación y por sus conversaciones que trascendían lo experimental y nos ubicaban en la vida real. No creo que esta etapa hubiera sido igual sin las conversaciones imprevistas de Tere en el laboratorio, y sin sus consejos. Por otro lado, en esta etapa hemos sido muchos, pero en realidad nos quedamos pocos; Bea, mi mentora, compañera, amiga y hasta psicóloga; aunque empezaste teniendo pesadillas conmigo, a día de hoy ambos hemos aprendido mucho mutuamente de nuestra trayectoria compartida; gracias por todo lo que has hecho siempre por mí. Elisa, gracias por tu compañía, tu asesoramiento, tus silencios y tus territorialismos invasivos amparados en la antigüedad; y gracias por ser una compañera de cante y perreo. Curro, no tengo palabras suficientes para agradecerte que hoy estés leyendo estas líneas. Ambos sabemos lo que ha costado e implicado este trabajo. Todo el tiempo has sido un apoyo, y todo un maestro en lo experimental y no experimental (echaré de menos las clases de historia y los chistes malos). Adicionalmente, este trabajo se lleva, indirectamente, la esencia de algunos estudiantes de grado, TFG, TFM e incluso tesis que han pasado por el laboratorio. A todos les he enseñado y de todos he aprendido (Juan Zapata, Raquel, David, Abraham, Pablo, Míriam, Mírim Dilara,...). Asimismo, quiero agradecer su trato siempre cordial, ameno y dispuesto a ayudar a otros miembros del departamento: Paco Garro, Juan Carlos Argüelles, Patricia Elio y Antonio Sánchez Amat; así como a sus diversos estudiantes.

Seguidamente, a mi familia murciana, amplia, grande y diferente. Gracias a mis **biomédicos** por escuchar y aguantar mis dramas: Adrián, Sara, Pablo, Reyes, Paloma, Elena y Elsa. En especial, a María de los Ángeles (MaríA), por hacer de Cartagena mi tercer hogar, por abrirme su casa y a su familia como si fuéramos hermanos (gracias por todo Ángeles y Lydia). MaríA has sido todo un apoyo incondicional durante este tiempo, gracias por todos los momentos vividos y por los que aún nos quedan por vivir. También a Elena sin hache, pero siempre Helen; has sido mi compañera de viajes, aventuras y anécdotas durante gran parte de mi vida murciana, pero ni Torquay, ni ningún otro lado, jamás, nos mantendrá alejados.

Celia, no tengo palabras para agradecerte ser la editora de todos mis trabajos, te debo mil y una meriendas, y aun así nunca será recompensa para tu amistad. Y aunque, la emoción no es exactamente tu fuerte, contigo he vivido grandes momentos. Finalmente, cómo no, Ghizlane. A ti en especial quiero agradecerte todos estos años de amistad. Hemos sido la tormenta perfecta, no la veías venir, tiene su momento de destrucción que parece que es irreparable, pero cuando amaina te permite nadar en la más absoluta calma. Gracias por todo, amiga, compañera, confidente, paño de lágrimas de tristeza y alegría, compañera de viajes y aventuras, y un largo etcétera. Decirte gracias, es decir poco, has aguantado este trabajo de investigación y sobre todo a mí desde el minuto uno. Eres y has sido un apoyo fundamental en todos los ámbitos de mi vida durante todo este tiempo, pues sin nuestros paseos, lloros, risas, abrazos, anécdotas y partidas de parchís, no estoy seguro de que hubiera llegado tan lejos. Ojalá todos tuvieran la ocasión de hacer su tesis doctoral en tu compañía.

Gracias a mis **aspanpalitos**, pues lo que ASPANPAL ha unido que no lo separe nadie. Gracias a Maka, Inma, Pedro, Yasmin, Laurita, Juan Antonio, Paula y Juanete; por estar siempre ahí, por regalarme momentos y experiencias inigualables. Solo ustedes pueden marcar de esta forma tan extraordinaria la vida de un canario. Entre todos, quiero brindar un reconocimiento especial a Mariajo y Cristy (Cristina Riquelme); vuestra luz y forma de brillar me ha iluminado en mis momentos más oscuros. Siempre habéis sacado un rato para escucharme, animarme y acompañarme en esta ardua senda. Gracias por ver dentro de mí, encender mi mecha cuando la daba por apagada y por hacerme ver qué hay más allá.

También quiero dar las gracias a mi coach emocional Cristina (AGO), a mi descubridora y mentora, Mavi; y a las dos Marías (Plumier) por vuestra amistad, cariño y confianza todo este tiempo. Gracias por permanecer a mi lado, por escucharme e iluminarme en la docencia, y por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos, siendo una fuente de energía y vitalidad todo este tiempo.

Indudablemente, quiero agradecer a Belén, Mary, Víctor, María del Mar, Emilio y Álvaro; por ser los mejores **compañeros y compañeras de piso** que se pudiera tener, y por ayudarme a evadirme del estrés todos los días que vivimos juntos. También a mis **andarines**, Artur, Valentyn, Aida, Juanma y Carlos; gracias por todos esos senderos y excursiones, por escucharme y motivarme siempre; y por acompañarme a descubrir Murcia.

Asimismo, al resto de mi **familia canaria**, los que siempre han estado ahí, desde pequeño hasta la actualidad. Habéis vivido conmigo un viaje de 27 años, algunos un poco menos; pero sois merecedores de este reconociendo. Gracias a mis mejores amigas Tamara y Laura, por escucharme siempre y apoyarme en todo momento; por esos secuestros exprés y excursiones a las tantas de la noche, por las sesiones de pipas-playa, por esas papas en la

Mancha, por todos esos llantos de alegría y por esos abrazos de consuelo. Gracias también a mi prima Yasmina y a Diego, que me han acogido siempre que lo he necesitado en su casa y en su vida. Gracias por esos días senderos y de ludopatía.

Adicionalmente, gracias a mis padrinos Rosi y Francis y familia, por todo, desde cuidar de mis padres en mi ausencia, a ser una fuente de inspiración, tranquilidad, serenidad y ánimo todo este tiempo. También a Chachi y a su familia, gracias por ayudar, y velar por el bienestar de mi madre en los momentos más difíciles. Gracias por vuestra hospitalidad, cariño y apoyo.

Finalmente, gracias también a muchas otras personas que han estado ahí: María (Salamanca), Alba, Raquel, Daniel, Ramiro (Madrid), Ángel (Madrid), Mariela, Suso, Gloria, Alex, Juan, Isabel, Daniela y mi abuela Carmen. Gracias por todos los momentos vividos, por vuestro apoyo, energía, motivación y por hacerme feliz cuando no tenía demasiadas razones para ello.

«Soy el resultado de lo que una gran mujer quiso hacer de mí»

Thomas A Edison.

**Señalización por nutrientes y
autofagia en
*Schizosaccharomyces pombe***

El presente proyecto de tesis ha sido realizado en el Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia bajo la dirección y supervisión de D. José Cansado Vizoso y Dña. María Isabel Madrid Mateo, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología, por el Graduado Armando Jesús Pérez Díaz.

Murcia, 19 de septiembre de 2023

Este trabajo presentado en esta memoria ha sido financiado por las ayudas procedentes de:

Título del proyecto: MAP quinasas y sensibilidad al quórum como reguladores de respuestas adaptativas frente al estrés, la diferenciación y el dimorfismo en levaduras con fisión.

- **Referencia:** 20856/PI/18
- **Entidad financiadora:** Fundación Séneca (Región de Murcia)
- **Entidades participantes:** Universidad de Murcia

Título del proyecto: Mecanismos de control de la citocinesis modulados por señales ambientales.

- **Referencia:** PID2020-112569GB-I00
- **Entidad financiadora:** Ministerio de Ciencia e Innovación
- **Entidades participantes:** Universidad de Murcia.

Armando Jesús Pérez Díaz ha realizado la tesis doctoral financiada por una ayuda para la Formación del Profesorado Universitario (FPU) por la Universidad de Murcia.

RESUMEN

La macroautofagia/autofagia es una respuesta fisiológica adaptativa esencial en eucariotas que se induce ante un déficit de nutrientes esenciales, como la glucosa, la fuente de carbono y energía más comúnmente usada por la mayoría de las células. Aunque los mecanismos moleculares que inducen la autofagia ante la falta de glucosa se han explorado ampliamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aún se desconocen numerosos aspectos sobre cómo está orquestada esta respuesta en la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe*. En esta Tesis Doctoral demostramos que la autofagia de *S. pombe* en respuesta a la limitación de glucosa requiere de efectuar eficazmente una transición del metabolismo fermentativo al respiratorio, así como de una cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial completamente funcional. Además, mostramos que contrario a lo descrito, la vía de señalización de AMPc-PKA es un regulador de la autofagia, actuando como un represor del proceso en presencia de glucosa. Este mecanismo de control mediado por la ruta AMPc-PKA es ejercido tanto a nivel transcripcional, al ser partícipe de la represión catabólica por fuente de carbono (CCR; *Carbon Catabolite Repression*) reprimiendo al factor de transcripción Rst2; como postranscripcional. Adicionalmente mostramos que la vía de señalización de la proteína quinasa activada por estrés (SAPK) es un regulador positivo de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa a nivel transcripcional no solo actuando a través de su principal efector el factor de transcripción Atf1, sino también mediante la fosforilación directa *in vivo* de Rst2. Sorprendentemente, a diferencia de *S. cerevisiae*, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y los componentes de la vía de respuesta al daño del ADN no modulan la autofagia de la levadura de fisión en estas condiciones. Por lo tanto, nuestros datos indican que las vías de señalización que gobiernan la autofagia ante la falta de glucosa han evolucionado de manera diferente en *S. pombe*, confirmando la existencia de un mecanismo sofisticado y multifacético que controla esta respuesta esencial para la supervivencia celular.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	31
ÍNDICE DE FIGURAS	33
LISTADO DE ABREVIATURAS	37
Introducción	43
1.Adaptación a la disponibilidad de glucosa: quiescencia y modulación del metabolismo energético en <i>S. pombe</i>.	45
1.1.La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como modelo para el estudio del cambio diaúxico y la autofagia en la adaptación a la escasez de glucosa.	45
1.1.1.Ciclo de vida de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	46
1.1.2.Estrategia de supervivencia frente a la escasez de glucosa en levaduras: la fase estacionaria y la quiescencia como respuesta adaptativa.	49
1.2.Adaptación metabólica de <i>S. pombe</i> a la escasez de glucosa.	51
1.2.1.Crecimiento en presencia de glucosa en <i>S. pombe</i>: el efecto Crabtree.	52
1.2.1.1.Incorporación y detección de la glucosa en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	53
1.2.1.2.Glucólisis y fermentación en <i>S. pombe</i> : una visión general.	55
1.2.1.3.La ruta de las pentosas fosfato en <i>S. pombe</i> : una estrategia fisiológica para mantener el flujo glicolítico, combatir el estrés oxidativo y la formación de precursores biosintéticos.	57
1.2.1.4.Reoxidación del NADH citosólico y su conexión con el metabolismo del glicerol en <i>S. pombe</i> : una visión general.....	59
1.2.2.Adaptación a la escasez de glucosa: cambio diaúxico, metabolismo de fuentes de carbono alternativas y metabolismo respiratorio en <i>S. pombe</i>.	61
1.2.2.1.Metabolismo de fuentes de carbono alternativas en <i>S. pombe</i>	62
1.2.2.1.1.Metabolismo del etanol o acetato en <i>S. pombe</i>	62
1.2.2.1.2.Metabolismo del glicerol en <i>S. pombe</i>	64
1.2.2.2.Metabolismo respiratorio: la contribución clave del metabolismo del piruvato al ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa en <i>S. pombe</i>	66
1.2.2.2.1.Metabolismo del piruvato en <i>S. pombe</i>	66
1.2.2.2.2.Ciclo de Krebs en <i>S. pombe</i>	66
1.2.2.2.3.Fosforilación oxidativa (OXPHOS) en <i>S. pombe</i>	68

1.2.3. Señalización molecular tras la escasez de glucosa y su impacto en la adaptación celular en <i>S. pombe</i>: una visión general.....	71
2. Adaptación al déficit de glucosa en levaduras: el papel de la autofagia.	72
2.1. La autofagia: un proceso de reciclaje intracelular fundamental en la adaptación celular... 72	
2.1.1. Tipos de autofagia: Macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas	73
2.2. Macroautofagia en levaduras: un estudio comparativo en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pombe</i>.	74
2.2.1. La formación del autofagosoma en <i>S. cerevisiae</i>.	75
2.2.1.1. Maquinaria de la autofagia: Complejos formados por las proteínas Atg.....	75
2.2.1.2. Etapas del ensamblado del autofagosoma en <i>S. cerevisiae</i>.	78
2.2.1.3. Inducción y nucleación del fagóforo en <i>S. cerevisiae</i>.	78
2.2.1.4. Expansión y cierre del fagóforo.	81
2.2.1.4.1. La proteína Atg9: modulación del transporte de membranas al PAS y su actividad como escramblasa de lípidos.	81
2.2.1.4.2. Sistema de la fosfatidilinositol 3 – quinasa de clase III (PI3KC3).	84
2.2.1.4.3. Complejo Atg2–Atg18: un complejo regulador del transporte de lípidos y la formación del autofagosoma.	85
2.2.1.4.4. Los sistemas de conjugación similares a ubiquitina Atg12 y Atg8.....	87
2.2.1.5. Maduración del autofagosoma en <i>S. cerevisiae</i>.	89
2.2.1.6. Fusión y degradación del autofagosoma en la vacuola.	90
2.2.2. Mecanismos de ensamblaje del autofagosoma en <i>S. pombe</i>: similitudes y diferencias con <i>S. cerevisiae</i> y eucariotas superiores	90
2.2.2.1. Análisis comparativo de los componentes centrales de la autofagia en <i>S. cerevisiae</i>, <i>S. pombe</i> y eucariotas superiores.....	90
2.2.2.2. El ensamblaje del autofagosoma en <i>S. pombe</i>: una perspectiva evolutiva hacia eucariotas superiores.	91
2.2.2.2.1. Características particulares del complejo de iniciación de la autofagia en <i>S. pombe</i>.	91
2.2.2.2.2. Características particulares de la expansión del fagóforo en <i>S. pombe</i>.....	93
2.2.2.2.2.1. Proteína Atg9 en la autofagia: transporte de membranas y traslocación de lípidos en <i>S. pombe</i>.	93
2.2.2.2.2.2. Complejo I de la fosfatidilinositol-3 quinasa de clase III en <i>S. pombe</i>.....	93

3.2.2.4.1. Interconexión de la ruta AMPc-PKA con el apagado de TORC1 en respuesta a la escasez nutricional en levaduras.	110
3.2.2.4.2. Regulación de la autofagia mediante la vía AMPc-PKA: comparativa entre <i>S. cerevisiae</i> , mamíferos y particularidades en <i>S. pombe</i>	111
3.2.3. Ruta de señalización mediada por proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK): Respuesta frente al estrés y adaptación celular en eucariotas.	112
3.2.3.1. Ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK).	113
3.2.3.1.1. La ruta SAPK en <i>S. pombe</i> : composición y señalización.	113
3.2.3.1.2. Reguladores negativos de la ruta SAPK.	116
3.2.3.1.3. Efectores de la ruta SAPK.	116
3.2.3.1.3.1. Modulando la expresión génica en respuesta a estrés: el factor de transcripción Atf1 en <i>S. pombe</i>	117
3.2.3.2. Regulación de la expresión de <i>fbp1+</i> : paradigma de la interconexión entre las vías de señalización AMPK, AMPc-PKA y SAPK.	118
3.2.3.3. Regulación de la autofagia dependiente de las rutas de señalización de MAPK.	119
3.2.4. Otras vías de señalización implicadas en la regulación transcripcional y traduccional de la autofagia en levaduras.	120
3.3. Implicaciones de la autofagia en la fisiología de las levaduras: reposición de recursos nitrogenados y homeostasis energética.	120
3.3.1. Interrelación entre la respiración mitocondrial y la autofagia: una vía por descubrir en <i>S. pombe</i>	121
3.3.1.1. Regulación de la respiración mitocondrial dependiente de la autofagia en <i>S. cerevisiae</i>	122
Objetivos	125
Materiales y Métodos	129
1. Microorganismos empleados en este trabajo.	131
1.1. Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	131
1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	134
2. Condiciones de crecimiento.	135
2.1. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de <i>S. pombe</i>	135
2.2. Tratamientos de estrés nutricional en <i>S. pombe</i>	136
2.3. Medio de cultivo empleados para el crecimiento de <i>E. coli</i>	138

3. Condiciones de cultivo de los microorganismos, estimación del crecimiento y recuento celular.....	138
3.1. Condiciones de cultivo para el crecimiento de <i>S. pombe</i>	138
3.2. Estimación del crecimiento y recuento <i>S. pombe</i>	139
3.3. Condiciones de cultivo para el crecimiento de <i>E. coli</i>	139
4. Ensayos de viabilidad celular.....	139
4.1. Ensayos de crecimiento en gota.	139
4.2. Medición de la viabilidad celular	140
4.3. Medición del envejecimiento cronológico (CLS).	140
5. Construcción de cepas.	140
5.1. Conjugación y aislamiento de ascosporas al azar.	140
5.2. Transformación de <i>S. pombe</i>	141
5.3. Mutagénesis dirigida	142
5.4. Transformación de <i>E. coli</i>	142
6. Técnicas de Manipulación de Ácidos nucleicos.	143
6.1. Obtención y manipulación de muestras de ADN.	143
6.1.1.Obtención de ADN genómico de <i>S. pombe</i>	143
6.1.2.Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	143
6.1.3.Medición de la concentración de ADN total.	143
6.1.4.Digestión del ADN con enzimas de restricción.	144
6.1.5.Electroforesis de ADN en geles de agarosa, y purificación de ADN a partir de los geles.	144
6.1.6.Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	144
6.1.6.1.Comprobación del genotipo de los transformantes mediante PCR.	145
6.2. Analisis de Expresión génica.	145
6.2.1.Experimentos de micromatrices (<i>Microarray</i>) y análisis de enriquecimiento.	145
6.2.2.Síntesis de ADNc y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RtqPCR).	146
7. Técnicas de Manipulación de Proteínas.	146
7.1. Obtención de extractos celulares y preparación de muestras.	146
7.2. Electroforesis en SDS-PAGE.	147
7.3. Western blot.	148

7.3.1. Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.	148
7.3.2. Inmunodetección de las proteínas fijadas en membranas de nitrocelulosa.	148
7.4. Tratamiento con fosfatasa lambda (Desfosforilación).	149
7.5. Cuantificación y reproducibilidad de Western blot.	150
8. Medición del consumo de oxígeno.	150
9. Microscopía.	150
Resultados	151
1. El déficit de glucosa es un estímulo proautofágico en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.	153
2. Activación de Atg1: Una respuesta diferencial frente a la limitación y la inanición de glucosa en <i>S. pombe</i>.	160
3. La respiración mitocondrial es fundamental para la inducción de la autofagia ante un déficit de glucosa en <i>S. pombe</i>.	163
4. La ruta de señalización AMPc-PKA regula negativamente la inducción de la autofagia en <i>S. pombe</i>.	169
4.1. El factor de transcripción Rst2 regula positivamente la autofagia dependiente de la respiración en <i>S. pombe</i> en respuesta al déficit de glucosa.	176
4.2. La inhibición de la señalización de la ruta AMPc-PKA contribuye a aumentar la longevidad celular en <i>S. pombe</i> al promover la inducción de la autofagia.	179
5. La AMPK no está implicada en la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en <i>S. pombe</i>.	181
5.1. La represión génica mediada por Scr1 modula la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa.	183
6. La ruta de señalización de MAPK de respuesta a estrés SAPK regula positivamente la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.	184
7. Las vías de señalización nutricional SAPK y AMPc-PKA modulan transcripcionalmente la inducción de la autofagia tras el déficit de glucosa.	187
8. Sty1 modula positivamente la actividad transcripcional de Rst2 y la inducción de autofagia en respuesta al déficit de glucosa.	196
Discusión	205
1. La adaptación a la escasez de glucosa en <i>S. pombe</i>.	207
1.1. La reprogramación metabólica y la autofagia: una aproximación hacia la terapia del cáncer desde la investigación en levaduras.	207

1.2. Desvelando la conexión entre el metabolismo mitocondrial y la inducción de autofagia en <i>S. pombe</i>: una relación nueva y prometedora.	208
1.3. Modulación de la autofagia por las rutas de señalización nutricional en <i>S. pombe</i>: Nuevas perspectivas en la adaptación celular frente a la escasez de glucosa.	210
1.3.1.La ruta AMPc-PKA como reguladora de la autofagia inducida en respuesta a la escasez de glucosa en <i>S. pombe</i>	210
1.3.2.La AMPK no está implicada en la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en <i>S. pombe</i>	211
1.3.2.1.Scr1, diana de la AMPK, está implicado en la regulación de la autofagia inducida en respuesta a la escasez de glucosa en <i>S. pombe</i>	212
1.3.3.Nuevos roles de la vía de señalización SAPK como regulador de la autofagia en <i>S. pombe</i> : Sty1 modula transcripcionalmente la inducción de la autofagia ante la escasez de glucosa a través de Atf1.	212
1.3.4.Interacción cruzada de las vías Pka1-Rst2 y Sty1-Atf1: modulación transcripcional de la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa.	213
1.3.5.Un nuevo mecanismo de la vía SAPK en <i>S. pombe</i> : Modulación de la activación del factor de transcripción Rst2 en respuesta a la escasez de glucosa.	214
1.3.6.Un mecanismo innovador en la regulación de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa.....	214
Conclusiones	217
Conclusiones específicas.....	219
Conclusiones generales.	219
Referencias	220

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Comparativa de las principales proteínas Atg implicadas en la autofagia y sus homólogos en <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> y humanos (Adaptada de Xu & Du, 2022).	77
Tabla 2. Tabla de cepas de <i>S. pombe</i> empleadas en este trabajo.	131
Tabla 3. Tabla de oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	134
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo de uso rutinario para el crecimiento en condiciones de fermentación o respiración, y conjugación de <i>S. pombe</i> (Adaptada de Moreno et al., 1991). ...	135
Tabla 5. Composición de los medios mínimos (EMM) utilizados rutinariamente para los experimentos de estrés nutricional en <i>S. pombe</i> (Adaptada de Moreno et al., 1991).....	137
Tabla 6. Tabla de oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida de Rst2.	142
Tabla 7. Tabla resumen de los anticuerpos y condiciones empleados en este trabajo	148

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	48
Figura 2. Características fisiológicas del ciclo mitótico y la quiescencia en <i>S. pombe</i>	50
Figura 3. Vía glicolítica en <i>S. pombe</i>	56
Figura 4. Interconexión de la glucólisis con la ruta de las pentosas fosfato y la derivación del gluconato en <i>S. pombe</i>	58
Figura 5. Mecanismos de reoxidación del NADH citosólico en <i>S. pombe</i>	60
Figura 6. Metabolismo del glicerol en <i>S. pombe</i>	65
Figura 7. Ciclo de Krebs en <i>S. pombe</i>	67
Figura 8. Cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial en <i>S. pombe</i>	70
Figura 9. Maquinaria central de la autofagia en <i>S. cerevisiae</i>	76
Figura 10. Complejo de iniciación de la maquinaria central de la autofagia.	81
Figura 11. Mecanismo molecular que regula las primeras etapas del ensamblaje del autofagosoma en <i>S. cerevisiae</i>	83
Figura 12. El complejo I de fosfatidilinositol 3-quinasa clase III (PIK3C3) en <i>S. cerevisiae</i>	85
Figura 13. Modelo propuesto de expansión de membrana autofagosomal impulsada por Atg2 atg9.	86
Figura 14. Interacción de los dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina en la lipidación de Atg8.	88
Figura 15. Complejos de la maquinaria central de la autofagia de <i>S. pombe</i>	92
Figura 16. Composición en interacción entre los complejos TORC1 y TORC2 en <i>S. pombe</i> . ..	101
Figura 17. Interacción entre las rutas de TOR y AMPK en <i>S. pombe</i>	105
Figura 18. Ruta de señalización de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (AMPc-PKA) en <i>S. pombe</i>	108
Figura 19. Ruta de señalización de MAPK de respuesta a estrés (SAPK).	115
Figura 20. Regulación de la respiración mitocondrial dependiente de la autofagia en <i>S. cerevisiae</i>	123
Figura 21. Esquema del método de procesamiento de CFP-Atg8 empleado para el análisis de la autofagia en <i>S. pombe</i>	154
Figura 22. Comparativa del flujo autofágico en respuesta a la inanición de glucosa y nitrógeno.	155
Figura 23. El ayuno de glucosa no compromete la viabilidad celular de <i>S. pombe</i> , además la adición de concentraciones limitante de glucosa rescata la inducción autofagia.	156
Figura 24. La limitación de glucosa es un estímulo proautofágico en <i>S. pombe</i>	157
Figura 25. Inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa en <i>S. pombe</i> durante el crecimiento en medios EMM que combinan etanol-glicerol y glucosa-sorbitol como únicas fuentes de carbono disponibles.	159

Figura 26. La autofagia inducida en respuesta a una limitación en la disponibilidad de glucosa requiere de los componentes <i>atg1Δ</i> , <i>atg11Δ</i> , <i>atg4Δ</i> y <i>atg5Δ</i> ; de la maquinaria central de la autofagia.....	161
Figura 27. La cinética de activación de Atg1 difiere entre la limitación y el ayuno completo de glucosa.	162
Figura 28. El tratamiento con Antimicina A (AA) bloquea la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa, pero no de nitrógeno.....	164
Figura 29. El tratamiento con Antimicina A (AA) bloquea la activación de la proteína quinasa Atg1 en respuesta a la limitación de glucosa.....	165
Figura 30. La inhibición farmacológica de distintos componentes de la ETC durante una limitación de glucosa compromete la inducción de la autofagia y el crecimiento respiratorio.....	166
Figura 31. Análisis de la capacidad de inducir la autofagia, respiratoria y proliferativa de mutantes nulos para distintos componentes de la ETC mitocondrial de <i>S. pombe</i>	168
Figura 32. La inactivación de la señalización de la ruta AMPc-PKA promueve la inducción de la autofagia en respuesta a un ayuno completo de glucosa..	170
Figura 33. La cinética de inducción de la autofagia es más rápida en el mutante <i>pka1Δ</i>	171
Figura 34. La inactivación de la subunidad catalítica Pka1 de la ruta AMPc-PKA promueve la inducción de la autofagia en respuesta a un ayuno completo de glucosa.	172
Figura 35. La proteína quinasa Atg1 se activa adecuadamente en respuesta al ayuno completo de glucosa en el mutante <i>pka1Δ</i> de <i>S. pombe</i>	173
Figura 36. La desrepresión del metabolismo respiratorio dependiente de la inactivación de la señalización de la ruta AMPc-PKA es fundamental para inducir la autofagia tras la inanición de glucosa.	174
Figura 37. La activación constitutiva de la señalización de la ruta AMPc-PKA bloquea completamente la inducción de la autofagia en respuesta a la limitación de glucosa.....	175
Figura 38. La delección de <i>rst2⁺</i> provoca una reducción significativa en la inducción de la autofagia en respuesta a la limitación de glucosa.....	176
Figura 39. La delección simultánea de <i>rst2⁺</i> y <i>pka1⁺</i> provoca un bloqueo completo del flujo autofágico inducido en respuesta a la inanición de glucosa..	177
Figura 40. La ruta AMPc-PKA regula negativamente la inducción de la autofagia inducida en respuesta a un déficit de glucosa tanto de manera dependiente como independiente de Rst2.....	178
Figura 41. La inducción de la autofagia lograda tras el déficit de glucosa o el apagado de la señalización de la ruta AMPc-PKA promueve el CLS en <i>S. pombe</i>	180
Figura 42. En <i>S. pombe</i> , ni la AMPK Ssp2, ni Rad3 están implicados en la regulación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa.....	182
Figura 43. En <i>S. pombe</i> la delección del represor transcripcional Scr1 promueve la inducción de la autofagia en respuesta al la escasez de glucosa.	183

Figura 44. La ruta SAPK regula positivamente la inducción de la autofagia inducida en respuesta a un déficit de glucosa de manera dependiente de Atf1.	186
Figura 45. Genes cuya expresión depende en gran medida tanto de Atf1 como de Rst2 en células <i>pka1Δ</i>	188
Figura 46. Principales procesos biológicos dependientes de los factores de transcripción Rst2 y Atf1 en células <i>pka1Δ</i>	189
Figura 47. La regulación de los genes implicados en el metabolismo del glicerol depende en gran medida de los factores de transcripción Rst2 y Atf1 en las células <i>pka1Δ</i> de <i>S. pombe</i>	190
Figura 48. La expresión génica basal de los principales genes implicados en el metabolismo del glicerol aumenta en las células <i>pka1Δ</i>	191
Figura 49. La expresión constitutiva de los genes del metabolismo del glicerol, dependiente de los factores de transcripción Rst2 y Atf1, permite el crecimiento de mutantes nulos para componentes la ruta AMPc-PKA en medios donde el glicerol es la única fuente de carbono disponible.	192
Figura 50. En <i>S. pombe</i> la expresión de Gld1 depende fuertemente de los factores de transcripción Rst2 y Atf1 tras la limitación de glucosa.	193
Figura 51. La expresión de los genes implicados en la asimilación del glicerol (<i>gld1+</i> , <i>dak1+</i> y <i>dak2+</i>) es crítica para la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa.	194
Figura 52. La delección de <i>gut2+</i> , <i>gpd1+</i> y <i>fbp1+</i> no afecta a la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa.	195
Figura 53. Las células <i>pka1Δ</i> son incapaces de inducir la autofagia tras un ayuno completo de glucosa en presencia de una fuente de carbono no respirable.	196
Figura 54. La MAPK Sty1 modula la activación de Rst2 tras el déficit de glucosa.	197
Figura 55. Estructura básica de Rst2.	198
Figura 56. La fosforilación de Rst2 en S292 es efectuada específicamente por la MAPK Sty1.	199
Figura 57. La fosforilación de Rst2 dependiente de Sty1 en S292 es necesaria para la expresión de los genes implicados en el metabolismo del glicerol.	200
Figura 58. La fosforilación dependiente de Sty1 en S292 de Rst2 no afecta a la capacidad de crecer en condiciones respiratorias.	201
Figura 59. La fosforilación dependiente de Sty1 en S292 de Rst2 reduce la activación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa.	202
Figura 60. Modelo de regulación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en <i>S. pombe</i>	215

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Castellano	English
17BR	Región de unión a Atg17	<i>Atg17 Binding Region</i>
A		
AA	Antimicina A	<i>Antimycin A</i>
Adh1	Alcohol deshidrogenasa 1	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>
ADP	Adenosín difosfato	<i>Adenosine Diphosphate</i>
AIM/LIR	Motivo de interacción con Atg8/LC3	<i>Atg8/LC3 interacting motif</i>
AMP	Adenosín monofosfato	<i>Adenosine monophosphate</i>
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
AMPC-PKA	Proteína quinasa A dependiente de AMPC	<i>cAMP-dependent protein kinase A</i>
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ARN	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid (RNA)</i>
ARNm	ARN mensajero	<i>Messenger RNA</i>
ARNr	ARN ribosómico	<i>Ribosomic RNA</i>
Atd1	Acetaldehído deshidrogenasa	<i>Acetaldehyde dehydrogenase</i>
Atg	Genes implicados en la autofagia	<i>Autophagy related genes</i>
ATP	Adenosín trifosfato	<i>Adenosine triphosphate</i>
C		
CCR	Represión catabólica por fuente de carbono	<i>Carbon catabolite repression</i>
CESR	Conjunto de genes de respuesta al estrés ambiental.	<i>Core environmental stress response</i>
CLS	Envejecimiento cronológico	<i>Chronological lifespan</i>
CMA	Autofagia mediada por chaperonas	<i>Chaperone mediated autophagy</i>
CRE	Elementos de respuesta a AMPC	<i>cAMP response element</i>
CVT	Ruta de transporte del citoplasma a la vacuola	<i>Cytoplasm to vacuole Target</i>
CoQ	Coenzima-Q10 (ubiquinona)	<i>Coenzyme-Q10 (Ubiquinone)</i>
D		
Dak1/2	Dihidroxiacetona quinasa 1-2	<i>Dihydroxyacetone kinase 1-2</i>
DHA	Dihidroxiacetona	<i>Dihydroxyacetone</i>
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato	<i>Dihydroxyacetone phosphate</i>
E		
EMM	Medio Mínimo de Edimburgo (Medio mínimo para el cultivo de <i>S. pombe</i>)	<i>Edinburgh Minimal Media</i>
ETC	Cadena de transporte de electrones	<i>Electron Transport Chain</i>

F		
FAD	Flavín adenín dinucleótido (oxidado)	<i>Flavin adenine dinucleotide (oxidized)</i>
FADH ₂	FAD (reducido)	<i>FAD (reduced)</i>
G		
G0	Fase G0 (Fase del ciclo celular)	<i>Gap 0</i>
G1	Fase G1 (Fase del ciclo celular)	<i>Gap 1</i>
G2	Fase G2 (Fase del ciclo celular)	<i>Gap 2</i>
G3P	Glicerol-3-fosfato	<i>Glycerol-3-phosphate</i>
GA3P	Gliceraldehído-3-fosfato	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate</i>
GAP	Proteínas activadoras de GTPasas	<i>GTPase-activating protein</i>
GEF	Factores intercambiadores de guanina	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
Ght	Transportadores de glucosa y hexosas en <i>S. pombe</i>	<i>Glucose and hexose transporter in S. pombe</i>
Gld1	Glicerol deshidrogenasa mitocondrial	<i>Mitochondrial glycerol dehydrogenase</i>
Glu	Glucosa	<i>Glucose</i>
Gly	Glicerol	<i>Glycerol</i>
Gpd1	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gut1	Glicerol quinasa	<i>Glycerol kinase</i>
Gut2	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial</i>
H		
HOG	Ruta de MAPK de respuesta a estrés osmótico <i>S. cerevisiae</i>	<i>High-Osmolarity Glycerol Pathway</i>
Hog1	MAPK de la vía HOG	<i>HOG pathway's MAPK</i>
K		
Ksg1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos.	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
L		
LDS	Sitio de unión a LIR	<i>LIR docking site</i>
lncRNA	RNA no codificante largo	<i>Long non-coding RNA</i>
M		
M	Mitosis	<i>Mitosis</i>
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MIM	Motivos de interacción MIT	<i>MIT interaction motif</i>

MIT	Dominios de interacción y transporte de microtúbulos	<i>Microtubule interacting and trafficking domains</i>
N		
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidized)</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced)</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
ncRNA	RNA no codificante	<i>Non-coding RNA</i>
NETO	Crecimiento monopolar desde el polo generado en el ciclo anterior	<i>New End Take Off</i>
O		
OETO	Crecimiento monopolar desde el polo presente en el ciclo anterior	<i>Old End Take Off</i>
OXPHOS	Fosforilación oxidativa	<i>Oxidative Phosphorylation</i>
P		
PAS	Región de ensamblaje del fagóforo o Estructura preautofagosomal	<i>Phagophore assembly site</i>
PE	Fosfatidiletanolamina	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
PI3P	Fosfatidilinositol-3-fosfato	<i>Phosphatidylinositol-3-phosphate</i>
PI3K.	Fosfatidilinositol-3-quinasa	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PI3K-III / PI3KC3	Fosfatidilinositol-3-quinasa de clase 3	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase class 3</i>
PI3KC3-CI	Complejo I de la fosfatidilinositol-3-quinasa de clase 3.	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase class 3 complex 1</i>
PI3KC3-CII	Complejo II de la fosfatidilinositol-3-quinasa de clase 3.	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase class 3 complex 2</i>
PKA	Proteína Quinasa A	<i>Protein Kinase A</i>
PPP	Vía de las pentosas fosfato	<i>Pentose phosphate pathway</i>
Pyk1	Piruvato quinasa	<i>Pyruvate kinase 1</i>
Q		
Q	Quiescentes (Células)	<i>Quiescent (Cells)</i>
QH ₂	Ubiquinol (Ubiquinona reducida)	<i>Ubiquinol (Ubiquinone reduced state)</i>
R		
RE	Retículo endoplásmico	<i>Endoplasmic reticulum</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S		

S	Síntesis (Fase del ciclo celular)	<i>Synthesis</i>
SAPK	Proteína quinasa de respuesta a estrés	<i>Stress Activated Protein Kinase</i>
SP	Septo primario	<i>Primary Septum</i>
SS	Septo secundario	<i>Secondary Septum</i>
STRE	Elementos de respuesta a estrés.	<i>Stress response Elements</i>
STREP	Elementos de respuesta a estrés en <i>S. pombe</i>	<i>Stress response Elements in S. pombe</i>
T		
TCA	Método de precipitación de proteínas basado en el ácido tricloro-acético	<i>Protein precipitation method based on trichloro acetic acid</i>
TOR	Proteína quinasa diana de rapamicina.	<i>Target of Rapamycin kinase</i>
TORC1	Complejo I de TOR	<i>TOR complex I</i>
TORC2	Complejo II de TOR	<i>TOR complex II</i>
Tpi1	Triosafosfato isomerasa	<i>Triose-phosphate isomerase</i>
Tsc1-Tsc2	Proteínas de la esclerosis tuberosa 1 y 2 (Regulador negativo TORC1)	<i>Tuberous sclerosis proteins 1 and 2 (Negative regulator of TORC1).</i>
TTFA	2-thenyltrifluoroacetona	<i>2-thenyltrifluoroacetone</i>
U		
UAS1 y UAS2	Secuencias aguas arriba de activación 1 y 2	<i>Upstream Activation Sequences 1 and 2</i>
W		
WIPI	Proteínas de unión a PI3P	<i>WD-repeat protein Interacting with phospholinositides</i>

Introducción

1. Adaptación a la disponibilidad de glucosa: quiescencia y modulación del metabolismo energético en *S. pombe*.

Los seres vivos eucariotas, desde las levaduras hasta los seres humanos, presentan la capacidad de modular de forma precisa su crecimiento y desarrollo en función de la disponibilidad de nutrientes. Las levaduras no sólo utilizan los nutrientes como recursos para aumentar su masa y generar energía, sino también como señales implicadas en la regulación de determinados programas metabólicos, transcripcionales y de desarrollo que garanticen la supervivencia celular. Tanto el crecimiento como la fisiología celular están íntimamente relacionados con el metabolismo de los nutrientes, como se puede evidenciar en el rápido crecimiento mitótico que presentan las levaduras en ambientes ricos en nutrientes o en la entrada en un estado quiescente en condiciones de escasez o déficit nutricional (Broach, 2012; Lin et al., 2021; Wen & Klionsky, 2016).

Cuando las condiciones nutricionales son adversas, los organismos vivos recurren a sus reservas intracelulares para garantizar su supervivencia, utilizando moléculas como el glucógeno y los lípidos, y orgánulos como los ribosomas. Esto demuestra la extrema versatilidad que presentan los seres vivos en la obtención de los nutrientes necesarios para el sostén de los procesos vitales, lo cual permite su adaptación eficaz a periodos prolongados de inanición o ayuno (Lin et al., 2021; Rabinowitz & White, 2010). En este contexto, la autofagia tiene un papel crucial porque permite la digestión intracelular de macromoléculas y/o orgánulos, modulando la homeostasis metabólica en organismos eucariotas uni- y pluricelulares (Jimenez-Saucedo et al., 2021; Kamada et al., 2000).

1.1 La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* como modelo para el estudio del cambio diaúxico y la autofagia en la adaptación a la escasez de glucosa.

Schizosaccharomyces pombe es la primera levadura de fisión descubierta y fue aislada por primera vez por P. Linder en 1883 a partir de una cerveza de mijo elaborada en el este de África (Jeffares, 2018; Sipiczki, 2000). Su nombre genérico hace referencia a que su división es por fisión tras la formación de un septo, característica que las distingue de las levaduras del género *Saccharomyces* que son gemantes (*Saccharomyces cerevisiae*) (Mukaiyama et al., 2010), mientras que el epíteto específico indica su origen, pues «*pombe*» significa cerveza en swahili (Giga-Hama & Kumagai, 1999). *S. pombe* es un eucariota unicelular que forma colonias de células libres inmóviles. Durante el crecimiento vegetativo su morfología es cilíndrica, con un tamaño de 12-15 µm de longitud y un diámetro de 3-4 µm. Su genoma está totalmente secuenciado (3 cromosomas, ~14 Mb) (Wood & Bahler, 2002), y su

ciclo biológico es rápido y principalmente haploide, lo que facilita su manipulación genética y lo hace especialmente apropiado como organismo modelo en biología celular. Por otro lado, sus proteínas se encuentran fuertemente conservadas evolutivamente con relación a organismos superiores, siendo un organismo enormemente atractivo para el estudio de rutas de señalización y transducción de señales (Alao et al., 2023; Jeffares, 2018; Legon & Rallis, 2021; Teixeira, 2023).

Taxonómicamente, *S. pombe*, al igual que *S. cerevisiae*, pertenece al grupo de los ascomicetos. Sin embargo, el análisis de sus genomas ha puesto de manifiesto que ambas levaduras se separaron evolutivamente hace 1000-1200 millones de años (Heckman et al., 2001; Jeffares, 2018; Sipiczki, 2000), coincidiendo aproximadamente con la separación de los hongos de plantas y metazoos. De hecho, numerosos estudios han demostrado que las levaduras de fisión presentan una mayor semejanza funcional y genómica con las células eucariotas superiores que con otras levaduras (Petrescu-Dănilă et al., 2009; Vyas et al., 2021). En relación con la autofagia, *S. pombe* posee diversos homólogos a proteínas de eucariotas superiores como Atg101, Atg18 y SPBC1289.11 que no están presentes en *S. cerevisiae* (Mukaiyama et al., 2010). Por el contrario, otras proteínas como Atg19, Atg23, Atg27, Atg29 y Atg31 están presentes en *S. cerevisiae*, mientras que no se ha descrito su presencia en la levadura de fisión (Innokentev & Kanki, 2021; Mukaiyama et al., 2010; Xu & Du, 2022). Por lo tanto, el uso de ambas levaduras como organismos modelo en investigación podría proporcionar información relevante acerca de los mecanismos regulatorios implicados en el control de la autofagia que aún no se conocen con el suficiente detalle.

1.1.1 Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*.

S. pombe es un organismo haploide que se divide asexualmente en condiciones en las que existe una alta disponibilidad de nutrientes (ciclo mitótico; **Figura 1**). No obstante, *S. pombe* puede entrar en latencia (fase estacionaria) o comenzar el ciclo sexual si las condiciones ambientales empeoran y las células perciben la escasez de nutrientes (Ohtsuka et al., 2022; Seike & Niki., 2022). La diferenciación sexual en las levaduras de fisión consiste en promover la conjugación entre tipos celulares de sexos opuestos conocidos como h^+ y h^- (cepas heterotálicas). No obstante, existen cepas homotálicas (h^{90}) de *S. pombe* que pueden aparearse entre sí debido a que, en circunstancias desfavorables, estas células pueden variar su tipo sexual (Beach et al., 1982).

El ciclo vegetativo en un medio rico en glucosa de una célula haploide de *S. pombe* dura aproximadamente entre 2 y 4 horas. Por su parte, el ciclo sexual se induce cuando las células se encuentran ante una escasez de nutrientes, en especial la inanición de fuente de nitrógeno (**Figura 1**). Ante este estímulo, las células de ambos tipos sexuales (h^+ y h^-), si están presentes en la población, detienen su ciclo celular en la fase G1 y comienza el proceso de conjugación. Cada tipo sexual produce feromonas diferentes. Por un lado, las células de tipo sexual h^+ producen un péptido sin modificar denominado factor P; y por su parte, las células de tipo sexual h^- producen un péptido modificado conocido como factor M. Una vez liberadas, estas feromonas son reconocidas específicamente por receptores presentes en la superficie celular de la célula de tipo sexual opuesto, induciendo una respuesta a feromonas. Este fenómeno es importante para la discriminación sexual de la pareja (Seike & Niki., 2022). Una vez reconocidas, las células se elongan hacia la fuente de las feromonas del tipo sexual contrario formando el tubo conjugativo («*shmooing*»). Acto seguido, estas dos células se fusionan para formar un cigoto diploide, que inicia el proceso de meiosis, y culmina con la formación de un asca que presenta cuatro esporas haploides (**Figura 1**). Finalmente, tras la autólisis de las paredes de las ascosporas, se produce la liberación de los cuatro productos meióticos que son capaces de resistir en ambientes abióticos durante largos períodos de tiempo (Leupold, 1949). Una vez las condiciones ambientales vuelven a ser adecuadas, las esporas vuelven a entrar en el ciclo mitótico después de germinar (Yamamoto et al., 1997) (**Figura 1**). Por otro lado, si las condiciones nutricionales mejoran durante la formación del cigoto, *S. pombe* es capaz de entrar en un ciclo vegetativo diploide. Sin embargo, estas células diploides son muy inestables, y cuando las condiciones vuelven a ser desfavorables son capaces de retomar el ciclo meiótico, generando una ascospora azigótica que está formada por cuatro ascosporas haploides (**Figura 1**) (Forsburg & Rhind, 2006; Moreno et al., 1991).

El ciclo mitótico de *S. pombe* se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M (**Figura 1**) (Mitchison, 1970). La primera fase, que se produce entre la mitosis y la replicación del material genético, recibe el nombre de fase G1 o «Gap 1», y en ella se efectúa la síntesis de ARN y proteínas que son necesarias para la replicación del ADN. En *S. pombe*, la fase G1 solo dura un breve periodo de tiempo porque, después de la división, las células hijas ya son lo suficientemente grandes como para comenzar la fase S, donde ocurre la duplicación del material genético (**Figura 1**) (MacNeill & Fantes, 1997; Moreno et al., 1991). La mayor parte del ciclo vital (70%) de *S. pombe* transcurre en fase G2, donde la célula aumenta la masa y/o el volumen celular. Cuando la célula alcanza su tamaño crítico, la mitosis (fase M) comienza, provocando la condensación cromosómica, la formación del huso mitótico y la separación de las cromátidas hermanas hacia ambos polos de la célula (**Figura 1**) (Hagan & Hyams, 1988). Después de la mitosis, se produce la citocinesis (división celular) a medida que se desarrolla

una pared divisoria (septo) en el centro de la célula (Pollard & Wu, 2010). Inicialmente, para dividir el citoplasma en dos partes iguales, se comienza a formar un tabique primario (o septo primario, SP) en la superficie interna de la pared celular. Luego, cada célula hija contribuye en el ensamblaje de un septo secundario (SS) a cada lado del septo primario, dando lugar a un septo trilaminar. El septo de *S. pombe* está compuesto principalmente de α - y β -glucanos esenciales. Ambas estructuras del septo (SP y SS) contienen β (1,3)-D-glucano con ramificaciones β (1,6) y α (1,3)-D-glucano. Por su parte, el β (1,6)-D-glucano solo se detecta en el SS y es importante para interconectar los polisacáridos de la pared; mientras que el β (1,3)-D-glucano lineal se encuentra exclusivamente en el PS (Cortés et al., 2016). La división celular comienza con el colapso de la pared celular que rodea al septo, y se completa con la degradación del septo primario, lo cual provocará, finalmente, la liberación de las dos células hijas al comienzo de la fase S (Gould & Simanis, 1997; Pollard & Wu, 2010). Generalmente, las fases M, G₁ y S transcurren con normalidad de forma previa a la separación física de las células hijas. Por lo tanto, cuando ocurre la citocinesis las células se encuentran en fase G₂ temprana (MacNeill & Fantes, 1997) (**Figura 1**).

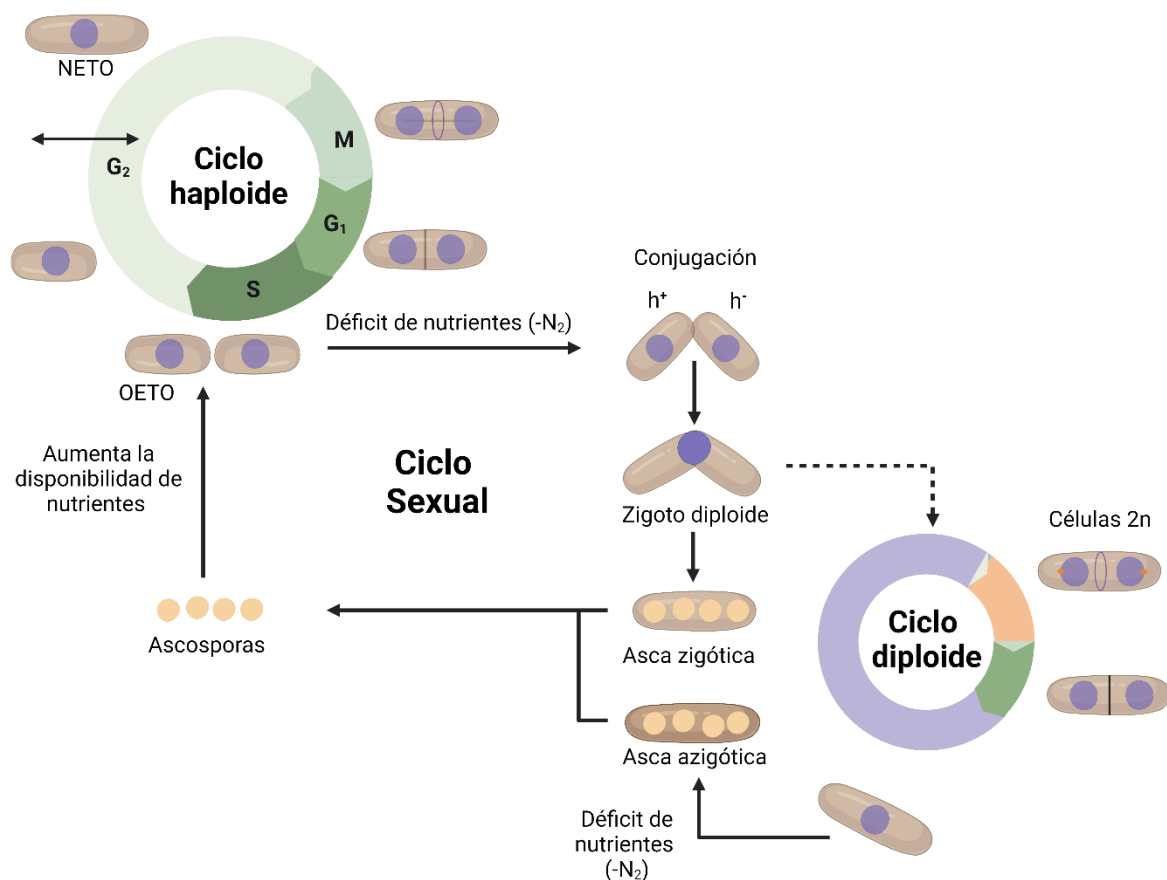


Figura 1. Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*. Ciclo de vida haploide (izquierda) y ciclo de vida diploide (derecha). Adaptada de MacNeil & Nurse, 1997.

Después de la división celular, las células hijas crecen monopolarmente desde el polo que estaba presente en el ciclo celular anterior (proceso denominado como OETO, «*Old End Take Off*»). Por su parte, el polo «nuevo» resultante de la división de la célula madre en dos células hijas, inicia el crecimiento simultáneamente con el polo «viejo» cuando las células alcanzan un determinado tamaño crítico. Esta activación del crecimiento bipolar es conocida como NETO («*New End Take Off*») (Mitchison & Nurse, 1985) y comienza en la fase G2. Esta transición entre las distintas etapas del ciclo celular es un proceso estrictamente controlado en el que las proteínas involucradas son periódicamente sintetizadas y/o activadas a medida que el ciclo celular avanza.

1.1.1 Estrategia de supervivencia frente a la escasez de glucosa en levaduras: la fase estacionaria y la quiescencia como respuesta adaptativa.

La quiescencia es un estado de reposo protector en el que las células están metabólicamente activas, manteniendo un estado estable, pero reversible, con el objetivo de volver a entrar en el ciclo celular cuando las condiciones nutricionales así lo permitan (Allen et al., 2006; Miles et al., 2021; Miles et al., 2019). Las células de levadura quiescentes (Q) presentan numerosas características que las diferencian de las células en estado proliferativo: no se dividen, se arrestan como células esféricas sin septos de división; no acumulan masa ni volumen; presentan una tasa metabólica reducida; mayor número de mitocondrias; un perfil transcripcional específico; cromosomas más condensados; una disminución drástica en la síntesis de ARNr y proteínas; una mayor resistencia a diversos tipos de estrés; una alta actividad autofágica; y mayor longevidad o envejecimiento cronológico (CLS, «*Chronological Lifespan*») (**Figura 2**) (Miles et al., 2021; Sun & Gresham, 2021).

Durante décadas, numerosas investigaciones han empleado cultivos en fase estacionaria o células ayunadas abruptamente de glucosa para estudiar la quiescencia o estado de no división, sin saber qué fracción de estas células se encuentran inactivas, senescentes o muertas (Sun & Gresham, 2021; Valcourt et al., 2012). En 2006, Werner-Washburne publicó un estudio donde describía que en cultivos en fase estacionaria de *S. cerevisiae* existe una mezcla heterogénea de células con distintas características fisiológicas: (i) células hijas bloqueadas en G1 que presentan características típicas de células Q; (ii) una mezcla heterogénea de células madre e hijas que es sensible al estrés, con signos de acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y apoptosis, las cuales interfieren en el estudio del estado de quiescencia (Allen et al., 2006; Miles et al., 2021; Miles et al., 2019). Posteriormente, se describió que en *S. cerevisiae* la inanición abrupta de glucosa no promueve la entrada en un estado quiescente. La transición hacia la quiescencia en *S. cerevisiae* ocurre a medida que la glucosa se vuelve un recurso limitante; se inicia antes del

cambio diaúxico y abarca la fase respiratoria en la que las células utilizan el etanol como fuente de carbono (Miles et al., 2021). Además, en estas circunstancias, las células de levadura dejan de dividirse, están llenas de glucosa en forma de glucógeno y trehalosa (Lillie & Pringle, 1980) y pueden sobrevivir en él durante meses (Gray et al., 2004). Por su parte, la inanición abrupta de glucosa previene esta acumulación de glucógeno y trehalosa, y provoca que las células no se detengan en G1 y mueran en cuestión de días (Li et al., 2013). Por lo tanto, estas observaciones apuntan a que un agotamiento progresivo de la disponibilidad de glucosa es la forma ideal de obtener una población de células Q.

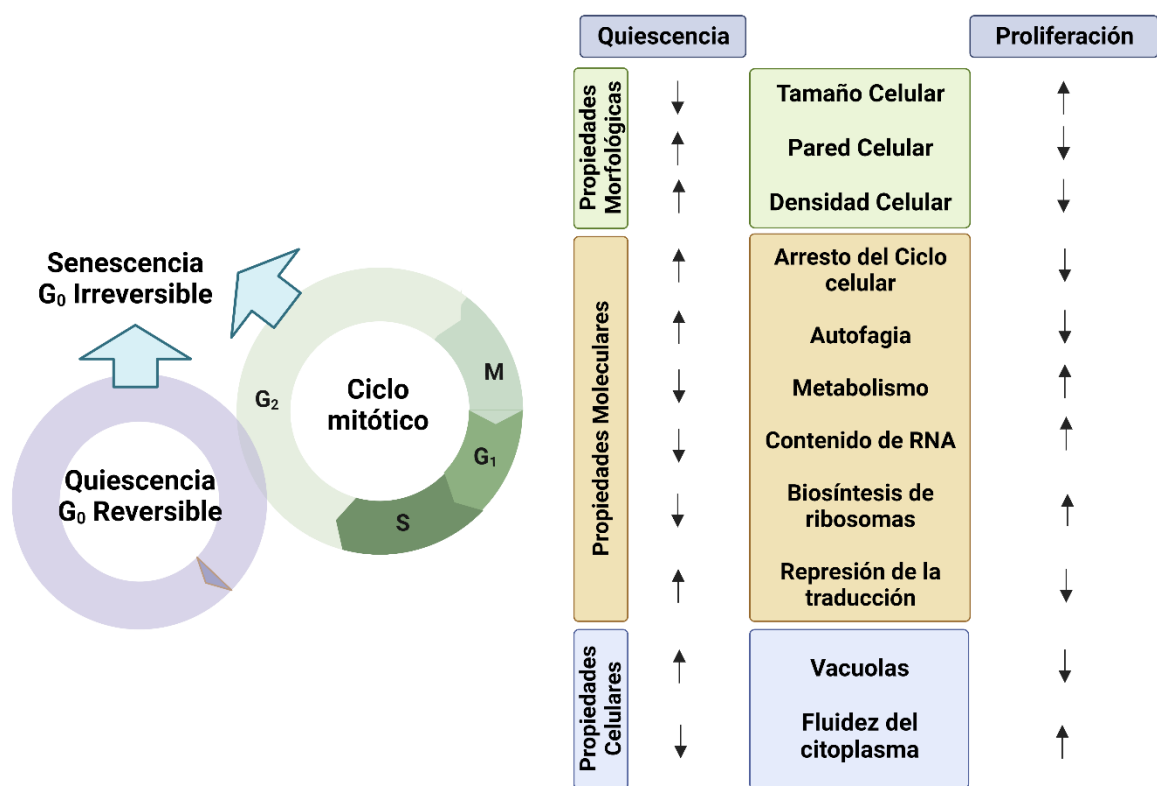


Figura 2. Características fisiológicas del ciclo mitótico y la quiescencia en *S. pombe*. Esquema de la interacción de ambos estados del ciclo celular (izquierda) y las principales características de cada estado fisiológico (derecha). Las características clave que distinguen las células proliferativas y las quiescentes tienen indicado si la regulación es positiva (flecha ascendente) o negativa (flecha descendente). Adaptada de Sun & Gresham, 2021.

Por otro lado, se ha correlacionado el CLS con la proporción de células Q en cultivos en fase estacionaria (Allen et al., 2006; Murakami et al., 2008; Zhang & Cao, 2017), habiéndose demostrado que la programación eficaz de la quiescencia puede extender el CLS de las células (Cao et al., 2016). De hecho, las células con un CLS menor, presentan una reducción de su capacidad de reingresar en el ciclo celular tras la reposición de nutrientes (Garay et al., 2014) y, por lo tanto, son fisiológicamente iguales a las células que presentan defectos en la regulación de la quiescencia. Tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*, el CLS es mayor en aquellas células que se han adaptado adecuadamente al déficit de glucosa (Mohammad et al., 2020; Şeylan & Tarhan, 2023; Zuin, Carmona, et al., 2010). Es más, aquellas cepas que presentan defectos en el funcionamiento de la mitocondria o defectos para inducir eficazmente el cambio diaúxico presentan una desregulación de la entrada en quiescencia y, por tanto, un menor CLS (Miles et al., 2013).

En condiciones de déficit de glucosa, la sincronización del ciclo celular de *S. pombe* ocurre en G2 (van Dijken et al., 1993) y, posteriormente, se promueve la entrada en un estadio distinto del ciclo replicativo denominado G0 (Epifanova & Terskikh, 1969), donde reiniciar el ciclo de división celular conlleva más tiempo que un bloqueo en G1 o G2 (Zetterberg & Larsson, 1985). Durante ese arresto, las células de *S. pombe* se ven obligadas a tomar decisiones de desarrollo que involucran la activación de distintos programas de expresión génica destinados a optimizar la incorporación de la poca glucosa disponible y la activación del metabolismo respiratorio (Masuda et al., 2016). Por otra parte, en *S. pombe* la inanición abrupta de glucosa supone la entrada en un estado de quiescencia celular irreversible (**Figura 2**), que conduce a la senescencia celular, provocando un acortamiento del CLS (Pluskal et al., 2011). Además, en estas condiciones no se induce la autofagia (Mukaiyama et al., 2010), la cual es una característica específica de las células Q (**Figura 2**) (Sun & Gresham, 2021).

Debido a que los genes y las vías de señalización que controlan la quiescencia se encuentran conservados evolutivamente, el uso de estos sistemas modelo de levadura está justificado para poder avanzar rápidamente en el estudio de los mecanismos que subyacen a la quiescencia en las células humanas.

1.2 Adaptación metabólica de *S. pombe* a la escasez de glucosa.

Las levaduras, al igual que el resto de organismos unicelulares, están sometidas a una fuerte presión evolutiva para reproducirse cuando los nutrientes están disponibles en abundancia, para lo cual precisan de sofisticados mecanismos intracelulares de transducción de señales que optimicen la producción de las biomoléculas necesarias para la generación de nuevas células (Chen et al., 2003; Flores et al., 2000; Galdieri et al., 2010). No obstante, en situaciones de escasez de nutrientes, se produce una profunda reprogramación del

metabolismo celular con el objetivo de extraer la máxima cantidad de energía posible de los recursos disponibles y, así, garantizar la viabilidad celular (Galdieri et al., 2010; Hoffman, 2005; Zhang & Cao, 2017).

La glucosa, la fuente preferida de carbono y energía para la mayoría de los organismos vivos, es metabolizada a nivel celular mediante fermentación o respiración mitocondrial, siendo esta última mucho más eficiente en cuanto a la energía y biomasa generada por molécula de glucosa. Sin embargo, muchos organismos, incluida la levadura de fisión *S. pombe*, utilizan la fermentación aeróbica en lugar de la respiración para la producción de ATP cuando hay glucosa disponible, un fenómeno conocido como «efecto Crabtree» (Malina et al., 2021; Pfeiffer & Morley, 2014; van Dijken et al., 1993). A nivel molecular, la presencia de glucosa impide la utilización de fuentes alternativas de carbono a través de un mecanismo conservado de «Represión Catabólica por fuente de Carbono» (CCR), que reprime transcripcionalmente la expresión de genes implicados en el catabolismo de azúcares menos favorables, componentes de la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial y otras proteínas mitocondriales (Adachi et al., 2017; Broach, 2012; Chen et al., 2003).

1.2.1 Crecimiento en presencia de glucosa en *S. pombe*: el efecto Crabtree.

El efecto Crabtree tiene sus raíces en la represión catabólica por glucosa (CCR) de la función mitocondrial. Las levaduras Crabtree positivas como *S. pombe*, en presencia de glucosa, con independencia de disponibilidad de oxígeno, promueven la síntesis de transportadores de hexosa, la glucólisis y la fermentación alcohólica; mientras que reprimen fuertemente la utilización de fuentes alternativas de carbono, la respiración mitocondrial, la esporulación y la respuesta al estrés (Malina et al., 2021; Pfeiffer & Morley, 2014; Zhang et al., 2022).

A través de la fermentación se producen 2 moléculas de ATP (Adenosín Trifosfato) por molécula de glucosa, por lo que esta vía metabólica es considerablemente menos eficiente a nivel energético que el catabolismo oxidativo del piruvato, cuyo rendimiento es de 36-38 moléculas de ATP por molécula de glucosa (Pfeiffer et al., 2001; Vander Heiden et al., 2009). No obstante, el efecto Crabtree proporciona a los organismos que lo presentan determinadas ventajas adaptativas entre las que destacan: (i) Mejor adaptación al nicho ecológico, puesto que la producción de etanol genera cierta toxicidad ambiental, lo que les permite competir por los nutrientes contra otros microorganismos; (ii) El crecimiento fermentativo reduce la producción de ROS y, por tanto, la incorporación de mutaciones en el ADN; (iii) Permite acelerar el crecimiento debido a una generación de energía más rápida; (iv) Requiere menos recursos del proteoma celular para producir la misma cantidad de ATP que la respiración (Malina et al., 2021; Pfeiffer & Morley, 2014; Takaine et al., 2019).

Otra evidencia más que apoya que la fermentación es la vía metabólica preferida para garantizar el crecimiento a tasas elevadas es el efecto Warburg en las células cancerosas humanas, esta estrategia es similar al efecto Crabtree en levaduras (DeBerardinis et al., 2008; Vander Heiden et al., 2009; Ward & Thompson, 2012).

1.2.1.1 Incorporación y detección de la glucosa en *Schizosaccharomyces pombe*.

La incorporación de la glucosa es el primer paso de su catabolismo, excepto cuando la fuente de carbono y energía es un disacárido y, por lo tanto, se requiere su hidrólisis extracelular previa. La glucosa es una molécula hidrofílica que no puede atravesar la membrana celular, por ello su incorporación requiere de un transportador (Manolescu et al., 2007). Los transportadores de hexosas presentan 12 segmentos transmembrana, de los cuales algunos generan un poro a través del cual pasan las hexosas (Mueckler & Makepeace, 2006). Se han identificado transportadores de hexosas en una amplia variedad de organismos, observándose una alta conservación evolutiva en su estructura general y en varios motivos que podrían estar implicados en el reconocimiento del sustrato y/o en la determinación de la topología de la membrana (Manolescu et al., 2007; Sato & Mueckler, 1999; Seatter et al., 1998). Generalmente, en una misma especie podemos encontrar múltiples genes que codifican transportadores de hexosas, habiéndose descrito la existencia de 13 en humanos, 8 en *S. pombe* y 20 en *S. cerevisiae* (Heiland et al., 2000; Malina et al., 2021; Manolescu et al., 2007; Özcan & Johnston, 1999; Wood et al., 2002). Cada transportador de hexosas presenta una afinidad diferente por la glucosa o por otras hexosas similares con la finalidad de garantizar una respuesta adecuada frente a un entorno cambiante. Los tipos y combinaciones de transportadores son determinantes para una adecuada absorción de la glucosa y su metabolismo, por lo que su expresión y actividad se encuentra modulada por los cambios ambientales en la disponibilidad de la misma y por los requerimientos fisiológicos de la célula. Por ejemplo, en levaduras existen transportadores de alta afinidad que se expresan en ambientes con una reducida disponibilidad de glucosa y transportadores de baja afinidad que se expresan en ambientes ricos en glucosa (Maier et al., 2002; Özcan & Johnston, 1999).

En *S. pombe*, al igual que en otros organismos, la captación y el consumo de la glucosa dependen de su concentración en el entorno extracelular. En esta levadura, se han descrito ocho transportadores de hexosas denominados Ght con una elevada identidad en su secuencia aminoacídica, aunque funcionalmente diversos (Heiland et al., 2000; Maruyama et al., 2023). Ght1 y Ght5 son altamente específicos para el transporte de la glucosa, siendo Ght5 el que se expresa de manera más prominente y el que presenta mayor afinidad por este carbohidrato. De hecho, la relevancia de este último es tal que en su ausencia las células adquieren un fenotipo similar al ocasionado por la restricción calórica, produciéndose un

aumento del CLS (Maruyama et al., 2022; Saitoh et al., 2015). La expresión y localización de Ght5 en la membrana plasmática se encuentra regulada en función de la concentración de glucosa para garantizar una alta eficacia en la captación de la misma. Así, en condiciones de abundancia de glucosa, Ght5, que se expresa de forma reducida, se localiza en la superficie celular, preferentemente en el ecuador celular. Sin embargo, cuando la glucosa escasea, se produce un incremento en su expresión distribuyéndose por toda la superficie celular (Saitoh et al., 2015). Por su parte, Ght2 transporta galactosa y la usa para la síntesis de UDP-galactosa (Matsuzawa et al., 2013), mientras que Ght3 y Ght4 son los principales transportadores implicados en la absorción de gluconato y Ght6 en la absorción de fructosa (Heiland et al., 2000).

En muchos tipos celulares, la glucosa actúa como un estímulo ambiental que regula la cantidad, tipos y actividad de sus transportadores, tanto a nivel transcripcional como post-traducciona. De hecho, la concentración ambiental de glucosa determina en numerosas ocasiones la expresión de uno u otro tipo de transportador (Maruyama et al., 2023; Saitoh et al., 2015). En *S. pombe* la capacidad de detectar y responder frente a variaciones en la disponibilidad ambiental de glucosa se encuentra regulada por diversas rutas de señalización, entre las que destaca la ruta de señalización de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de adenosín-monofosfato cíclico (AMPC) (Hoffman, 2005; Vassiliadis et al., 2019). Sorprendentemente, mutaciones que afectan a la vía de señalización AMPC-PKA no alteran la tasa de consumo de glucosa, lo cual indica que su papel como modulador del CLS es independiente de la ingesta y utilización de glucosa (Roux et al., 2009). No obstante, esta vía de señalización converge con otras vías de señalización que sí modulan el transporte de hexosas, la glucólisis, la utilización de fuentes alternativas de carbono, etc. (Hoffman, 2005; Palabiyik et al., 2016). Por un lado, encontramos que ante el déficit de glucosa, el inhibidor de fosfatasas (Sds23), la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMKK, Ssp1) y la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMP) (AMPK, Ssp2) (Maruyama et al., 2023; Schutt & Moseley, 2017); regulan el nivel de expresión del gen *ght5⁺* al modular la localización nucleocitoplasmática del represor transcripcional Scr1 (Schutt & Moseley, 2017). Por otro lado, en condiciones ricas nutricionalmente, el complejo II de la proteína quinasa diana de la rapamicina (TORC2) y Ksg1/PDK1 activan mediante fosforilación a Gad8/Akt, promoviendo de este modo la inactivación de la α -arrestina Aly3, que es la responsable de mediar el transporte de Ght5 desde la membrana plasmática hasta las vacuolas para su degradación tras la inactivación de TORC2 (Saitoh et al., 2015; Toyoda & Saitoh, 2021). Curiosamente, en condiciones de déficit de glucosa se ha descrito que en *S. pombe* se produce una reducción transitoria de la señalización de TORC2, que se recupera rápidamente alcanzando los niveles de activación previos a la escasez de la glucosa (Hatano et al., 2015).

Esta reactivación de TORC2 mantiene fosforilado a Aly3, y protege a Ght5 de su degradación (Saitoh et al., 2015; Toyoda & Saitoh, 2021).

1.2.1.2 Glucólisis y fermentación en *S. pombe*: una visión general.

Durante el crecimiento de *S. pombe* en ambientes ricos en glucosa, el catabolismo de este azúcar transcurre a través de la glucólisis, que produce piruvato; y del ciclo de las pentosas fosfato (PPP), que produce NADPH (Corkins et al., 2017). Adicionalmente, mediante ambas rutas se obtienen otros intermediarios que son empleados en otras reacciones biosintéticas como la síntesis de aminoácidos (**Figura 3**) (Ward & Thompson, 2012). En estas condiciones, la glucosa disponible es metabolizada mediante la fermentación, lográndose su oxidación incompleta a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis) y rindiendo como producto final etanol, el cual es secretado al medio (**Figura 3**) (Fuller & Kim, 2021; Selig et al., 1997).

Entre las diferentes etapas que componen la glucólisis, y debido a su relevancia fisiológica en *S. pombe*, destacamos la catalizada por la triosa fosfato isomerasa (Tpi1) y la mediada por la piruvato quinasa (Pyk1) (**Figura 3**). Por un lado, la Tpi1 cataliza la interconversión de la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) en gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) (**Figura 3**). Esta etapa presenta una enorme relevancia funcional en la adaptación a la escasez de glucosa, pues está interconectada con el metabolismo del glicerol (fuente de carbono alternativa respirable y no fermentable). Por otra parte, en *S. pombe*, Pyk1 está implicada en la catálisis de la última etapa de la glucólisis (**Figura 3**). Recientemente, se ha demostrado que la cepa silvestre empleada comúnmente en la mayoría de los laboratorios posee una mutación puntual en el gen *pyk1*⁺ que provoca una disminución de su actividad, y por lo tanto, un menor rendimiento energético del metabolismo glicolítico (Kamrad et al., 2020; Kamrad et al., 2019). De hecho, la expresión de una versión más activa (Pyk1-T343A) provoca un aumento de la relación ATP/ADP celular y mejora significativamente la captación de glucosa en *S. pombe* (**Figura 3**) (Alam et al., 2022; Kamrad et al., 2019).

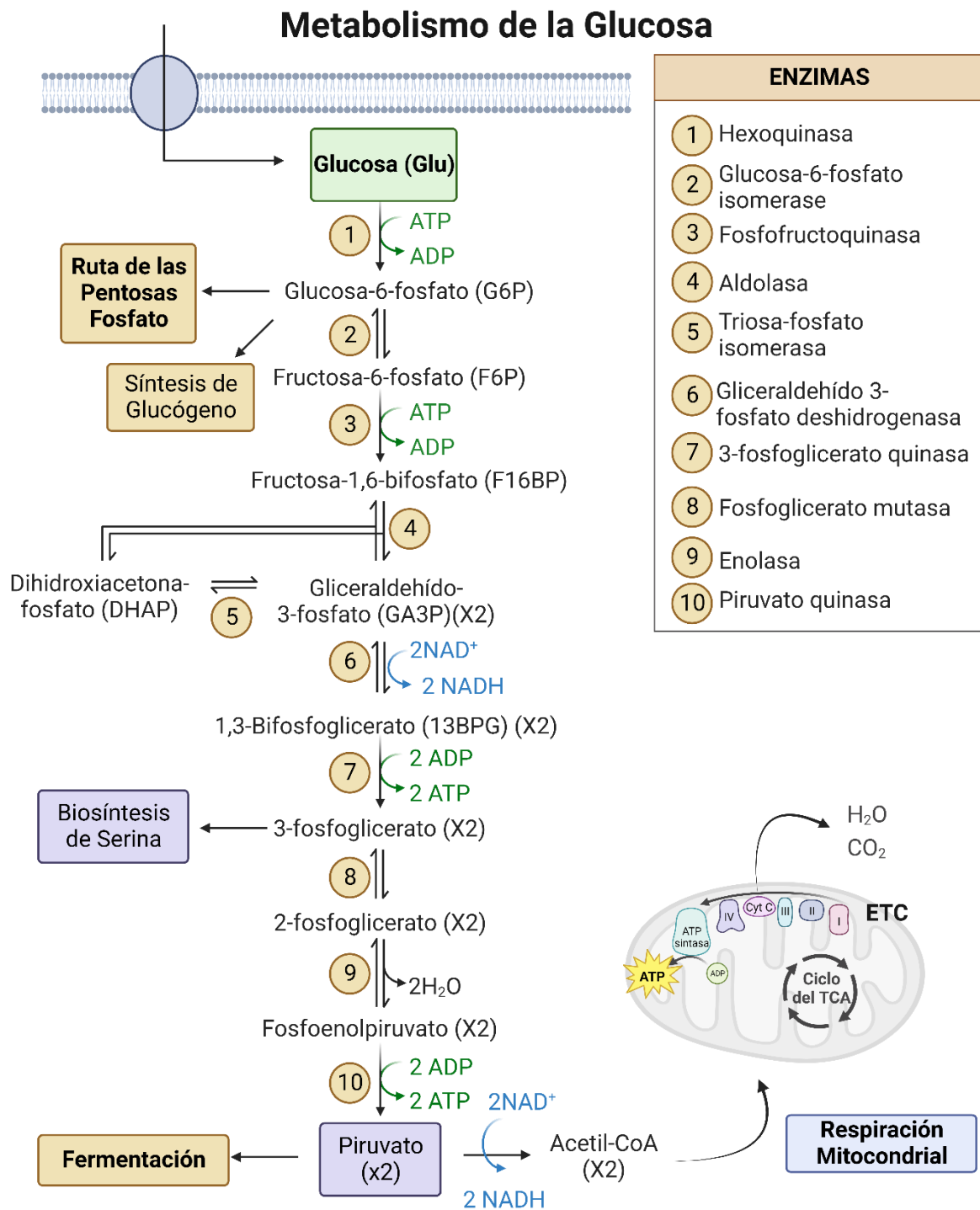


Figura 3. Vía glicolítica en *S. pombe*. El metabolismo de la glucosa es crucial debido a su papel como fuente de carbono y energía. En el citoplasma ocurren las primeras etapas de catabolismo de la glucosa, la glucólisis. A su vez, atendiendo a la concentración de glucosa (exceso) ese metabolismo se desvía a la fermentación en lugar de continuar hacia un metabolismo con un mayor rendimiento energético, la respiración mitocondrial (Selig et al., 1997). Abreviaturas: ETC (Cadena de Transporte de electrones mitocondrial).

En *S. pombe*, el piruvato formado en la glucólisis puede continuar en el metabolismo energético siendo metabolizado mediante la fermentación alcohólica o la respiración mitocondrial. Si la glucosa sigue siendo abundante predomina la fermentación alcohólica, ocurriendo tanto en normoxia como en hipoxia. En ella, el piruvato es oxidado, perdiendo su grupo carboxilo en forma de CO₂, por acción de la piruvato descarboxilasa (Pdc101/2), obteniéndose acetaldehído. A continuación, la alcohol deshidrogenasa (Adh1) transforma el acetaldehído en etanol, consiguiendo así la reoxidación del NADH citosólico previamente generado (Pfeiffer et al., 2001). Debido al menor rendimiento energético del metabolismo fermentativo (2 ATP por molécula de glucosa), la célula promueve un aumento del flujo glicolítico para satisfacer la demanda de ATP (Gancedo, 1998), provocando la acumulación de NADH citosólico. Es por eso que, en estas condiciones, para sacar el máximo rendimiento energético posible, las células emplean estrategias adicionales para la reoxidación del NADH citosólico en la mitocondria, como las NADH deshidrogenasas y las lanzaderas de NADH (Bakker et al., 2001; Rigoulet et al., 2004).

Adicionalmente, el piruvato, además de este papel en el metabolismo energético de la célula, ha sido implicado en la detoxificación de los peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos (Giandomenico et al., 1997; Guarino et al., 2019). De este modo, la fermentación contribuye a la detoxificación del estrés oxidativo que se genera en condiciones de crecimiento aeróbico.

1.2.1.3 La ruta de las pentosas fosfato en *S. pombe*: una estrategia fisiológica para mantener el flujo glicolítico, combatir el estrés oxidativo y la formación de precursores biosintéticos.

La vía de las pentosas fosfato (PPP) es una de las principales rutas catabólicas implicadas en la degradación de la glucosa en los organismos de todos los dominios de la vida (Mulukutla et al., 2016). A diferencia de la glucólisis, en la vía PPP, la glucosa se descompone para proporcionar equivalentes de reducción en forma de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH), y carbohidratos en forma de pentosas que son precursores biosintéticos de ácidos nucleicos y aminoácidos (**Figura 4**) (Lunt & Vander Heiden, 2011; Stanton, 2012; Stincone et al., 2015). Ambas vías catabólicas se ejecutan en paralelo, provocando que sea necesario que la célula regule finamente el flujo de la glucosa a través de ellas (Fraile Beneitez et al., 2020). En *S. pombe*, la etapa limitante que determina el flujo total de glucosa en la vía PPP es la regulada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf1). Esta enzima es necesaria para la generación del intermediario 6-fosfogluconato (6FG) (**Figura 4**) (Stanton, 2012; Stincone et al., 2015).

Por otro lado, en *S. pombe* la derivación del gluconato es una ruta metabólica vagamente estudiada que redirige la glucosa a la vía PPP evitando la velocidad limitante de Zwf1 (Corkins et al., 2017; Fraile Beneitez et al., 2020; Mehta et al., 1998). En esta ruta, la glucosa es oxidada por acción de la glucosa deshidrogenasa (Gcd1) a gluconolactona, el cual es posteriormente fosforilado por la gluconato quinasa (Ldn1) para producir 6FG (el intermediario de la ruta PPP) (**Figura 4**) (Corkins et al., 2017; Peekhaus & Conway, 1998; Tsai et al., 1995).

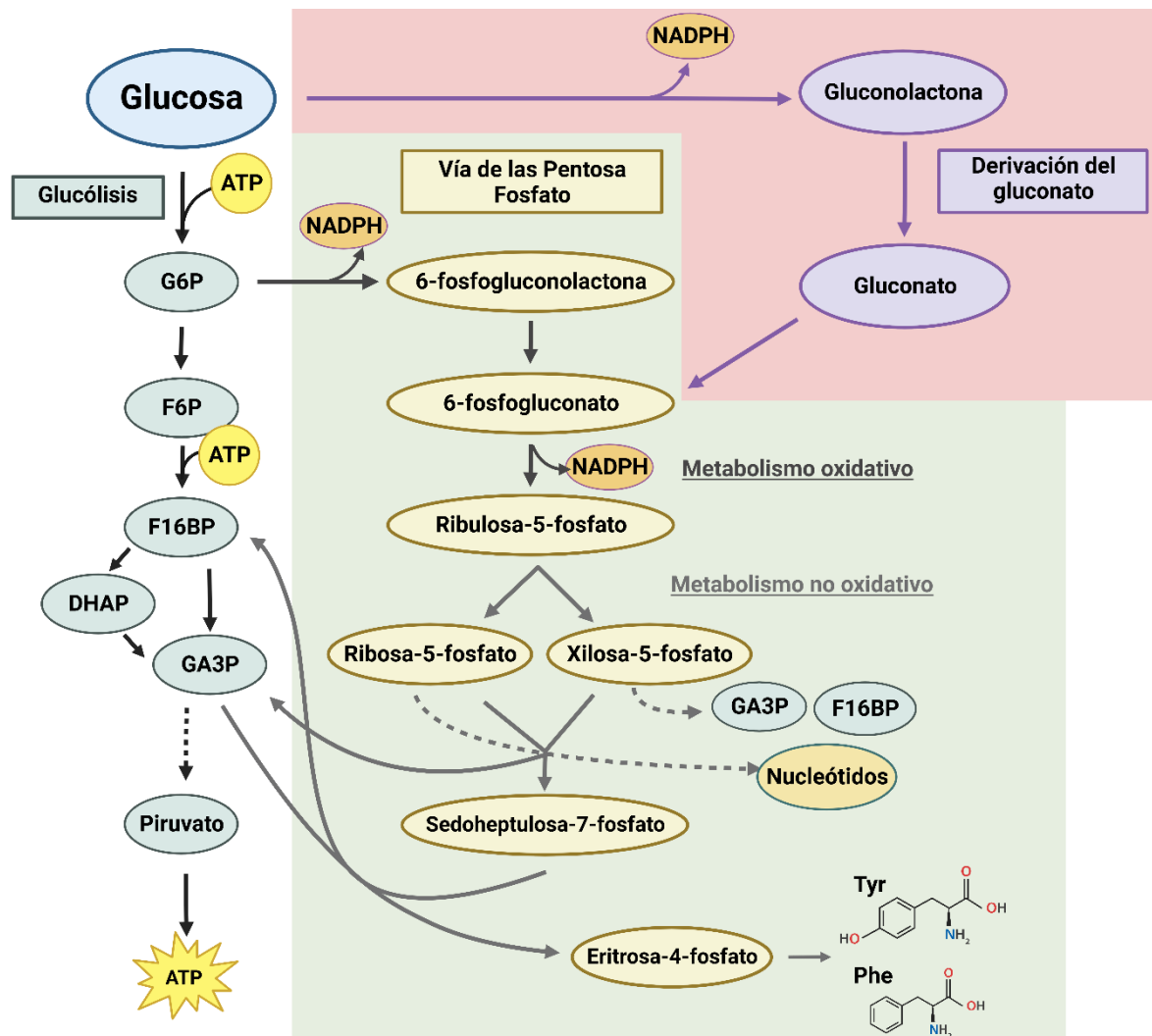


Figura 4. Interconexión de la glucólisis con la ruta de las pentosas fosfato y la derivación del gluconato en *S. pombe*. El metabolismo de la glucosa es crucial debido a su papel como fuente de carbono y energía, para aumentar su rendimiento durante el crecimiento fermentativo *S. pombe* ha desarrollado interconexiones entre las glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la derivación del gluconato; de forma que se garantice un mantenimiento de un alto flujo glicolítico. Abreviaturas: Glucosa-6-fosfato (G6P); Fructosa-6-fosfato (F6P); Fructosa-1,6-bifosfato (F16BP); Dihidroxiacetona-fosfato (DHAP); Gliceraldehído (GA3P). Adaptada de Corkins et al., 2017.

Finalmente, en la vía PPP, parte del carbono se redirige a la glucólisis (**Figura 4**) (Akram et al., 2019; Bouzier-Sore & Bolaños, 2015; Ghanem et al., 2021; Patra & Hay, 2014). Este desvío contribuye al mantenimiento de un alto flujo glicolítico en *S. pombe* necesario para la obtención de energía (metabolismo del piruvato) y de esqueletos carbonados necesarios para la biosíntesis de aminoácidos como el GA3P, el fosfoenolpiruvato y el piruvato (Alam et al., 2022). Además, el NADPH generado en la vía PPP participa en la descomposición metabólica de las ROS generadas durante el crecimiento aeróbico, ya que es una fuente de equivalentes de reducción para el sistema glutatión/glutatión-peroxidasa/glutatión-reductasa (Averill-Bates, 2023; Minard & McAlister-Henn, 2001).

1.2.1.4 Reoxidación del NADH citosólico y su conexión con el metabolismo del glicerol en *S. pombe*: una visión general.

La homeostasis de las reacciones redox es un requisito fundamental para el metabolismo y el crecimiento de todos los seres vivos. El potencial redox intracelular está determinado por la relación NADH/NAD⁺, y en menor medida por la relación NADPH/NADP⁺ (Vemuri et al., 2007). El NADH es un metabolito altamente conectado a la red metabólica participando en más de 200 reacciones metabólicas en levaduras (Förster et al., 2003). Esto implica que cambios en la relación NADH/NAD⁺ afectan de forma generalizada al metabolismo celular (Nielsen, 2003).

El NADH se sintetiza principalmente en el citosol mediante la glucólisis y en las mitocondrias por el ciclo de Krebs. Sin embargo, tanto el NADH como el NAD⁺ citosólicos son incapaces de atravesar la membrana mitocondrial (von Jagow & Klingenberg, 1970), es por ello que las células eucariotas emplean distintos mecanismos para oxidar al NADH citosólico en las mitocondrias. En *S. pombe*, la deshidrogenasa de NADH mitocondrial externa Nde2 que se encarga de reoxidar el NADH citosólico (**Figura 5**) (Luttik et al., 1998). La otra alternativa es que los electrones del NADH citosólico sean «lanzados» a través de la membrana mitocondrial interna mediante lanzaderas de NADH, como la lanzadera aspartato-malato (Borst, 2020; Easlson et al., 2008) y la lanzadera glicerol-3-fosfato (G3P) (Mollapour & Piper, 2007; Mracek et al., 2013). La principal diferencia entre ambas lanzaderas es que la lanzadera G3P transfiere los electrones directamente a la ubiquinona de la ETC mitocondrial (**Figura 5**).

En *S. pombe*, la lanzadera G3P está formada por dos subunidades: la G3P deshidrogenasa citosólica (codificada por *gpd1/2⁺*) que oxida al NADH citosólico cediendo dos equivalentes de reducción a la DHAP y rindiendo G3P. Acto seguido, otra isoenzima, la G3P deshidrogenasa mitocondrial (codificada por *gut2⁺*) transfiere esos electrones desde el G3P a la ubiquinona, volviendo a regenerar la DHAP (Figura 5) (Overkamp et al., 2000). Esto genera un menor flujo de protones ya que los electrones entran en la ETC en un paso posterior al complejo I (Figura 5). Adicionalmente, mediante esta lanzadera la célula contribuye a la formación de glicerol cuando la tasa de formación de NADH supera su tasa de oxidación (Larsson et al., 1998). La excreción del glicerol producido permite proteger a la célula de las variaciones en el potencial osmótico del medio externo (Flores et al., 2000).

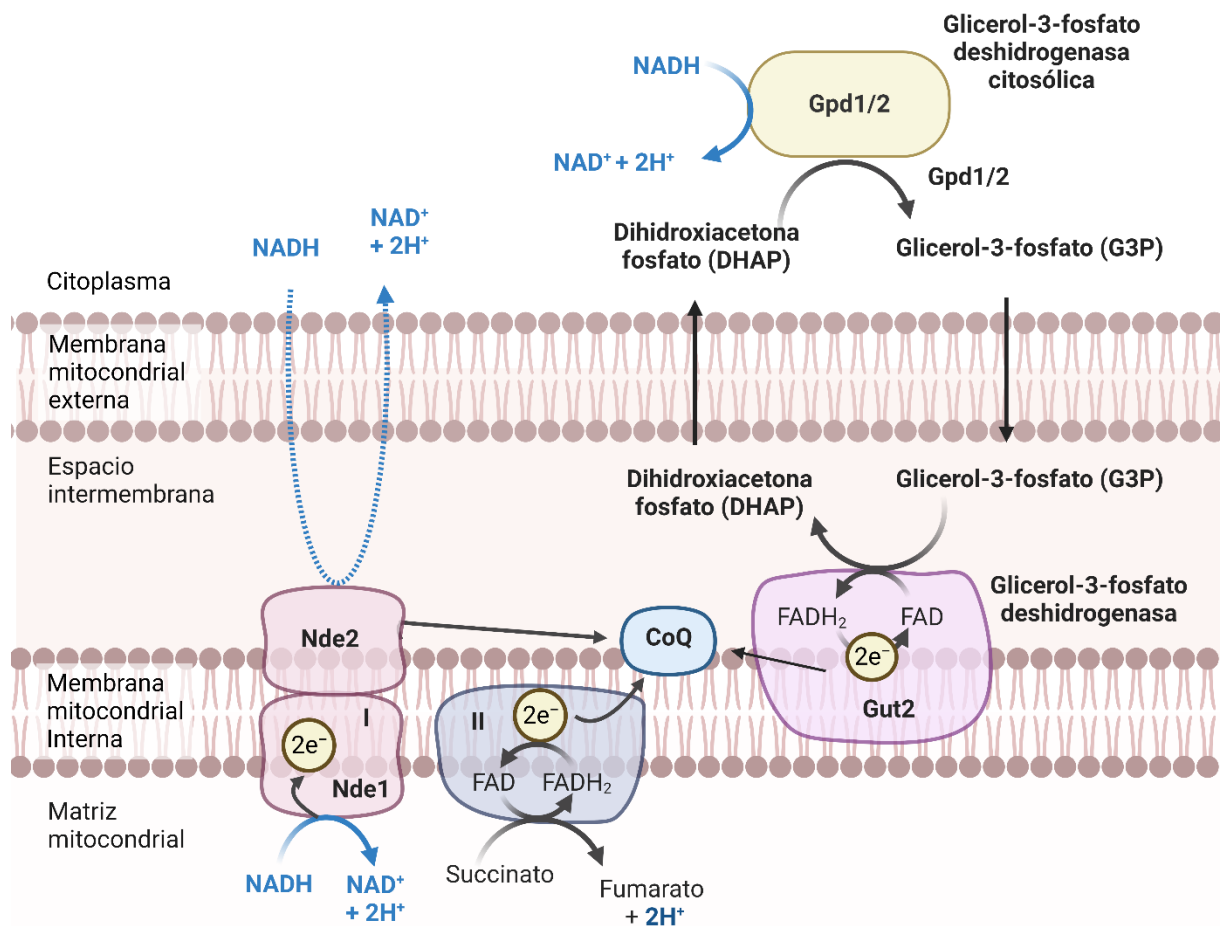


Figura 5. Mecanismos de reoxidación del NADH citosólico en *S. pombe*. Representación esquemática del sistema basado en NADH deshidrogenasa externa mitocondrial (Nde2), y de la lanzadera basada en la reducción de la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (G3P). Adaptada de Overkamp et al., 2000.

1.2.2 Adaptación a la escasez de glucosa: cambio diaúxico, metabolismo de fuentes de carbono alternativas y metabolismo respiratorio en *S. pombe*.

En medios ricos en glucosa, las levaduras Crabtree positivas reprimen la respiración y el metabolismo de fuentes de carbono alternativas mediante la represión por glucosa (CCR) (De Deken, 1966). A medida que la glucosa se vuelve un recurso limitante, las células de levadura comienzan a utilizar otras fuentes de carbono alternativas liberadas al medio durante el metabolismo fermentativo como el glicerol, el etanol y el acetato (Flores et al., 2000). Para ello las células transitan de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio, proceso conocido como cambio diaúxico.

En levaduras se ha observado que el cambio diaúxico se estructura en tres grandes etapas: i) antes del agotamiento de la glucosa ocurre la disminución del flujo glicolítico mediada por la regulación negativa de la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa (Kamrad et al., 2020; Zampar et al., 2013); ii) tras el agotamiento de la glucosa, se revierte el flujo del carbono dirigido a la glucólisis, y además, en *S. cerevisiae* se regula positivamente el ciclo del glioxilato (de Jong-Gubbels et al., 1996; Oda et al., 2015; Zampar et al., 2013); y por último, (iii) se promueve la inhibición de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la reconfiguración de estrategias alternativas para la regeneración del NADPH (Fraile Beneitez et al., 2020; Zampar et al., 2013). Además, durante el cambio diaúxico las células presentan una tasa de crecimiento reducida y cambios profundos en la estructura y función mitocondrial (Di Bartolomeo et al., 2020; Zampar et al., 2013).

S. pombe presenta notables diferencias en el metabolismo del carbono respecto a *S. cerevisiae*. Por un lado, las levaduras de fisión carecen de las enzimas clave del ciclo del glioxilato, siendo incapaces de crecer en medios cuya única fuente de carbono disponible sea el etanol o el acetato (de Jong-Gubbels et al., 1996; Flores et al., 2000; Klein et al., 2013; Tsai et al., 1987). Además, aunque en ambas levaduras los genes implicados en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y el ciclo de Krebs se expresan de forma similar tras el déficit de glucosa, en *S. pombe* los genes que codifican el complejo de la piruvato deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa disminuyen su expresión, reduciendo la eficiencia del uso del piruvato en la respiración (Rhind et al., 2011). Adicionalmente, ante la escasez de glucosa, *S. pombe* optimiza el flujo de glucosa entre la glucólisis y la vía PPP mediante el factor de transcripción Rsv1 (Kim et al., 2020). Esto lo consigue al reprimir directamente la expresión de genes implicados, no solo en la derivación del gluconato (*gcd1⁺*), sino también directamente en la entrada de la vía PPP (*gnd1⁺*) (Fraile Beneitez et al., 2020). Este mecanismo, observado también en *S. cerevisiae*, provoca una reducción del flujo en las reacciones oxidativa de la vía PPP, cesando la producción de NADPH, sin afectar a la síntesis de ribosa y eritrosa (**Figura**

4) (Zampar et al., 2013). No obstante, debido a la relevancia fisiológica del NADPH para los procesos biosintéticos, las células han desarrollado otras alternativas metabólicas para su generación, como las reacciones oxidativas del metabolismo del etanol (oxidación del acetaldehído a acetato catalizada por la aldehído deshidrogenasa) (Navarro-Aviño et al., 1999), y el ciclo del glioxilato en *S. cerevisiae* (Zampar et al., 2013). Esta redirección de la síntesis de NADPH es una estrategia metabólica para que las células aumenten su eficiencia energética, debido a que ante una fuente de carbono no fermentable, las células requerirían de mucha energía para aumentar el flujo a través de la gluconeogénesis y producir el precursor de la ruta PPP (Zampar et al., 2013). Por otra parte, y también de forma dependiente de Rsv1, *S. pombe* induce la expresión de diversos genes entre los que destaca la G3P deshidrogenasa mitocondrial *gut2*⁺ (reoxidación del NADH citosólico). De este modo, la alta producción de NADH derivado del metabolismo del etanol promueve la activación de vías alternativas, como la lanzadera G3P, para su reoxidación (Fraile Beneitez et al., 2020).

Ante esta intensa reprogramación metabólica efectuada durante el cambio diaúxico, no es sorprendente que la célula requiera de precursores nutricionales que sustenten eficazmente la transición al metabolismo respiratorio (Esteban-Martínez et al., 2017; Rambold & Lippincott-Schwartz, 2011). En línea con esto, en *S. cerevisiae* se ha señalado que ante la escasez de glucosa, la serina derivada de la autofagia es esencial para apoyar la síntesis de proteínas mitocondriales necesarias para la adaptación eficaz al crecimiento respiratorio (May et al., 2020). Además, se ha descrito que en *S. cerevisiae* la propia maquinaria central de la autofagia es esencial para mantener y lograr una transición eficaz al metabolismo respiratorio (Yi et al., 2017). Por su parte, en *S. pombe*, hasta la fecha no se ha observado ninguna evidencia que relacione la autofagia con el metabolismo respiratorio.

1.2.2.1 Metabolismo de fuentes de carbono alternativas en *S. pombe*.

1.2.2.1.1 Metabolismo del etanol o acetato en *S. pombe*.

En *S. pombe*, la producción de etanol coincide con la utilización de la glucosa, pero al agotarse esta, comienza el uso del etanol con la posterior acumulación de acetato; resultando esto en una fase interlogarítmica corta, pero perceptible, que es característica del crecimiento diaúxico (Tsai et al., 1987). El metabolismo del etanol comienza con la conversión del etanol a acetaldehído por acción de la enzima Adh1. Seguidamente, la acetaldehído deshidrogenasa (Atd1) transforma el acetaldehído, que es potencialmente citotóxico, en acetato. Finalmente, el acetato es el sustrato de la acetil-CoA sintetasa citosólica (Acs1) que lo transforma en acetil-CoA (Flores et al., 2000; Hu et al., 2014; Loviso & Libkind, 2018). Esta vía metabólica es enormemente relevante para la supervivencia celular en levaduras. De hecho, recientemente se ha propuesto que el ácido acético representa una fuente de carbono similar a los cuerpos

cetónicos de mamíferos, y que además promueve la acumulación de carbohidratos protectores como la trehalosa y prolonga el CLS (Hu et al., 2014).

Sorprendentemente, en *S. pombe* el metabolismo del etanol y el acetato (compuestos- C_2) ocurre únicamente en presencia de concentraciones limitantes de glucosa (de Jong-Gubbels et al., 1996; Tsai et al., 1987). De hecho, existen diversas razones que justifican la incapacidad de las levaduras de fisión para no poder crecer en medios cuya única fuente de carbono disponible sean compuestos C_2 (Flores et al., 2000; Rhind et al., 2011). Por un lado, *S. pombe*, a diferencia de *S. cerevisiae*, carece de las dos enzimas clave del ciclo del glioxilato: la isocitrato liasa y la malato sintasa (Kunze et al., 2002; Taylor et al., 1996). En *S. cerevisiae*, el ciclo del glioxilato es una modificación del ciclo de Krebs que sirve de enlace entre las actividades catabólicas y las capacidades biosintéticas, permitiendo a las células utilizar ácidos grasos o compuestos C_2 como única fuente de carbono (Kunze et al., 2006). Además, en esta vía, en lugar de los dos pasos de descarboxilación del ciclo de Krebs, las enzimas clave del ciclo del glioxilato (la isocitrato liasa y la malato sintasa) convierten el isocitrato y el acetil-CoA en succinato y malato, consiguiendo convertir dos acetil-CoA (derivados del metabolismo de compuestos- C_2) en compuestos- C_4 (succinato) que pueden utilizarse para reponer los intermediarios del ciclo de Krebs o funcionar como precursores biosintéticos (Lee et al., 2011). La ausencia de esta ruta en *S. pombe* provoca que el etanol tenga únicamente dos funciones: ser usado como fuente de energía alternativa (Ciclo de Krebs) y fuente de acetil-CoA para las reacciones de biosíntesis (de Jong-Gubbels et al., 1996; Lee et al., 2011; Tsai et al., 1987). Su uso termina por agotar los intermediarios biosintéticos necesarios para mantener el ciclo de Krebs, y por lo tanto, afecta a su correcto funcionamiento y al crecimiento celular (Lee et al., 2011; Tsai et al., 1987).

Por otro lado, cuando *S. pombe* crece en presencia de etanol tiende a acumular acetato en el medio, debido a que en las levaduras de fisión existe una limitación en la conversión de acetato en acetil-CoA. De hecho, a diferencia de *S. cerevisiae*, donde la acetil-CoA sintetasa se induce fuertemente en presencia de etanol; en *S. pombe* esto no ocurre, pudiendo ser la causa principal de la utilización limitada de etanol. Es más, el resto de enzimas implicadas en el metabolismo del etanol (Adh1 y Atd1), tampoco se inducen en su presencia, señalando esto que su principal función radica en el metabolismo de la glucosa, más que en el consumo de etanol (de Jong-Gubbels et al., 1996).

En conjunto, todos estos datos sugieren que *S. pombe* no puede crecer cuando el etanol es la principal fuente de carbono debido a su incapacidad de regenerar los intermediarios biosintéticos (ausencia de ciclo del glioxilato) y a la ausencia de una maquinaria capaz de emplear el etanol/acetato adecuadamente.

1.2.2.1.2 Metabolismo del glicerol en *S. pombe*.

El glicerol es un polialcohol con tres carbonos que es empleado por múltiples seres vivos para protegerse frente a diferentes formas de estrés (osmótico, térmico, oxidativo, etc.) (Matsuzawa et al., 2010). Adicionalmente, el glicerol puede ser usado como fuente de energía y de carbono. Su asimilación en *S. cerevisiae* es efectuada a través de la vía G3P cuyas etapas son: (i) el glicerol es fosforilado por la glicerol quinasa (Gut1), dando lugar a G3P; (ii) el G3P es incorporado en la mitocondria, donde la G3P deshidrogenasa mitocondrial (Gut2) promueve la oxidación del G3P a DHAP; (iii) la DHAP es devuelta al citoplasma, convirtiéndose en GA3P por acción de la triosafosfato isomerasa; (iv) finalmente, el GA3P puede continuar su paso por la glucólisis y promover la oxidación completa del glicerol (Overkamp et al., 2002; Pavlik et al., 1993; Ronnow & Kielland-Brandt, 1993). Por su parte, *S. pombe* carece de la actividad glicerol quinasa característica de la ruta G3P, empleando entonces para la asimilación del glicerol la vía DHAP. En esta vía están implicadas la glicerol deshidrogenasa Gld1, que media la conversión del glicerol en dihidroxiacetona (DHA); y las quinasas redundantes Dak1/2, que fosforilan a la DHA dando lugar a DHAP (Lewin et al., 1990; Matsuzawa, Hara, et al., 2012). Finalmente, la DHAP puede incorporarse a la vía glicolítica tras la acción de Tpi1 (**Figura 6**).

La expresión de *gld1⁺*, *dak1⁺* y *dak2⁺* se encuentra regulada por la CCR, y es independiente de la presencia de glicerol (Malecki et al., 2016; Matsuzawa et al., 2010). Esto explica por qué *S. pombe* no es capaz de crecer en un medio en el que el glicerol sea la única fuente de carbono disponible. Sin embargo, en presencia de glicerol y concentraciones limitantes de otras fuentes de carbono alternativas como la glucosa, la galactosa o el etanol; la expresión de estos genes se induce fuertemente (Malecki et al., 2016; Matsuzawa, Hara, et al., 2012; Vassiliadis et al., 2019), lo que permite metabolizar el glicerol (Matsuzawa et al., 2010).

Actualmente, el motivo por el cual la expresión de *gld1⁺*, *dak1⁺* y *dak2⁺* no es suficiente para promover la asimilación de glicerol cuando es la única fuente de carbono disponible es desconocido (Matsuzawa et al., 2010). Se ha sugerido que puede deberse a la baja tasa de incorporación del glicerol, ya que *S. pombe* no es capaz de transportar el glicerol al interior celular tan activamente como *S. cerevisiae*. De hecho, en las levaduras de fisión no se ha identificado ningún homólogo al transportador Stl1 de *S. cerevisiae*, el cual media un simporte glicerol/H⁺ (Matsuzawa et al., 2010; Mollapour & Piper, 2007; Vassiliadis et al., 2019). Adicionalmente, se ha planteado la posibilidad de que, de forma paralela a la expresión de *gld1⁺*, *dak1⁺* y *dak2⁺*, se expresen proteínas implicadas en la incorporación del glicerol todavía desconocidas (Matsuzawa, Hara, et al., 2012; Matsuzawa et al., 2010).

Metabolismo del Glicerol

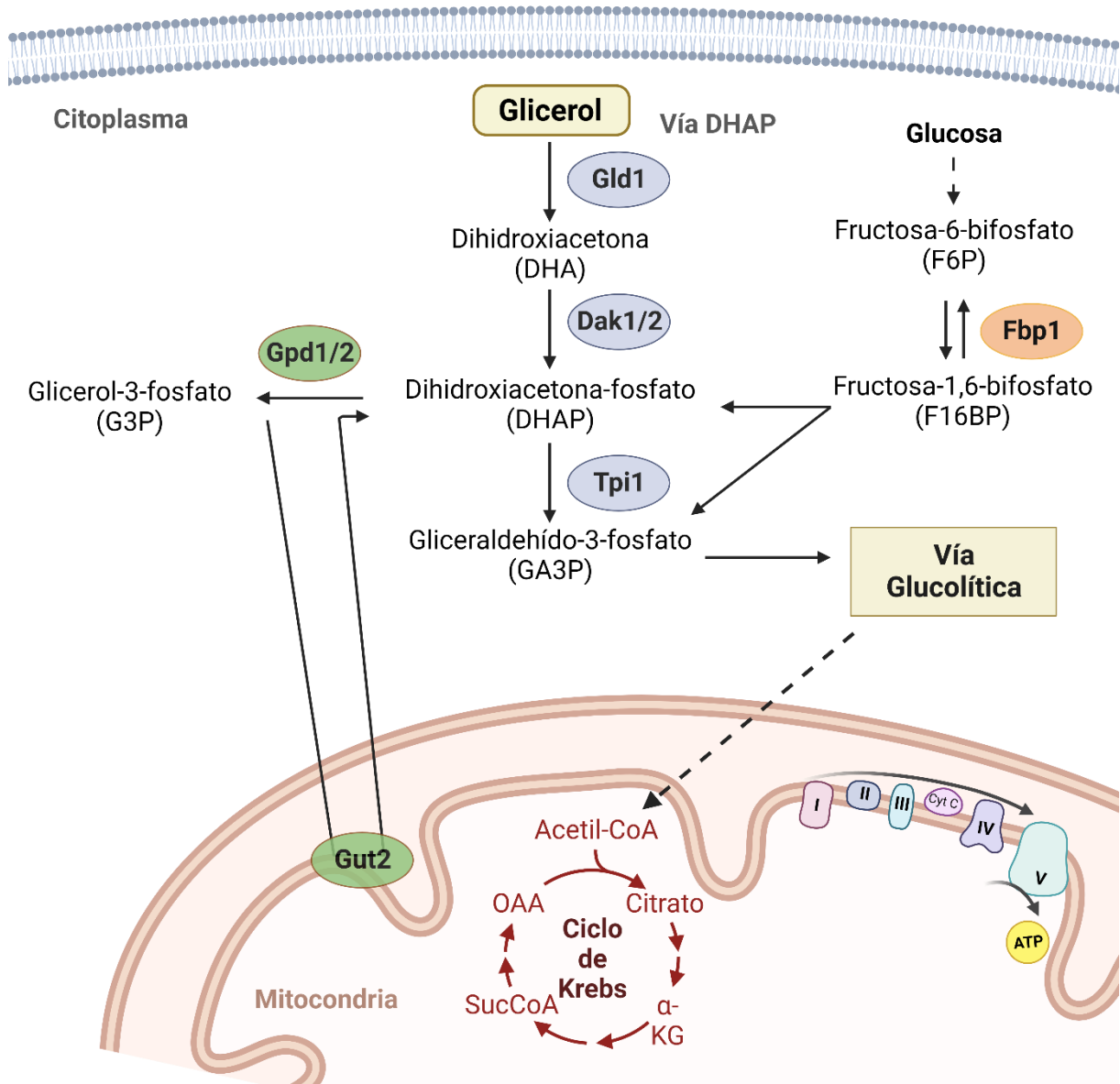


Figura 6. Metabolismo del glicerol en *S. pombe*. Una vez incorporado el glicerol es metabolizado a través de la vía DHAP: (1) El glicerol es oxidado a dihidroxiacetona (DHA) por acción de la glicerol deshidrogenasa (Gld1); (2) seguidamente, la DHA es fosforilada por las quinases Dak1/2 (DHA quinasa) produciendo DHAP; (3) a continuación, Tpi1 (Triosafosfato isomerasa) cataliza la conversión de DHAP a GA3P. Finalmente, el GA3P generado puede continuar su paso por la glucólisis (oxidación completa del glicerol) o hacia la gluconeogénesis. Adaptada de Matsuzawa et al., 2010.

1.2.2.2 Metabolismo respiratorio: la contribución clave del metabolismo del piruvato al ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa en *S. pombe*.

Ante la escasez de glucosa, y tras la reprogramación metabólica de la célula (cambio diaúxico), el piruvato generado en la última etapa de la glucólisis, debe entrar al lumen de la mitocondria para ser catabolizado en el ciclo de Krebs, también conocido como ciclo del Ácido Cítrico o ciclo de los Ácidos tricarboxílicos (Krebs & Johnson, 1980); y cuyos equivalentes energéticos (NADH y FADH₂) serán oxidados mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que ocurre en la ETC localizada en la membrana mitocondrial interna.

1.2.2.2.1 Metabolismo del piruvato en *S. pombe*.

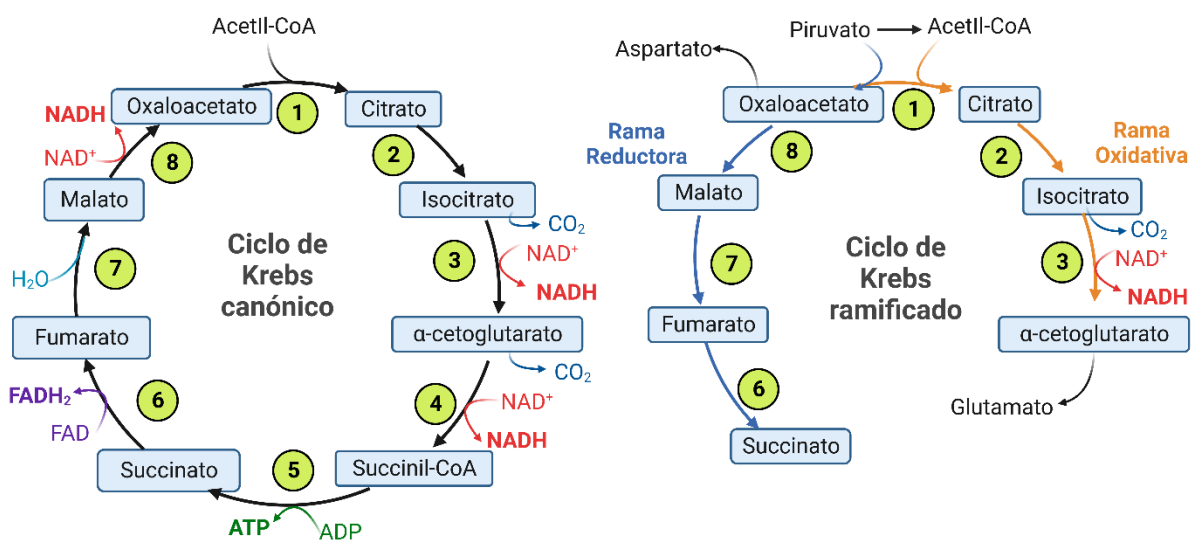
Inicialmente, en *S. pombe* la entrada del piruvato al ciclo de Krebs implica su transformación en acetil-CoA. Este proceso requiere de una descarboxilación oxidativa irreversible mediada por un complejo multienzimático que se encuentra en la mitocondria, la piruvato deshidrogenasa (compuesta por las subunidades: Pda1, Pdb1) (Flores et al., 2000); cuyo funcionamiento depende de la disponibilidad de piruvato y acetil-CoA. En esta reacción, el piruvato pierde su grupo carboxilo en forma de molécula de CO₂ y los dos carbonos restantes se transforman en el grupo acetilo del acetil-CoA, reacción que va acompañada de la generación de una molécula de NADH.

Adicionalmente, en *S. pombe*, el acetil-CoA puede formarse en el citosol e incorporarse a la mitocondria mediante un fenómeno denominado «*bypass del piruvato*» (Flores et al., 2000). Esta síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato se encuentra catalizada por las enzimas Pdc101/2, Atd1 y Acs1 (de Jong-Gubbels et al., 1996; Flores et al., 2000). De esta manera, se incrementa la disponibilidad de acetil-CoA, el cual está implicado en numerosas reacciones catabólicas (metabolismo fermentativo y respiratorio) y anabólicas (biosíntesis de lípidos, aminoácidos y gluconeogénesis).

1.2.2.2.2 Ciclo de Krebs en *S. pombe*.

En el lumen mitocondrial de *S. pombe*, el ciclo de Krebs comienza con la síntesis del citrato tras la reacción del acetil-CoA con el oxalacetato catalizada por la citrato sintasa (Cit1) (Flores et al., 2000; Kanehisa & Goto, 2000). A continuación, el citrato es convertido en isocitrato por acción de la aconitasa (Aco1/2), que posteriormente es descarboxilado oxidativamente por la isocitrato deshidrogenasa (Idh1/2 o Idp1) dando lugar a α -cetoglutarato (2-oxoglutarato). Estas isoenzimas son dependientes del NAD⁺ como aceptor de electrones. El paso siguiente, es otra descarboxilación oxidativa mediante la cual el α -cetoglutarato se convierte en succinil-CoA. Esta reacción está mediada por el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, cuyas subunidades son Kgd1/2/4 y Dld1. Seguidamente, la hidrólisis del succinil-CoA catalizada por la succinil-CoA sintetasa (Lcs2) promueve la síntesis de ATP o

GTP, dando lugar a succinato, el cual se oxida a fumarato por acción de la succinato deshidrogenasa (Sdh1/2/3 y Tim18), la única enzima del ciclo de Krebs acoplada a la membrana mitocondrial interna (Complejo II de la ETC mitocondrial). En este paso, los electrones son cedidos al FAD, para generar FADH₂. Posteriormente, se produce la hidratación del fumarato a L-malato por acción de la fumarasa (Fum1). Finalmente, el L-malato es convertido en oxalacetato por acción de la L-malato deshidrogenasa (Mdh1), la cual hace uso del cofactor NAD⁺ como aceptor de electrones. Este oxalacetato producido entrará de nuevo en el ciclo (**Figura 7**).



Enzimas implicadas en el Ciclo de Krebs en <i>S. pombe</i>	
1 Citrato sintasa (Cit1)	5 Succinil-CoA sintasa (Lcs2)
2 Aconitasa (Aco1/2)	6 Succinato deshidrogenasa (Sdh1/2/3 y Tim18)
3 Isocitrato deshidrogenasa (Idh1/2 o Idp1)	7 Fumarasa (Fum1)
4 α-cetoglutarato deshidrogenasa (Kgd1/2/4 y Did1)	8 L-malato deshidrogenasa (Mdh1)

Figura 7. Ciclo de Krebs en *S. pombe*. Este conjunto de etapas constituye la continuación del catabolismo de la glucosa en la matriz mitocondrial una vez formado el acetil-CoA. La vía canónica del ciclo de Krebs es la implicada en el metabolismo energético, y la vía ramificada del ciclo de Krebs está implicada en la síntesis de intermediarios biosintéticos. Adaptada de Alam et al., 2022.

Además de su papel en el metabolismo respiratorio, en *S. pombe* el ciclo de Krebs está implicado en la síntesis de precursores cruciales para el crecimiento como el α -cetoglutarato y el oxalacetato, que se emplean en la biosíntesis de aminoácidos como glutamato y aspartato (Birsoy et al., 2015; Sullivan et al., 2015); y en la gluconeogénesis (**Figura 7**) (Kunze et al., 2002). La biosíntesis de intermediarios biosintéticos tiene lugar gracias a la bifurcación o ramificación del ciclo de Krebs (Alam et al., 2022). La ramificación del ciclo de Krebs consta de una rama oxidativa que va desde el acetil-CoA al α -cetoglutarato; y una rama reductora que comienza en la carboxilación del piruvato a oxalacetato, y culmina con la conversión a malato, fumarato y succinato (**Figura 7**) (Alam et al., 2022; Camarasa et al., 2003) Recientemente, se ha señalado que esta bifurcación del ciclo de Krebs es esencial en *S. pombe* para mantener el crecimiento durante el metabolismo respiratorio. Además, se observado que ambas funciones del ciclo de Krebs dependen estrechamente de la capacidad de las levaduras de fisión para oxidar eficazmente el NADH en la ETC mitocondrial (Alam et al., 2022).

1.2.2.2.3 Fosforilación oxidativa (OXPHOS) en *S. pombe*.

La OXPHOS es la culminación del metabolismo energético en los seres vivos aerobios, y tiene lugar en la membrana interna de las mitocondrias. En ella, la electrones provenientes de las reacciones de oxidación del NADH y del FADH₂ son transferidos a una serie de complejos de la ETC mitocondrial, promoviendo un flujo de protones que genera el potencial transmembrana responsable, en última instancia, de la síntesis de ATP (Compagno et al., 2014; de Kok et al., 2012; Pfeiffer & Morley, 2014; van Gulik & Heijnen, 1995; Verduyn et al., 1991). En su etapa final, el oxígeno molecular (O₂) actúa como aceptor final de electrones y se reduce a agua (H₂O); reacción esencial para mantener el flujo de electrones, y por lo tanto, el gradiente electroquímico de protones empleado para producir ATP.

La rápida proliferación de *S. pombe* en condiciones fermentativas depende parcialmente del papel de la respiración mitocondrial como suministrador de aminoácidos e intermediarios biosintéticos derivados del ciclo de Krebs (Kamrad et al., 2020; Malecki et al., 2016; Malecki et al., 2020). Esta dependencia, se ve agudizada durante el crecimiento en medio mínimo, pues la célula debe lidiar con la síntesis de los precursores biosintéticos que no están disponibles en el medio. Es por esto que, para garantizar el crecimiento en medio mínimo, la ETC mitocondrial debe ser plenamente funcional (Malecki et al., 2016; Malecki et al., 2020).

La ETC cuenta con cinco complejos sintetizados a partir del genoma nuclear, cuya composición se describe a continuación:

- i. **Complejo I**, conocido como NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa mitocondrial interna. En *S. pombe* está codificado por *nde1⁺*. Este complejo cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona (CoQ), para generar ubiquinol (QH₂) que difunde por la bicapa lipídica hasta el complejo II. Este flujo provoca que se genere una diferencia de potencial entre la matriz y el espacio intermembrana (aproximadamente 4 protones por cada par de electrones) (**Figura 8**). En *S. pombe*, la función de este complejo es inhibida por la isoflavona rotenona (Graef & Nunnari, 2011; Jiang et al., 2021).
- ii. **Complejo II**, denominado Succinato deshidrogenasa, es la única enzima del ciclo de Krebs que está ligado a la membrana mitocondrial. Contiene FAD (flavín-adenín-dinucleótido) unido covalentemente, y cuya función es actuar como aceptor de electrones para generar FADH₂, que cede sus electrones a la CoQ (**Figura 8**). La función de este complejo es inhibida por la 2-thenoyltrifluoroacetona (TTFA) (Graef & Nunnari, 2011; Jiang et al., 2021).
- iii. **Complejo III**, denominado Ubiquinol-citocromo C óxido-reductasa. Este complejo en *S. pombe* está constituido por diferentes subunidades codificadas por *cob1⁺*, *cyc1⁺*, *cyt1⁺*, *qcr10⁺*, *qcr2⁺*, *qcr6⁺*, *qcr7⁺*, *qcr8⁺*, *qcr9⁺* y *rip1⁺* (Lang & Wolf, 1984). Su función es acoplar el flujo de electrones desde el QH₂ al citocromo C (1 electrón por citocromo). Además, este complejo promueve el flujo de protones desde la matriz al espacio intermembrana (aproximadamente 4 protones por cada par de electrones) (**Figura 8**). La función de este complejo es inhibida por un tratamiento de las células con Antimicina A (AA) (Graef & Nunnari, 2011; Jiang et al., 2021; Malecki et al., 2016).
- iv. **Complejo IV**, conocido como Citocromo C oxidasa. Este complejo en *S. pombe* está constituido por diferentes subunidades: *cox1⁺*, *cox12⁺*, *cox13⁺*, *cox2⁺*, *cox3⁺*, *cox4⁺*, *cox5⁺*, *cox6⁺*, *cox7⁺*, *cox8⁺*, *cox9⁺* y *cyc1⁺* (Ahne et al., 1984; Lang & Wolf, 1984). Su función es transportar los electrones desde el citocromo C al oxígeno molecular (O₂), reduciéndolo a agua. Para realizar esta reducción del O₂ se necesitan de forma simultánea cuatro moléculas de citocromo C. Adicionalmente, este complejo bombea un protón al espacio intermembrana por cada electrón (**Figura 8**). La función de este complejo es inhibida por azida sódica o cianuros (Graef & Nunnari, 2011; Jiang et al., 2021).
- v. **Complejo V**, también llamado ATP sintasa. En la formación de este complejo en *S. pombe* participan una serie de genes que dan lugar a las diferentes subunidades implicadas en el ensamblaje del complejo ATP sintetasa (*atp10⁺*, *atp11⁺*, *atp12⁺*, *atp23⁺*, *fmc1⁺*, *ina17⁺* y *SPAC1834.10c⁺*) y del mecanismo rotacional o «revolver» (*atp1⁺*, *atp14⁺*, *atp15⁺*, *atp16⁺*, *atp17⁺*, *atp18⁺*, *atp19⁺*, *atp2⁺*, *atp20⁺*, *atp3⁺*, *atp4⁺*, *atp5⁺*, *atp6⁺*, *atp7⁺*, *atp8⁺*, *atp9⁺*, *tim11⁺* y *vma1⁺*) (Boutry & Douglas, 1983; Falson et al., 1991;

Lang & Wolf, 1984). Su función es promover la síntesis de ATP haciendo uso de la energía proveniente de la diferencia en la concentración de protones y la separación de cargas a ambos lados de la membrana mitocondrial interna. La síntesis ocurre a medida que los protones retornan a la matriz mitocondrial a través de un poro presente en la ATP sintasa (**Figura 8**). La función de este complejo es inhibida por la oligomicina, un macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces* (Graef & Nunnari, 2011; Jiang et al., 2021).

Estos complejos de la ETC pueden ensamblarse en unidades funcional y estructuralmente más grandes, también conocidas como «respirasomas», que permiten minimizar las distancias de difusión de los sustratos para un flujo de electrones más efectivo a través de la ETC mitocondrial. Se ha propuesto que la desestabilización de estos supercomplejos está relacionada con el envejecimiento mitocondrial (Gómez & Hagen, 2012). Además, su velocidad de ensamblaje/desensamble afecta a la capacidad de producción de ROS de las mitocondrias (Genova & Lenaz, 2015; Moreno-Loshuertos & Enríquez, 2016), sugiriendo que la incapacidad para formar estas grandes unidades o su continua degradación podría ser un factor importante relacionado con el envejecimiento y el estrés oxidativo (Genova & Lenaz, 2015).

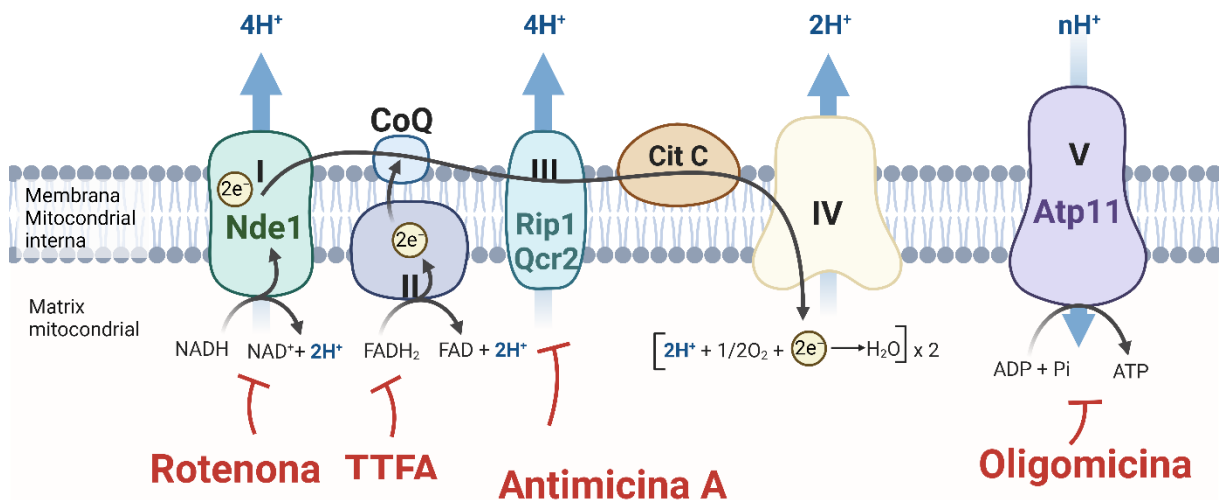


Figura 8. Cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial en *S. pombe*. Representación esquemática del flujo de electrones y protones mediado por cada uno de los componentes de la ETC mitocondrial. Se indican algunas subunidades clave en su correcto funcionamiento en *S. pombe* como: Nde1, Rip1, Qcr2 y Atp11. Por otra parte, se muestran los inhibidores que bloquean la función de cada uno de los complejos.

1.2.3 Señalización molecular tras la escasez de glucosa y su impacto en la adaptación celular en *S. pombe*: una visión general.

Como se ha comentado anteriormente, en presencia de glucosa las células de levadura obtienen su energía de la fermentación, proceso por el que la glucosa es metabolizada preferentemente a través de la glucólisis para producir compuestos de carbono no fermentables como el etanol. Durante el crecimiento exponencial o fase logarítmica, las células crecen rápidamente hasta que la glucosa del medio se agota. A partir de este momento, en *S. pombe* se produce una detención del crecimiento fermentativo y una intensa reprogramación metabólica donde se efectúa la entrada en un estado de quiescencia (Klein et al., 2013; Klement et al., 2011; Masuda et al., 2016) y se activa la expresión de genes implicados en el cambio diaúxico. Esta transición metabólica está rigurosamente regulada por numerosas vías de señalización intracelular entre las que destacan: la vía TOR, la vía AMPc-PKA, la vía AMPK y las rutas de señalización dependientes de MAPK (Adnan et al., 2017; Malecki et al., 2016; Oda et al., 2015; Sideri et al., 2015; Sun & Gresham, 2021). Estas vías de señalización actúan sobre diferentes efectores (factores de transcripción, proteínas quinasas y fosfatasas) orquestando eficazmente esa reprogramación metabólica. Este aspecto se examinará con más detalle en secciones posteriores (Ver **Apartado 3.2**).

Finalmente, una vez se ha efectuado eficazmente la adaptación del metabolismo y se han consumido las fuentes energéticas disponibles, las células Q de *S. pombe* detienen la progresión del ciclo celular y mantiene la viabilidad durante largos periodos de inanición, conservando la capacidad de reanudar el crecimiento rápidamente en presencia de nutrientes (Allen et al., 2006; Gray et al., 2004).

En los seres vivos eucariotas, la capacidad de mantener la supervivencia celular en un estado de quiescencia requiere de la capacidad de utilizar los recursos intracelulares de forma adecuada para mitigar las consecuencias de la escasez de glucosa (Broach, 2012; Gray et al., 2004; Smets et al., 2010). Esta capacidad de degradar eficazmente determinadas porciones del citoplasma sin comprometer la viabilidad celular está mediada por la autofagia (Hwangbo et al., 2020; Morgunova et al., 2021; Rahman & Islam, 2019). Sorprendentemente, en *S. pombe* todas las evidencias previas a la realización de esta Tesis Doctoral descartaban que la inanición de glucosa fuese un estímulo proautofágico y la regulación por vía AMPc-PKA (Mukaiyama et al., 2010).

2 Adaptación al déficit de glucosa en levaduras: el papel de la autofagia.

Ante la escasez de glucosa, las células eucariotas demandan la necesidad de precursores bioenergéticos y biosintéticos que les permitan mantener el metabolismo y los niveles de ATP compatibles con la supervivencia celular; para ello promueven la activación de las vías de degradación de proteínas. Las células eucariotas cuentan con dos estrategias principales para la degradación de proteínas, el sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS) y la autofagia. El UPS es el principal responsable del recambio de proteínas de vida corta (Wang & Le, 2019); y la autofagia es un sistema de degradación masiva de moléculas (ARN, proteínas, etc.) y estructuras propias (orgánulos, agregados proteicos, etc.), que están dañadas, o carecen de utilidad para las células (Mizushima, 2007; Rubinstein & Kimchi, 2012).

2.1 La autofagia: un proceso de reciclaje intracelular fundamental en la adaptación celular.

El término «autofagia» deriva del griego «*autos*» (*αυτος*), uno mismo; y «*phagein*» (*φαγηιν*), comer o alimentar; por lo tanto, significa «comerse uno mismo» (Klionsky et al., 2007; Levine & Klionsky, 2004). Como mecanismo de supervivencia altamente conservado en las células eucariotas, la autofagia actúa como garante de la homeostasis celular y de la calidad de proteínas/orgánulos (Yin et al., 2016).

Por un lado, en ausencia de estrés, los niveles basales de autofagia cumplen una función de limpieza celular, degradando estructuras y componentes celulares propios que están dañados, consiguiendo así mantener la homeostasis celular y combatir el envejecimiento (Levine & Kroemer, 2008; Yin et al., 2016). Por otro lado, ante situaciones de estrés energético o escasez de nutrientes, la función de la autofagia va más allá de la limpieza celular. En estas condiciones, la célula promueve la degradación y el reciclaje de sus propias estructuras y moléculas, para obtener una serie de precursores bioenergéticos y biosintéticos (productos de la degradación) que serán empleados para lograr la supervivencia celular ante la escasez nutricional (He et al., 2018; Russell et al., 2014). Adicionalmente, en estas condiciones, se ha observado que la autofagia desempeña un papel importante en la reducción de la producción de ROS, y en la renovación y biogénesis mitocondrial (Rambold & Lippincott-Schwartz, 2011; Ryter et al., 2013; Twig et al., 2008). Todo esto se ha demostrado que contribuye a la extensión de CLS en levaduras (Alvers et al., 2009; Şeylan & Tarhan, 2023; Zuin et al., 2008).

Fisiológicamente, la autofagia está involucrada en una amplia variedad de procesos celulares como el desarrollo, la proliferación, la remodelación, el envejecimiento y la muerte (Chung & Chung, 2019; Ntsapi & Loos, 2016; Wen & Klionsky, 2016). Todo esto implica que las células deben controlar cuidadosamente la inducción de la autofagia en términos del alcance, la extensión y la duración del proceso, para garantizar resultados beneficiosos, evitando la autosis o desregulación de la autofagia (He et al., 2018). Este fenómeno ocurre cuando, debido a una intensa actividad autofágica, se produce el agotamiento de orgánulos, proteínas y moléculas que son funcionales y/o esenciales; y se desencadena la muerte celular (Meijer & Codogno, 2007; Sampaio-Marques et al., 2019; Sampaio-Marques et al., 2012).

En vista de que la autofagia se encuentra íntimamente conectada con el estado nutricional de la célula, las vías de señalización nutricional adquieren un estatus fundamental como responsables de mantener la homeostasis celular mediante la modulación del equilibrio entre la biosíntesis y los mecanismos de renovación (sistemas de degradación) (Gross & Graef, 2020; Licheva et al., 2022; Lin et al., 2021).

2.1.1 Tipos de autofagia: Macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas.

Existen distintos tipos de autofagia, que varían entre sí según las señales de inducción, el tipo de carga y el mecanismo de secuestro.

La macroautofagia (en adelante, autofagia) es la vía mejor descrita e implica la formación de una estructura transitoria de doble membrana, el fagóforo, que es el compartimento que va a efectuar el secuestro de la porción citosólica u orgánulo a degradar. Después de la expansión y el cierre, esta estructura se convierte en un autofagosoma que acto seguido se fusiona con el lisosoma (en células de mamífero) o la vacuola (en levaduras y plantas) para su degradación. Finalmente, los productos de degradación se transportan de nuevo al citoplasma para su reciclaje (Hu & Reggiori, 2022; Klionsky et al., 2021).

Diversos estudios de la ultraestructura lisosomal en mamíferos (Mortimore et al., 1983) y vacuolar en levaduras (Uttenweiler & Mayer, 2008), han demostrado que los lisosomas/vacuolas pueden degradar los componentes celulares no solo a través de los autofagosomas de la macroautofagia, sino también mediante la invaginación de la carga a través de la membrana lisosomal/vacuolar, proceso conocido como microautofagia (Wang et al., 2023). A diferencia de la macroautofagia, que regula la degradación en respuesta a estímulos nutricionales, la microautofagia se ha descrito como la principal responsable de la degradación basal (Mortimore et al., 1988; Sheng & Qin, 2019; Wang et al., 2023).

Por otra parte, en células de mamíferos y pájaros se ha descrito un tercer tipo de autofagia denominada autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Dice, 2007). En esta vía los lisosomas son capaces de degradar selectivamente proteínas solubles que presentan la señal de degradación 'Lys-Phe-Glu-Arg-Gln' (KFERQ), que es reconocida por la proteína citoplasmática HSC70 (Dice, 2007; Dice et al., 1986). Posteriormente, HSC70 interactúa con la proteína de membrana lisosomal LAMP-2 promoviendo la transferencia de sus dianas a los lisosomas para su degradación (Zhang & Cuervo, 2008).

Por su parte la autofagia puede ser selectiva o no. Respecto a la autofagia inducida en respuesta a un déficit nutricional o a perturbaciones metabólicas, esta es relativamente no selectiva, y esencialmente cualquier parte del citoplasma puede ser reciclada. No obstante, esta degradación puede ser también altamente selectiva para facilitar la eliminación de estructuras dañadas o sobrantes antes de que se vuelvan tóxicas para las células (Gross & Graef, 2020; Yin et al., 2016). La autofagia selectiva se caracteriza por la presencia de señales de degradación, que generalmente incluyen un ligando en la diana u objetivo de degradación, la participación de receptores específicos de autofagia, y al menos una proteína de andamiaje (Kirkin & Rogov, 2019). Hasta el momento, se han descrito numerosas formas selectivas de macroautofagia, como por ejemplo: la mitofagia (degradación selectiva de mitocondrias), la reticulofagia (degradación selectiva de porciones del retículo endoplásmico (RE)), y la ribofagia (degradación selectiva de ribosomas), entre otras (Anding & Baehrecke, 2017; Kirkin & Rogov, 2019). Adicionalmente, numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de diferentes mecanismos de microautofagia selectiva, tanto en mamíferos como en levaduras, encontrando, por ejemplo, la micromitofagia (mitocondrias), la micronucleofagia (núcleo), entre otras (Wang et al., 2023).

2.2 Macroautofagia en levaduras: un estudio comparativo en *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

La autofagia ha sido ampliamente estudiada en la levadura gemante *S. cerevisiae*, permitiendo comprender los mecanismos moleculares implicados en el ensamblaje del autofagosoma (Licheva et al., 2022; Wen & Klionsky, 2016). No obstante, en investigaciones recientes, se ha constatado que los mecanismos que regulan la inducción de la autofagia muestran una mayor semejanza evolutiva con células de mamífero en la levadura de fisión *S. pombe*. Por tanto, este organismo se perfila como un modelo de investigación de gran interés para dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes en la regulación de la autofagia (Mukaiyama et al., 2010; Xu & Du, 2022).

2.2.1 La formación del autofagosoma en *S. cerevisiae*.

2.2.1.1 Maquinaria de la autofagia: Complejos formados por las proteínas Atg.

Aunque la macroautofagia fue descrita por primera vez por Christian de Duve hace aproximadamente cincuenta años (Sheng & Qin, 2019), no fue hasta la década de 1990, cuando el profesor Ohsumi y colaboradores fueron capaces de identificar los múltiples genes relacionados con el control de la autofagia en levaduras (Tsukada & Ohsumi, 1993). Posteriormente, se encontraron homólogos funcionales de casi todos estos genes en eucariotas superiores (Nakatogawa et al., 2009). En 2003, Klionsky y colaboradores nombraron a este conjunto de genes como Atg («*Autophagy related genes*»), y estudiaron las interacciones entre las proteínas que codificaban y sus funciones (D. J. Klionsky, 2007; Klionsky et al., 2003).

La maquinaria molecular central que es esencial para la inducción de macroautofagia en *S. cerevisiae* está formada por un subconjunto de estos genes que codifican 18 proteínas Atg (Atg1–10, Atg-12–14, Atg-16–18, Atg-29 y Atg-31) (**Figura 9; Tabla 1**). En levaduras, estas proteínas Atg son reclutadas de manera jerárquica y, a menudo, en forma de complejos multiproteicos, a una región citoplasmática donde tendrá lugar el ensamblaje del fagóforo (Hu & Reggiori, 2022; Licheva et al., 2022). En *S. cerevisiae* estos complejos se pueden clasificar en seis grupos funcionales:

- El **complejo de iniciación** o **quinasa Atg1** formado por Atg1, Atg13, Atg17, Atg29 y Atg31 (**Figura 9; Tabla 1**). Este complejo es fundamental para el inicio de la autofagia (Wen & Klionsky, 2016; Yin et al., 2016). Por su parte, Atg17, Atg29 y Atg31, son exclusivos de la vía autofágica pues a diferencia de Atg1 y Atg13 no están implicados en la ruta de transporte vacuolar (Cvt, «*Cytoplasm-to-Vacuole Targeting*») (Suzuki et al., 2013).
- Sistema de la **proteína Atg9** (**Figura 9; Tabla 1**). Este sistema aporta lípidos y vesículas lipídicas, y además redistribuye los lípidos entre ambas caras de la membrana del fagóforo en expansión (Orii et al., 2021).
- El **sistema de Atg2 y Atg18** (**Figura 9; Tabla 1**). Este sistema colabora con Atg9 aportando lípidos que contribuyen a la expansión del fagóforo (Noda, 2021; Valverde et al., 2019).
- El **complejo I de fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III (PI3KC3)** está formado por Vps34, Vps15, Atg6, Atg14 y Atg38 (**Figura 9; Tabla 1**). Este complejo genera el fosfolípido fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), el cual sirve como sitio de acoplamiento de las proteínas Atg18, las cuales están implicadas en el reclutamiento de Atg8, Atg9 y Atg12 en el PAS (Obara et al., 2008; Wen & Klionsky, 2016; Yin et al., 2016).

- El **sistema de conjugación similar a ubiquitina de Atg12**, está compuesto por Atg7, Atg10, Atg12, Atg5 y Atg16 (**Figura 9; Tabla 1**). Este sistema genera el complejo Atg12-Atg5/Atg16 capaz de actuar como enzima ubiquitina-ligasa E3 en el sistema de conjugación de Atg8 (Wen & Klionsky, 2016; Yin et al., 2016).
- El **sistema de conjugación similar a ubiquitina de Atg8** está formado por Atg7, Atg3 y Atg8 (**Figura 9; Tabla 1**). Este sistema permite la conjugación de Atg8 a fosfatidiletanolamina (PE), siendo Atg8 fundamental para la expansión del fagóforo y el reclutamiento de carga (Wen & Klionsky, 2016; Yin et al., 2016).

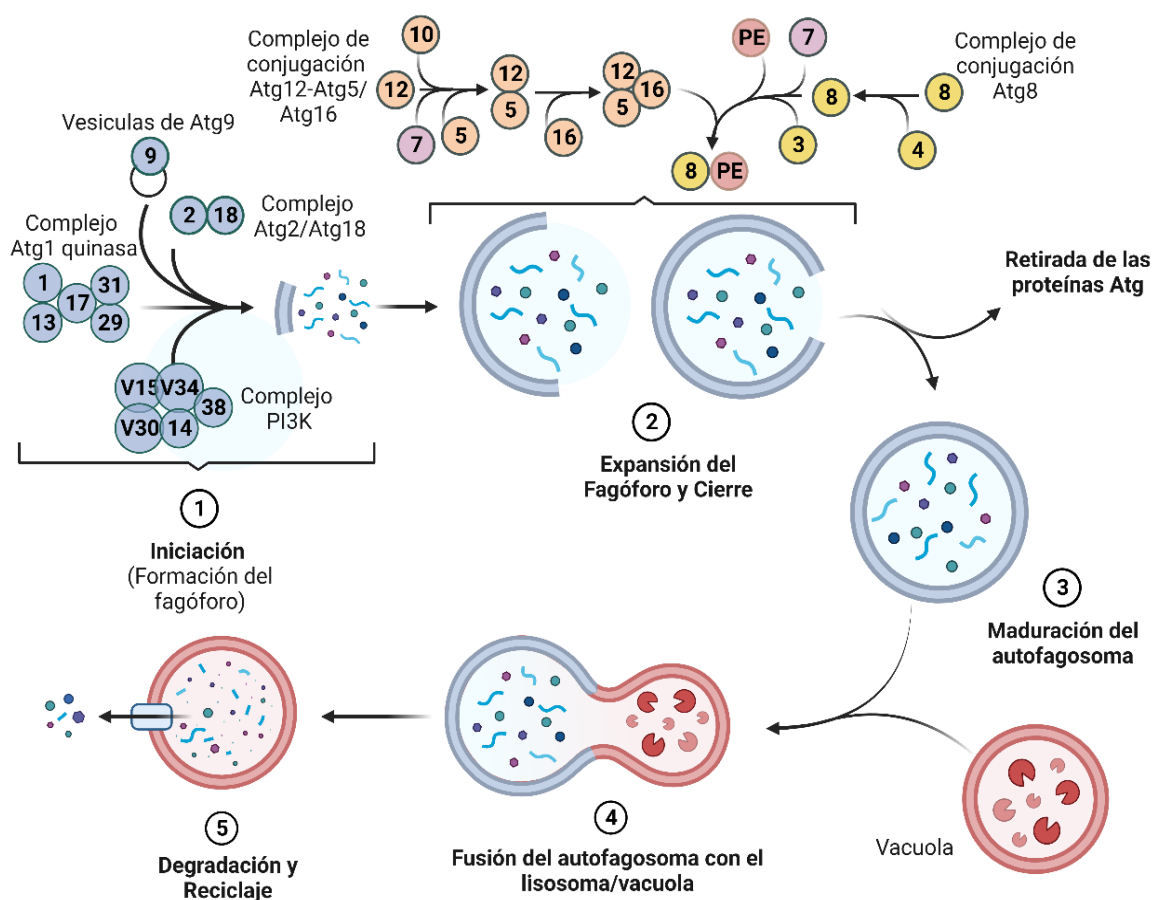


Figura 9. Maquinaria central de la autofagia en *S. cerevisiae*. Esquema de los distintos complejos de proteínas Atg que participan en cada etapa del ensamblaje del autofagosoma. Adaptada de Wen & Klionsky, 2016.

Tabla 1. Comparativa de las principales proteínas Atg implicadas en la autofagia y sus homólogos en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y humanos (Adaptada de Xu & Du, 2022).

Proteínas implicadas en la autofagia en <i>S. cerevisiae</i>	Proteínas implicadas en la autofagia en <i>S. pombe</i>	Proteínas implicadas en la autofagia en humanos	Función
Complejo Atg1			
Atg1	Atg1	ULK1	Serina/Treonina quinasa.
Atg11	Atg11	FIP200	Promueve la dimerización y activación de Atg1.
Atg17	Atg17	-----	Componente del complejo Atg1.
Atg13	Atg13	ATG13	Componente del complejo Atg1.
Atg29	-----	-----	Componente del complejo Atg1.
Atg31	-----	-----	Componente del complejo Atg1.
-----	Atg101	ATG101	Estabilización de Atg13.
Atg9			
Atg9	Atg9	ATG9A/B	Escramblasa lipídica.
Atg23/Atg27	Ctl1	-----	Promueve una localización adecuada de Atg9.
Complejo I de la PI3K			
Vps34	Vps34	VPS34	Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)
Vps15	Vps15	p150	Proteína quinasa que activa a Vps34.
Atg14	Atg14	ATG14	Subunidad del complejo I de la PI3K.
Atg6	Atg6	Beclin 1	Forma un sub-complejo con Atg14.
Atg38	Atg38	NRBF2	Interacciona con Atg8 para estabilizar un circuito de retroalimentación positiva.
Complejo Atg18-Atg2			
Atg2	Atg2	ATG2A	Unión a membrana y transferencia de lípidos.
Atg21	Atg18a	WIPI2B	Recluta el Atg12-Atg5-Atg16.
Atg18	Atg18b	WIPI4	Actúa junto con Atg2 y Atg18c.
	Atg18c		Actúa junto con Atg2 y Atg18b.
Complejo de conjugación Atg12 y Atg8			
Atg12	Atg12	ATG12	Proteína similar a ubiquitina conjugada con Atg5.
Atg7	Atg7	ATG7	Enzima tipo E1 para Atg12 y Atg8.
Atg10	Atg10	ATG10	Enzima tipo E2 para Atg12.
Atg5	Atg5	ATG5	Actúa junto con Atg12 como una enzima tipo E3 para Atg8.
Atg16	Atg16	ATG16L1/2	Promueve el reclutamiento a PAS de Atg12-Atg5.
Atg8	Atg8	LC3 GABARAP	Proteína similar a ubiquitina conjugada con PE.
Atg4	Atg4	ATG4A-D	Proteasa de cisteína que actúa sobre el extremo C-terminal de Atg8.
Atg3	Atg3	ATG3	Enzima tipo E2 para Atg8.
Proteínas implicadas en la autofagia selectiva			
Atg19	Nbr1	NBR1	Transporta hidrolasas vacuolares a la vacuola.
Atg20	Atg20	-----	Promueve la reticulofagia y la mitofagia.
Atg24	Atg24 y Atg24b	-----	Promueve la reticulofagia y la mitofagia.
-----	Epr1	-----	Promueve la reticulofagia.
-----	Atg43	-----	Promueve la mitofagia.

2.2.1.2 Etapas del ensamblado del autofagosoma en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae*, la autofagia comienza con la formación de un compartimento vesicular conocido como fagóforo, que se ensambla en una región denominada estructura preautofagosomal (PAS, «*Phagophore Assembly Site*»). El PAS es una estructura transitoria regulada por la disponibilidad de nutrientes que se forma en la región perivacuolar en levaduras (Graef et al., 2013; D. J. Klionsky, 2007; Suzuki et al., 2013). La naturaleza de condensado líquido del PAS da como resultado la activación de la quinasa Atg1 como paso inicial de la inducción de la autofagia (Fujioka et al., 2020; Noda, 2023). Esta liquidez del PAS se va manteniendo gracias a la acción combinada de quinasas (TORC1 y Atg1) y fosfatasas (Ptc2); y se va perdiendo conforme madura el autofagosoma (Licheva et al., 2022). La incorporación de vesículas de Atg9, fuente inicial de las membranas autofagosomales, contribuye a la expansión del fagóforo (Yamamoto et al., 2012). Esta expansión culmina con la formación de una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma. Finalmente, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la vacuola, donde las enzimas hidrolíticas degradan el contenido. Las macromoléculas resultantes son devueltas al citosol por permeasas vacuolares. Es reseñable que la autofagia es capaz de proveer de todos los precursores nutricionales necesarios para mantener la viabilidad celular en condiciones de inanición, siendo la única excepción el oxígeno (Lin et al., 2021; Rabinowitz & White, 2010).

De acuerdo con esto, el proceso de autofagia (**Figura 9**) se puede dividir en las siguientes etapas: (I) inducción y nucleación del fagóforo; (II) expansión del fagóforo; (III) maduración del autofagosoma; (IV) acoplamiento/fusión con la vacuola; y los pasos finales (v) de degradación y reciclaje de los productos de degradación.

2.2.1.2.1 Inducción y nucleación del fagóforo en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae*, la inducción de la autofagia requiere que se produzca la activación de la quinasa Atg1 (Gross & Graef, 2020; Nanji et al., 2017). Esta activación depende de la autofosforilación de los residuos de Thr226 y Ser230 (Kijanska et al., 2010; Yeh et al., 2010). Recientemente, se ha demostrado que, en el PAS temprano, el complejo multiproteico Atg1 se comporta como un condensado líquido en el que se produce una separación de fases para formar una «gota líquida» (Fujioka et al., 2020). Con ello, se facilita la autoactivación en *trans* de la quinasa Atg1 al aumentar la frecuencia de las colisiones entre distintas moléculas de Atg1 individuales (Fujioka et al., 2020; Yeh, Shah, & Herman, 2011; Yeh et al., 2010). Además, la activación de Atg1 también puede ocurrir en *cis*, mediante autofosforilación en su bucle de activación, aunque la arquitectura del dominio quinasa sugiere que este tipo de reacción es menos probable (Yeh, Shah, Chou, et al., 2011).

El complejo Atg1 activo se ancla a la membrana vacuolar mediante la interacción específica de Atg13 con una proteína de la superficie de la vacuola denominada Vac8 (Fujioka et al., 2020). Por su parte, cada uno de los componentes del complejo de iniciación tiene unas características funcionales y estructurales particulares que contribuyen a la adecuada inducción y progresión de la autofagia (**Figura 10**). Entre ellas destacan:

- **Proteína quinasa Atg1.** Atg1 es la única proteína quinasa conocida entre las distintas proteínas Atg, y su actividad es necesaria para una correcta inducción de la autofagia (Hu & Reggiori, 2022). En *S. cerevisiae*, la actividad quinasa de Atg1 depende de su unión a Atg13 y Atg17 (Alers et al., 2012; Yeh et al., 2010), y regula la expansión de la membrana de aislamiento, cuyo tamaño es directamente proporcional a su actividad quinasa (Suzuki et al., 2013). Respecto a su estructura, Atg1 consta de un dominio quinasa N-terminal, una región bisagra y la región conservada C-terminal que es responsable de la interacción con Atg13. Esta región C-terminal de Atg1 comprende seis hélices α ($\alpha 1$ – $\alpha 3$ y $\alpha 1'$ – $\alpha 3'$), que se pliegan en dos haces antiparalelos de tres hélices semejantes entre sí. Dada la gran similitud estructural de esta región con los dominios de interacción y transporte de microtúbulos (MIT, Atg1^{MIT}), se denominó al primer conjunto de tres hélices (hélices $\alpha 1$ – $\alpha 3$) MIT1 y al segundo conjunto de tres hélices (hélices $\alpha 1'$ – $\alpha 3'$) MIT2 (**Figura 10**) (Fujioka et al., 2014; Stjepanovic et al., 2014).
- **Atg13.** Atg13 es una proteína esencial para el funcionamiento del complejo de iniciación de la autofagia en *S. cerevisiae*. Atg1 y Atg13 forman un complejo proteico de forma constitutiva cuya estabilidad varía en respuestas a las fluctuaciones ambientales (Kraft et al., 2012; Stjepanovic et al., 2014). La unión de Atg1 y Atg13 depende de los dominios MIT, los cuales están implicados en las interacciones con otras proteínas a través de los motivos de interacción MIT (MIM). Concretamente, Atg13 interactúa con Atg1 a través de los dominios MIM(N) y MIM(C). MIM (N) es una α -hélice corta que interacciona fuertemente con un surco hidrofóbico entre la primera y la tercera α -hélice posicionada en el MIT2 de Atg1; además no posee residuos Ser/Thr fosforilables (**Figura 10**). Por su parte, MIM(C) es una α -hélice más larga que interacciona más débilmente con un surco hidrofóbico formado entre la segunda y la tercera α -hélice del MIT1 de Atg1; y además presenta varios residuos de Ser que se fosforilan en condiciones ricas en nutrientes (**Figura 10**) (Fujioka et al., 2014; Noda & Fujioka, 2015). Esta interacción entre Atg1 y Atg13 es inhibida en presencia de nutrientes por la fosforilación de los residuos Ser428 y Ser429 de Atg13 mediada por TORC1. En respuesta a la escasez de nutrientes, se produce la inactivación de TORC1, y estos residuos Ser428/429 de Atg13 son desfosforilados por acción de la fosfatasa Ptc2, promoviéndose el ensamblaje del PAS (Fujioka et al., 2020). Este equilibrio de las reacciones de fosforilación/desfosforilación de

Atg13 en Ser428/429 es clave para mantener la separación de fases del PAS. Por otro lado, Atg13 es responsable de la interacción dinámica entre Atg1 y Atg17, al conectar al subcomplejo Atg1-Atg13 con Atg17-Atg29-Atg31 a través de la región 17BR («*Atg17 Binding Region*») (**Figura 10**) (Alers et al., 2012; Fujioka et al., 2014; Noda & Fujioka, 2015). Adicionalmente, Atg13 está implicado en el reclutamiento de vesículas de Atg9 al PAS mediante interacción directa a través de un dominio globular HORMA (llamado así por Hop1p, Rev7p y Mad2) localizado en su extremo N-terminal (**Figura 10**) (Sekito et al., 2009).

- **Atg17.** Atg17 forma homodímeros estables que tienen una arquitectura característica en forma de S. Esto es debido a que los monómeros de Atg17 están formados por cuatro hélices α que se pliegan en una estructura en forma de medialuna (Noda & Fujioka, 2015; Ragusa et al., 2012). Se ha propuesto que esta superficie cóncava es necesaria para el reconocimiento de las vesículas de Atg9 (Ragusa et al., 2012; Rao et al., 2016; Sekito et al., 2009).
- **Atg11.** En *S. cerevisiae*, Atg11 actúa como proteína de andamiaje implicada en el reclutamiento de proteínas Atg en la ruta Cvt de transporte vacuolar (Suzuki et al., 2013). Además, se ha observado que Atg11 participa en el andamiaje del autofagosoma en la macroautofagia no selectiva durante el crecimiento respiratorio (déficit de glucosa) (Adachi et al., 2017; Yao et al., 2020) o ante un déficit de fosfato (Yokota et al., 2017).
- **Atg29 y Atg31:** Ambas proteínas son específicas de *S. cerevisiae*. Por un lado, la función de Atg29 está regulada por un péptido inhibitorio ubicado en su extremo C-terminal. Tras la inducción de la autofagia, el extremo C-terminal se fosforila en los residuos Ser197, Ser199 y Ser201; lo que induce un cambio conformacional que libera la inhibición de este péptido y, por lo tanto, permite que progrese la autofagia. De estos residuos, únicamente se ha confirmado que la fosforilación de Ser201 es dependiente de Atg1 (Mao et al., 2013). Adicionalmente, los residuos Ser106 y Ser129 de Atg29 son fosforilados por Atg1 (Hu et al., 2019). Atg29 está involucrada en la correcta orientación del subcomplejo Atg17-Atg29-Atg31 en la vacuola. Además, Atg29 fosforilado es capaz de interactuar con Atg11, lo que sugiere un papel más activo de este último en la macroautofagia al descrito inicialmente (Licheva et al., 2022; Mao et al., 2013). Por su parte, Atg31 fosforilado en la Ser174 promueve el flujo autofágico al facilitar el tráfico de Atg9. No obstante, tanto la quinasa responsable de esta modificación, como los detalles del mecanismo molecular, siguen siendo desconocidos (Feng et al., 2015).

Tras el reclutamiento y la activación del complejo de iniciación, comienza la nucleación, que en autofagia se refiere al proceso de movilización de las proteínas necesarias al PAS para la expansión del fagóforo (Yin et al., 2016).

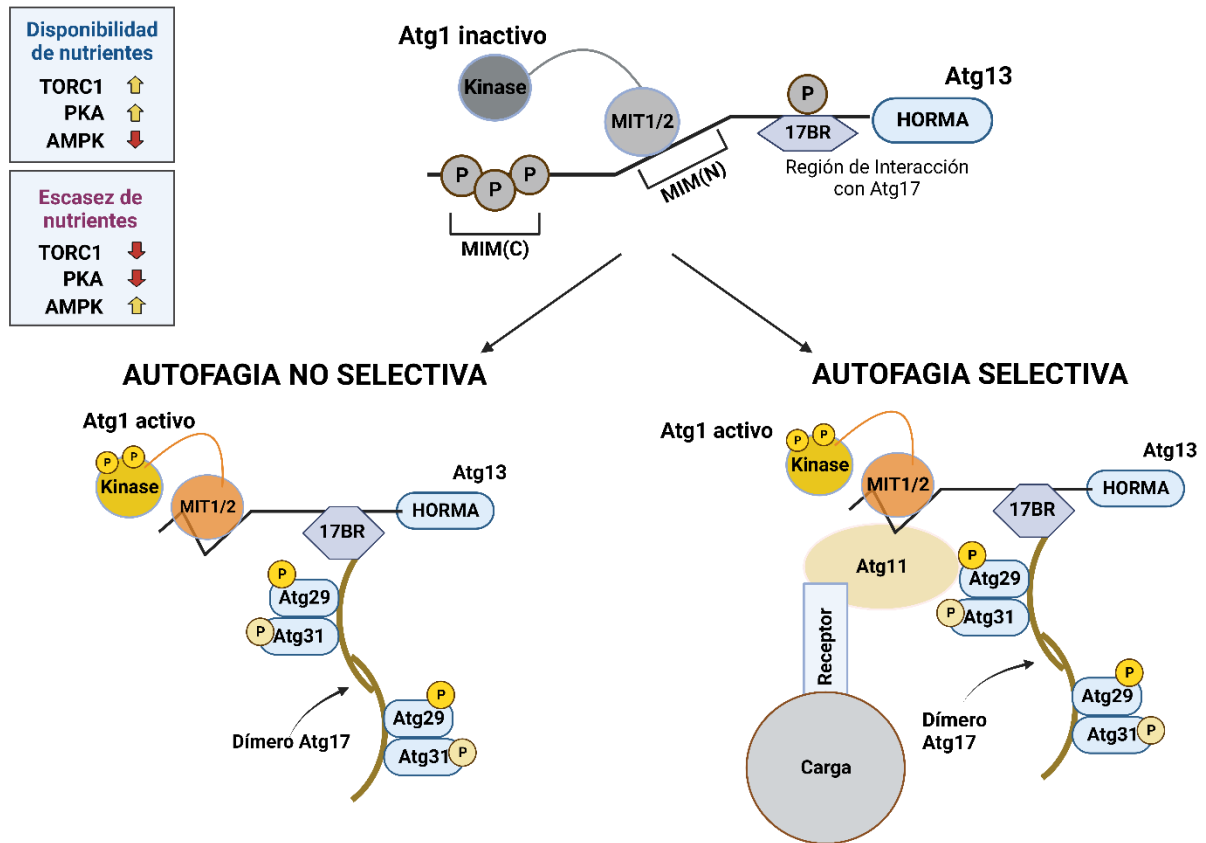


Figura 10. Complejo de iniciación de la maquinaria central de la autofagia. En esta figura encontramos representados los diferentes componentes del complejo de iniciación de la autofagia, así como su interacción para promover la activación de Atg1 y por ende la inducción de la autofagia. Las modificaciones postraduccionales en forma de fosforilación están representadas las inhibitorias en gris, y las activadoras en amarillo. Adaptada de Fujioka et al., 2014.

2.2.1.2.2 Expansión y cierre del fagóforo.

Durante la etapa de expansión, el fagóforo se alarga rápidamente en forma de copa encapsulando el citoplasma circundante como carga. La principal característica del fagóforo es que tiene un pequeño volumen interno y un contenido bajo de proteínas de membrana (Gross & Graef, 2020). En el proceso de expansión participan la proteína Atg9, el sistema de la PI3KC3, el complejo Atg2-Atg18 y los sistemas de conjugación similares a ubiquitina.

2.2.1.2.2.1 **La proteína Atg9: modulación del transporte de membranas al PAS y su actividad como escramblasa de lípidos.**

Entre las proteínas Atg de la maquinaria central de la autofagia, Atg9 es la única proteína transmembrana. Atg9 se encuentra formando parte de una vesícula móvil citoplasmática generada a partir del aparato de Golgi, denominada vesícula Atg9; o en una estructura tubulovesicular próxima a las mitocondrias, denominada reservorio de Atg9 (Mari et al., 2010; Reggiori et al., 2004; Yamamoto et al., 2012). En condiciones ricas en nutrientes,

Atg9 se encuentra distribuida por múltiples estructuras periféricas en la célula, marcándolas como potenciales donadores de membrana (Gross & Graef, 2020; Hu & Reggiori, 2022; Wen & Klionsky, 2016). Sin embargo, cuando se induce la autofagia en respuesta a la escasez de nutrientes, unas pocas vesículas de gran movilidad se reclutan individualmente al PAS, contribuyendo de esta forma a la generación del fagóforo inicial (Reggiori et al., 2004; Yamamoto et al., 2012) (**Figura 11**). Esto ocurre tras la fosforilación de Atg9 por Atg1 en los residuos Ser802 y Ser969 (Hu et al., 2019; Papinski et al., 2014).

Atg9 es una proteína que puede circular entre el PAS y componentes no-PAS (estructuras periféricas), transportando o dirigiendo el suministro de membranas. Cada vesícula de Atg9 o vesícula donadora tiene un diámetro de 30-60 nm y alberga aproximadamente 27 moléculas de Atg9 (Yamamoto et al., 2012). En levaduras, estas vesículas de Atg9 se unen al complejo de iniciación mediante interacción con Atg17 (Chew et al., 2013; Ragusa et al., 2012; Sekito et al., 2009), Atg31 (Feng et al., 2015); el dominio HORMA localizado en la región N-terminal de Atg13 (Fujioka et al., 2014); o incluso Atg11 (Gross & Graef, 2020; Wen & Klionsky, 2016). Adicionalmente, en este transporte anterógrado de Atg9 participan Atg23, Atg27 y Atg41 (Backues et al., 2015; Yao et al., 2015; Yen et al., 2007). Una vez en el PAS, Atg9 se incorpora al fagóforo y se localiza en el borde de expansión junto con el complejo Atg2-Atg18 (Chumpen Ramirez et al., 2023; Gómez-Sánchez et al., 2018; Suzuki et al., 2013).

Estas vesículas de Atg9 que contribuyen a la nucleación y/o expansión del fagóforo en la levadura no son capaces de aportar la suficiente cantidad de fosfolípidos necesarios para generar un autofagosoma (Noda, 2021). Es por ello por lo que se ha propuesto que la mayor parte de estos fosfolípidos se obtienen de fuentes de membrana distintas, incluyendo el RE, las vesículas COPII y las mitocondrias. De todas ellas, el RE se considera como el principal suministrador (**Figura 11**) (Noda, 2021).

Recientemente, se ha demostrado que Atg9 tiene una arquitectura homotrimérica que contiene dos canales con el potencial de transportar y repartir los lípidos entre la cara citosólica y la luminal del fagóforo, actividad conocida como escramblasa de lípidos (Maeda et al., 2020; Mari et al., 2010; Matoba et al., 2020; Matoba & Noda, 2020). De esta manera, y actuando de forma conjunta con Atg2, es como Atg9 impulsa la expansión del fagóforo (Chumpen Ramirez et al., 2023; Noda, 2021)

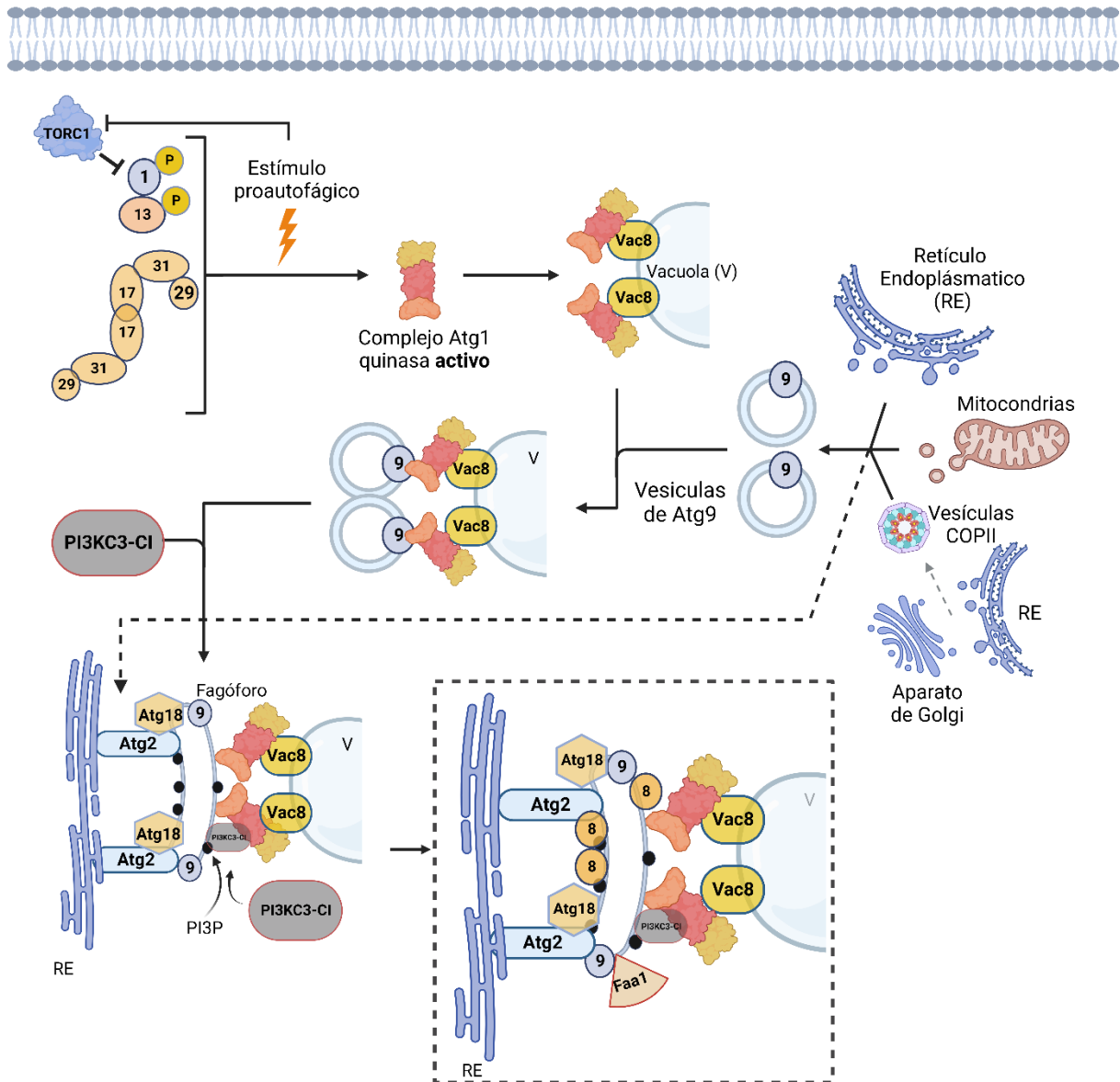


Figura 11. Mecanismo molecular que regula las primeras etapas del ensamblaje del autofagosoma en *S. cerevisiae*. Esquema ilustrativo de la etapa de nucleación y expansión del fagóforo en levaduras. Abreviaturas de la imagen: V (Vacuola); RE (Retículo Endoplásmico); 1 (Atg1); 13 (Atg13); 29 (Atg29); 31 (Atg31); 17 (Atg17); 8 (Atg8); 9 (Atg9). Adaptada de Hu & Reggiori, 2022.

2.2.1.2.2.2 Sistema de la fosfatidilinositol 3 – quinasa de clase III (PI3KC3).

Hasta la fecha, se han descrito tres clases de fosfatidilinositol-3-quinazas (PI3K), denominadas PI3K de clase I, II y III; caracterizadas por su capacidad de fosforilar el grupo 3-hidroxilo del anillo de inositol, pero que difieren en su especificidad de sustrato (O' Farrell et al., 2013; Vanhaesebroeck et al., 2010). Entre ellas, la más conservada evolutivamente es la PI3K-CIII (o PI3KC3) (Backer, 2016), cuya subunidad catalítica es la quinasa de lípidos Vps34, que utiliza exclusivamente el fosfatidilinositol como sustrato para generar fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) (Backer, 2008). Por su parte, el PI3P es un fosfolípido implicado en diferentes cascadas de señalización (Marat & Haucke, 2016; Reidick et al., 2014), cuya función consiste en promover el reclutamiento selectivo de proteínas citosólicas que albergan el motivo de unión a PI3P PX o dominio FYVE (Lemmon, 2008; Schink et al., 2016).

PI3KC3 forma parte de diferentes complejos compuestos por distintas proteínas reguladoras (Reidick et al., 2017), siendo las comunes Vps34 y la subunidad reguladora Vps15 (Schu et al., 1993; Stack et al., 1995; Stack & Emr, 1994; Stack et al., 1993). Estructuralmente, Vps15 contiene un dominio de proteína quinasa putativo y múltiples repeticiones HEAT, que son necesarios para su interacción con la región C-terminal de Vps34 (Budovskaya et al., 2002; Stack et al., 1995). Aunque Vps34 está fosforilada en levaduras, hasta el momento no existen evidencias de que Vps15 sea la proteína quinasa responsable (**Figura 12**) (Reidick et al., 2017). No obstante, Vps15 es necesaria para lograr la asociación de Vps34 de forma estable a la membrana (Stack et al., 1993).

En *S. cerevisiae*, dos complejos diferentes de la PI3KC3 regulan la autofagia y la clasificación de proteínas vacuolares («*Vacuolar Protein Sorting*»). Por un lado, el complejo I de la PI3KC3 (PI3KC3-CI) está implicado en el ensamblaje del autofagosoma en levaduras. Este complejo está constituido por Vps34 y Vps15, que a través de Atg14, se asocian con Atg6 (también conocido como Vps30) (**Figura 12**) (Kihara et al., 2001). En este complejo el papel de Atg14 es fundamental durante el ensamblaje del autofagosoma, debido a que promueve el reclutamiento de Atg5 y Atg8 al PAS (Suzuki et al., 2001). Por su parte, Atg38 interactúa físicamente con Vps34 y Atg14 a través de su región N-terminal. Esta interacción mediada por Atg38 permite estabilizar la unión entre los subcomplejos Atg14-Atg6 y Vps34-Vps15 (**Figura 12**) (Araki et al., 2013; Ohashi et al., 2016). Además, el complejo I de la PI3KC3 es capaz de establecer una serie de interacciones: Atg14-Vac8, Atg38-Atg1 y Vps30-Atg9; que favorecen su reclutamiento a PAS (Hitomi et al., 2023). Es más, recientemente se ha descrito que Atg1 fosforila directamente Vps34, siendo esta fosforilación necesaria para la dinámica de Atg18 y Atg8 en el PAS (Lee et al., 2023).

Por otro lado, en la clasificación de proteínas vacuolares está implicado el complejo II de la PI3KC3 (PI3KC3-CII), el cual está localizado principalmente en las membranas endosómicas. Este complejo está constituido por Vps34, Vps15, Atg6, y Vps38 como mediador de la interacción entre Vps34 y Atg6 (**Figura 12**) (Kihara et al., 2001).

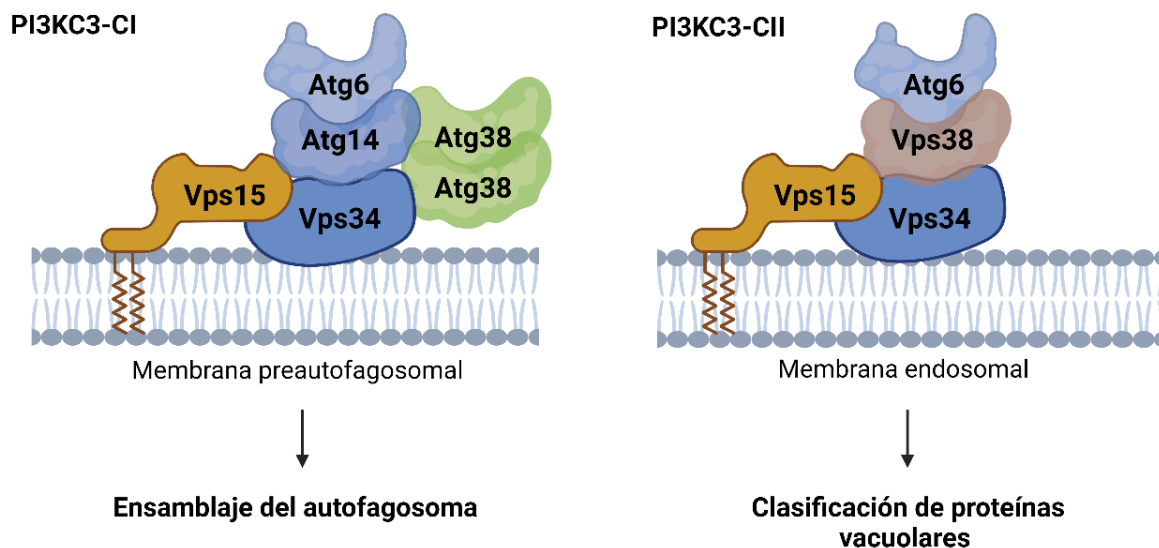


Figura 12. El complejo I de fosfatidilinositol 3-quinasa clase III (PI3KC3) en *S. cerevisiae*. El complejo está compuesto por los componentes centrales Vps34, Vps15, Atg6; y por componentes adicionales, dando lugar a complejos en diferentes. Por un lado, el complejo I (PI3KC3-CI) se forma en la membrana del fagóforo y consta del complejo central junto con la proteína Atg14, que además interactúa con Atg38. Por otro lado, el Complejo II (PI3KC3-CII) comprende, además del complejo central, la proteína Vps38. Este complejo está localizado en la membrana de los endosomas participando en la clasificación de proteínas vacuolares. Adaptada de Reidick et al., 2017.

2.2.1.2.2.3 Complejo Atg2–Atg18: un complejo regulador del transporte de lípidos y la formación del autofosoma.

Después de la generación de PI3P por el PI3KC3-CI en el PAS, las proteínas de la familia Atg18 son reclutadas al PAS mediante su unión al PI3P. En *S. cerevisiae*, hay tres proteínas de la familia Atg18: Atg18, Atg21 y Hsv2 (Krick et al., 2008). No obstante, solo Atg18 es esencial para la correcta inducción de la autofagia (Barth et al., 2001; Guan et al., 2001), ya que Atg21 funciona principalmente en la vía Cvt (Krick et al., 2008). Además, mientras Atg18 interactúa con Atg2 para promover la expansión del fagóforo (Obara et al., 2008), Atg21 interactúa con Atg16 y Atg8 para promover la lipidación de Atg8 (Juris et al., 2015).

El complejo Atg2-Atg18 se localiza en el borde del fagóforo en expansión conjuntamente con el RE (**Figura 13**) (Gómez-Sánchez et al., 2018; Kotani et al., 2018; Suzuki et al., 2013). Estudios estructurales y bioquímicos recientes han demostrado que Atg2 tiene la capacidad de unirse a la membrana mediante el uso de dos regiones de unión independientes en ambos extremos de su estructura en forma de barra (Kotani et al., 2018; Tamura et al., 2017). Su localización en el RE depende de su región N-terminal; mientras que una hélice anfipática C-terminal determina su localización en el fagóforo (**Figura 13**) (Kotani et al., 2018). Una vez en el PAS, ambos miembros del complejo Atg2-Atg18 son fosforilados por la quinasa Atg1, lo que favorece el reconocimiento de Atg9 (Hu et al., 2019; Licheva et al., 2022; Obara et al., 2008), optimizándose el transporte de lípidos durante la construcción de la membrana autofagosómica (Noda, 2021).

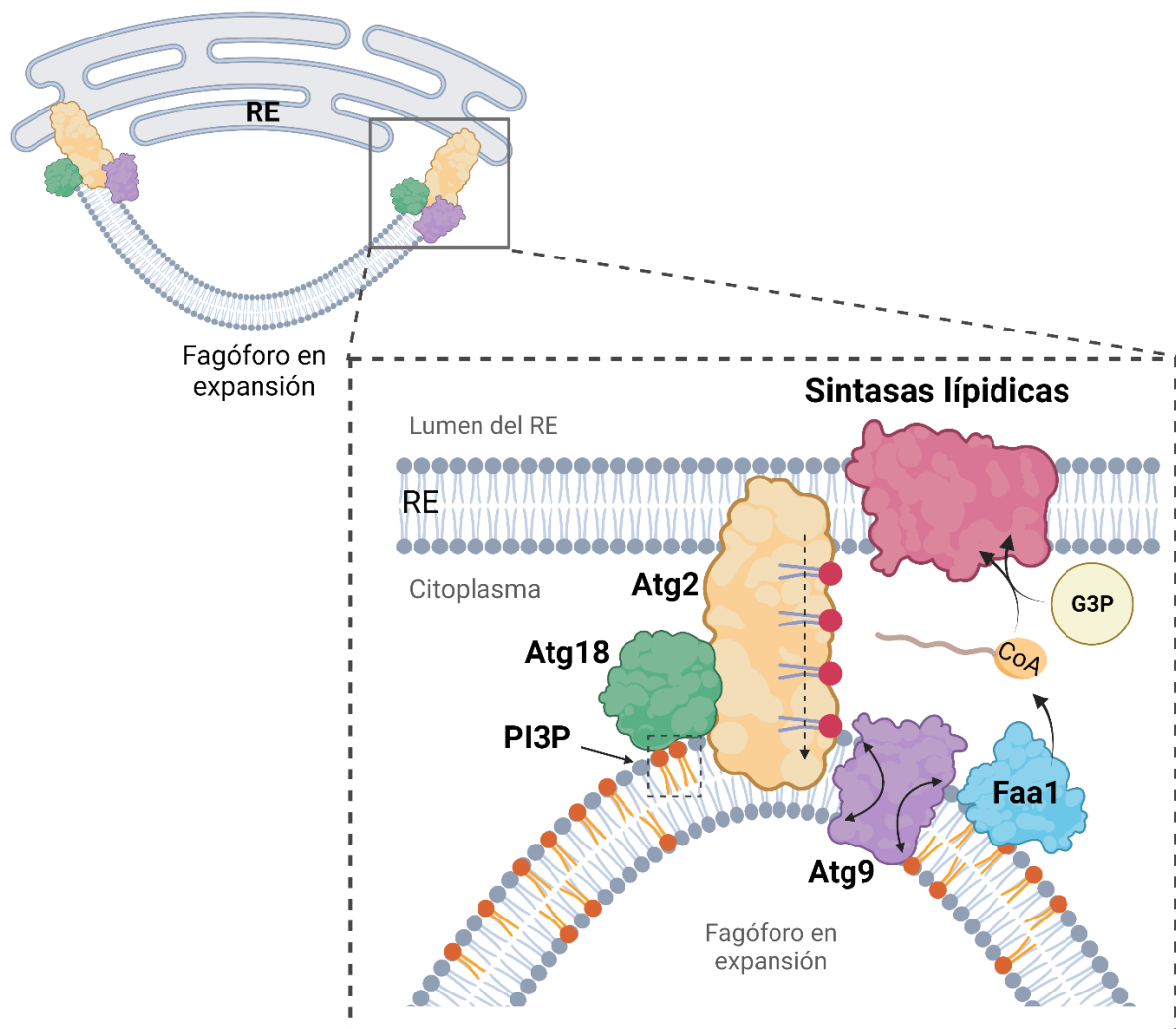


Figura 13. Modelo propuesto de expansión de membrana autofagosomal impulsada por Atg2 atg9. Adaptada de Noda, 2021.

Atg2 es una proteína capaz de transferir fosfolípidos entre membranas vecinas, de ahí que el ensamblaje del autofagosoma se induzca próximo al RE (Kotani et al., 2018; Osawa et al., 2019) (**Figura 13**). Se han descrito dos mecanismos diferentes mediante los cuales Atg2 es capaz de efectuar el transporte de lípidos: el modelo transbordador y el modelo puente. En el modelo transbordador, Atg2 carga lípidos de una membrana y los transporta a otra membrana donde los descarga. Por otro lado, en el modelo de puente, Atg2 se une a dos membranas y transporta los lípidos entre ellas sin esto implicar un desplazamiento de Atg2 (Noda, 2021).

Por otra parte, se ha hipotetizado que los fosfolípidos recién sintetizados en dominios ricos en sintetasas lipídicas, junto con los fosfolípidos que los rodean, generan un potencial químico que constituye una fuerza impulsora para promover el transporte unidireccional de los fosfolípidos al fagóforo a través de Atg2 (**Figura 13**) (Noda, 2021; Orii et al., 2021; Schütter et al., 2020). En comparación con las membranas de orgánulos canónicos, las membranas autofagosomales son únicas porque contienen pocas proteínas de membrana (Baba et al., 1995; Fengsrud et al., 2000). Es por esto, por lo que se ha propuesto que el transporte de lípidos mediado por Atg2 y Atg9 es un mecanismo idóneo para proporcionar lípidos y prevenir la entrada de proteínas de membrana (**Figura 13**) (Noda, 2021).

2.2.1.2.2.4 Los sistemas de conjugación similares a ubiquitina Atg12 y Atg8.

Por otra parte, la expansión de las membranas del autofagosoma involucra a dos proteínas similares a la ubiquitina, Atg12 y Atg8, y dos sistemas de conjugación asociados (**Figura 14**):

- **Sistema de conjugación similar a ubiquitina de Atg12.** En este sistema, una enzima similar a E1 (Atg7) promueve la activación de Atg12. Seguidamente, una enzima similar a E2 (Atg10) genera la conjugación del extremo C-terminal de Atg12 con una Lys interna de Atg5 generando el complejo Atg12-Atg5 (**Figura 14**) (Esclatine et al., 2009; Yamaguchi et al., 2012). Una vez formado este complejo, una proteína en espiral, Atg16, se une a Atg5 de forma no covalente, generando el complejo Atg12-Atg5/Atg16. Finalmente, dos complejos Atg12-Atg5/Atg16 interaccionan a través de Atg16 formando un dímero (**Figura 14**) (Kuma et al., 2002). La asociación de este complejo al fagóforo en expansión promueve el reclutamiento al PAS de Atg3 y Atg7. Además, este complejo está implicado en la determinación del sitio de lipidación de Atg8 al actuar como posible enzima E3 del sistema de conjugación similar a ubiquitina de Atg8 (**Figura 14**) (Romanov et al., 2012).

- Sistema de conjugación similar a ubiquitina de Atg8.** Inicialmente, Atg8 es sintetizada con una arginina en su extremo C-terminal que es eliminada por acción de la cisteína proteasa Atg4, dejando expuesto un residuo de Gly (Klionsky & Schulman, 2014). A continuación, Atg7 media la activación de Atg8-Gly. Posteriormente, Atg8 es transferida a otra enzima similar a E2 (Atg3) que une la Gly C-terminal expuesta a un residuo de fosfatidiletanolamina (PE). Esta última etapa de la conjugación es facilitada por el complejo Atg12-Atg5/Atg16 (**Figura 14**) (Romanov et al., 2012). De acuerdo con este mecanismo, y con el fin de evitar la retirada de Atg8 del fagóforo en expansión (reciclaje) (**Figura 14**), la lipidación de Atg8 requiere de la inhibición local (en PAS) de la actividad proteolítica de Atg4. Esta actividad es inhibida gracias a Atg1 que fosforila a Atg4 en Ser307 (Sanchez-Wandelmer et al., 2017).

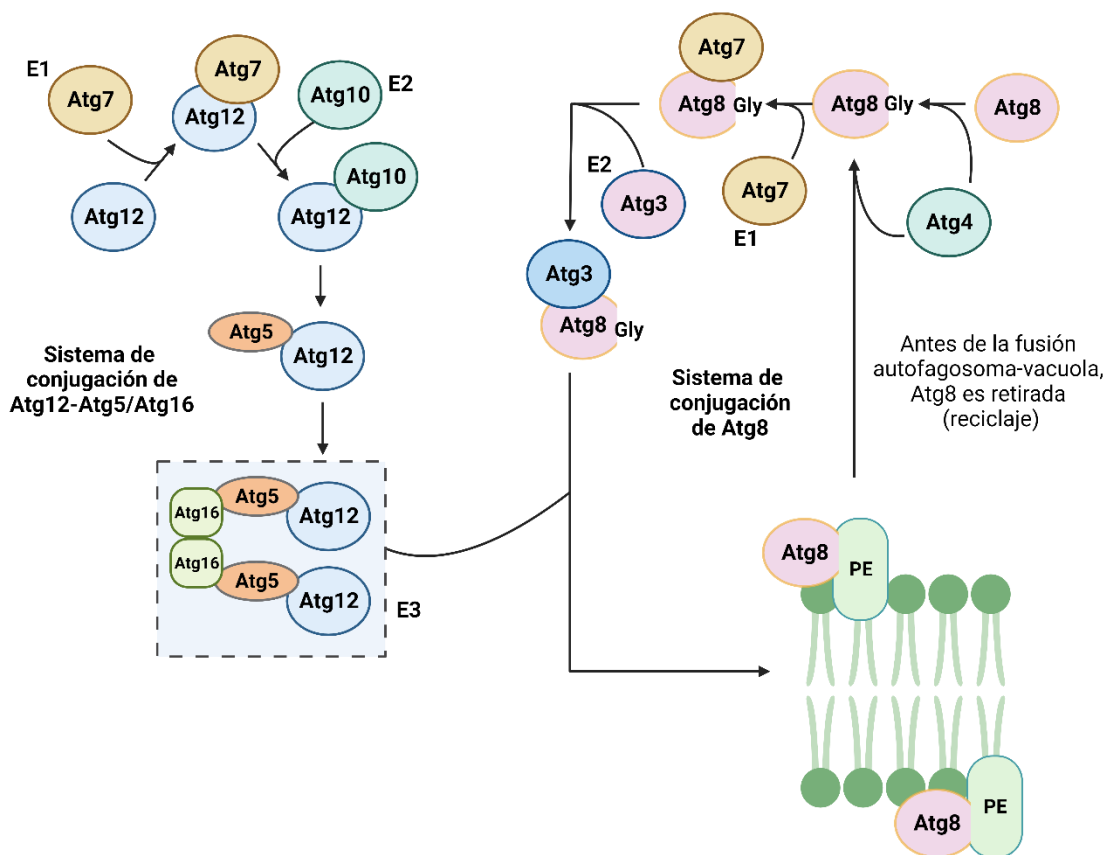


Figura 14. Interacción de los dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina en la lipidación de Atg8. Véase el texto principal para más detalles. Adaptada de Wen & Klionsky, 2016.

La acción conjunta de ambos sistemas de conjugación permite que Atg8-PE se encuentre recubriendo ambos lados del fagóforo. En la cara luminal del fagóforo, Atg8 está implicada en el reconocimiento selectivo de la carga que va a ser degradada. En este sentido, el reconocimiento selectivo es debido a que las proteínas de la familia Atg8 contienen un sitio de unión altamente conservado (LDS, «*LIR docking site*») que permite la unión con proteínas que albergan motivos de interacción con proteína de la familia Atg8/LC3 (en levaduras AIM, «*Atg8-interacting motifs*»; en mamíferos LIR «*LC3-interacting region*») (Fracchiolla et al., 2017; Rogov et al., 2023). Por su parte, la función de Atg8 en la cara citoplasmática del fagóforo sigue siendo una incógnita, aunque se ha hipotetizado que puede estar implicada en la determinación de la curvatura de la membrana (Kaufmann et al., 2014; Liu et al., 2023; Maruyama et al., 2021; Maruyama & Noda, 2021).

2.2.1.2.3 Maduración del autofagosoma en *S. cerevisiae*.

El fagóforo no rodea completamente su carga hasta el paso final cuando se produce cierre de la membrana mediante escisión (Knorr et al., 2015). Esta escisión da lugar al autofagosoma, una vesícula de doble membrana, cuya membrana exterior rodea a una membrana interior que contiene la carga a degradar. El tamaño promedio del autofagosoma resultante oscila entre 0.3-0.9 μm en levaduras (Wen & Klionsky, 2016).

Durante la maduración de los autofagosomas se retiran las proteínas Atg de la superficie del fagóforo para reutilizarlas en ciclos posteriores; y el autofagosoma se prepara para su fusión con la vacuola (Cebollero & Reggiori, 2009; Yin et al., 2016). En *S. cerevisiae*, una vez se ha completado el autofagosoma, se desensambla el complejo Atg1 quinasa, lo que permite la activación de Atg4, y por ende la liberación de la proteína Atg8 anclada a PE que está presente en la cara citosólica del autofagosoma (Kirisako et al., 1999; Sanchez-Wandelmer et al., 2017). Para el desensamblaje de proteínas Atg es necesaria la desfosforilación del PI3P mediada por la fosfatasa Ymr1 (Cebollero et al., 2012). En cuanto al reciclaje de Atg9 unido a la membrana externa del autofagosoma (Reggiori et al., 2004; Yamamoto et al., 2012; Yen et al., 2007) todavía no se conoce en detalle el mecanismo involucrado (Noda, 2021). No obstante, sí parece que están implicados los complejos Atg1–Atg13, Atg2–Atg18 y Atg14 (PI3KC3) (Lang et al., 2000; Noda et al., 2000; Reggiori et al., 2004).

Algunas de las proteínas implicadas en la maquinaria central de la autofagia como Atg1, Atg13 y Atg17; presentan el motivo AIM, promoviéndose su degradación final en la vacuola (Noda & Fujioka, 2015). Esta degradación de los componentes de la maquinaria central de la autofagia constituye un bucle de retroalimentación negativo que permite reducir el flujo autofágico tras la fusión del autofagosoma con la vacuola (Kijanska & Peter, 2013)

2.2.1.2.4 Fusión y degradación del autofagosoma en la vacuola.

Una vez completada la maduración del autofagosoma en levaduras, este se dirige a las vacuolas para su fusión y degradación. La fusión con la vacuola requiere de la participación de ciertas proteínas SNARE («*Soluble NSF Attachment protein REceptor*») como Vam3 (Darsow et al., 1997), la v-SNARE Ykt6 (Bas et al., 2018); la proteína de unión a GTP Ypt7 (Balderhaar et al., 2010), el ortólogo de la proteína NSF («*N-ethylmaleimide-Sensitive Factor*») Sec18 (Mayer & Wickner, 1997) y el homólogo de SNAP25 («*Soluble NSF Attachment Protein*») Vam7 (Sato et al., 1998). Estas proteínas son capaces de interactuar con determinados componentes de la maquinaria central de la autofagia. Por un lado, Vam7 es capaz de interactuar con Atg17, siendo esta unión clave en el proceso de fusión (Liu et al., 2016). En el caso de la v-SNARE («*vesicle-SNARE*») Ykt6, se ha descrito que Atg1 regula negativamente su interacción con la v-SNARE vacuolar Vti1 mediante la fosforilación de los residuos Ser182, Ser183 y Thr158; previniendo la fusión del autofagosoma con la vacuola. Tras la maduración del autofagosoma, y el apagado de Atg1, Ykt6 es desfosforilada produciéndose el proceso de fusión (Barz et al., 2020; Bas et al., 2018; Gao et al., 2020).

Posteriormente, se produce la liberación de los cuerpos autofágicos (vesícula interna del autofagosoma) en el interior de la vacuola, donde se produce la ruptura de la membrana lipídica gracias a la acción de la lipasa Atg15, permitiendo la hidrólisis de la carga por acción de enzimas vacuolares (proteasas, lipasas, nucleasas y glucosidasas) (Epple et al., 2001). El proceso culmina con la liberación en el citoplasma de los productos de degradación: aminoácidos, lípidos, nucleósidos y carbohidratos. En esta etapa están implicadas determinadas permeasas vacuolares, como Atg22 (Yang et al., 2006). En el citoplasma, el aumento de la concentración de aminoácidos provenientes de la degradación autofágica induce una reactivación de TORC1, y por tanto, la inhibición de la autofagia. Este mecanismo constituye otro bucle de retroalimentación negativa que regula del proceso de autofagia (Liu & Levine, 2015).

2.2.2 Mecanismos de ensamblaje del autofagosoma en *S. pombe*: similitudes y diferencias con *S. cerevisiae* y eucariotas superiores

2.2.2.1 Análisis comparativo de los componentes centrales de la autofagia en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y eucariotas superiores.

La autofagia es un proceso conservado evolutivamente desde eucariotas inferiores a superiores, no obstante, existen notables diferencias entre especies (King, 2012; Daniel J. Klionsky, 2007). En lo que respecta a *S. pombe*, los genes implicados en la autofagia se identificaron inicialmente por su homología a los genes Atg previamente conocidos de *S. cerevisiae* (Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009), y más tarde mediante análisis

genéticos que revelaron reguladores adicionales (Sun et al., 2013; Yu et al., 2020). La identificación de estos factores y el análisis estructural de las proteínas Atg de *S. pombe* ha permitido dilucidar novedosos mecanismos regulatorios del proceso (Matoba et al., 2020; Osawa et al., 2019; Xu & Du, 2022).

En *S. pombe* diversos aspectos de la maquinaria de la autofagia y de los mecanismos que regulan su inducción son evolutivamente más similares a mamíferos que a los descritos en *S. cerevisiae*. Por ejemplo, en *S. pombe* hay un homólogo a Atg101 de mamíferos, que no está presente en *S. cerevisiae* (Nanji et al., 2017; Suzuki et al., 2015; Xu & Du, 2022). Las proteínas de la familia Atg11/FIP200 son esenciales para la macroautofagia en *S. pombe* y mamíferos, pero no en *S. cerevisiae* (Pan et al., 2020; Suzuki et al., 2015). Los receptores de autofagia selectivos que contienen el dominio ZZ existen en *S. pombe* y en mamíferos, pero no en *S. cerevisiae* (Kohda et al., 2007; X. M. Liu et al., 2015; Wang et al., 2021).

Por otro lado, existen genes *atg*⁺ en *S. cerevisiae* que no tienen un homólogo en *S. pombe* como *atg19*⁺, *atg23*⁺, *atg27*⁺, *atg29*⁺ y *atg31*⁺ (Mukaiyama et al., 2010; Xu & Du, 2022). Además, en *S. cerevisiae* existe un único gen de *atg18*⁺, mientras que en *S. pombe* encontramos tres *atg18a*⁺, *atg18b*⁺ y *atg18c*⁺ (Mukaiyama, et al., 2010). Adicionalmente, tampoco las proteínas Atg16L1/2 de *S. pombe* están conservadas en *S. cerevisiae* (Mukaiyama et al., 2010).

2.2.2.2 El ensamblaje del autofagosoma en *S. pombe*: una perspectiva evolutiva hacia eucariotas superiores.

En *S. pombe* las proteínas Atg responsables de la biogénesis del autofagosoma se puede clasificar en seis grupos funcionales: el complejo de iniciación de Atg1; dos proteínas integrales de membrana Atg9 y Ctl1; proteínas de la familia Atg18 y Atg2; el sistema de la PI3KC3-CI; y los sistemas de conjugación de Atg12 y Atg8 (**Figura 15**). En este apartado nos centraremos en desarrollar las divergencias funcionales en el ensamblaje del autofagosoma entre *S. pombe*, *S. cerevisiae* y células de mamíferos.

2.2.2.2.1 Características particulares del complejo de iniciación de la autofagia en *S. pombe*.

De forma similar al complejo de iniciación o complejo Atg1 de *S. cerevisiae*, el complejo Atg1 de *S. pombe* está compuesto por Atg1, Atg13, Atg17 y Atg11 (**Figura 15, Tabla 1**). Sin embargo, el complejo Atg1 de *S. pombe* carece de subunidades Atg29 y Atg31. En su lugar, *S. pombe* presenta un homólogo a Atg101 de mamíferos (Nanji et al., 2017; Pan et al., 2020; Suzuki et al., 2015), que carece de homología con Atg29 y Atg31 de *S. cerevisiae*, y no puede reemplazarlos funcionalmente (**Figura 15, Tabla 1**) (Nanji et al., 2017; Suzuki et al., 2015).

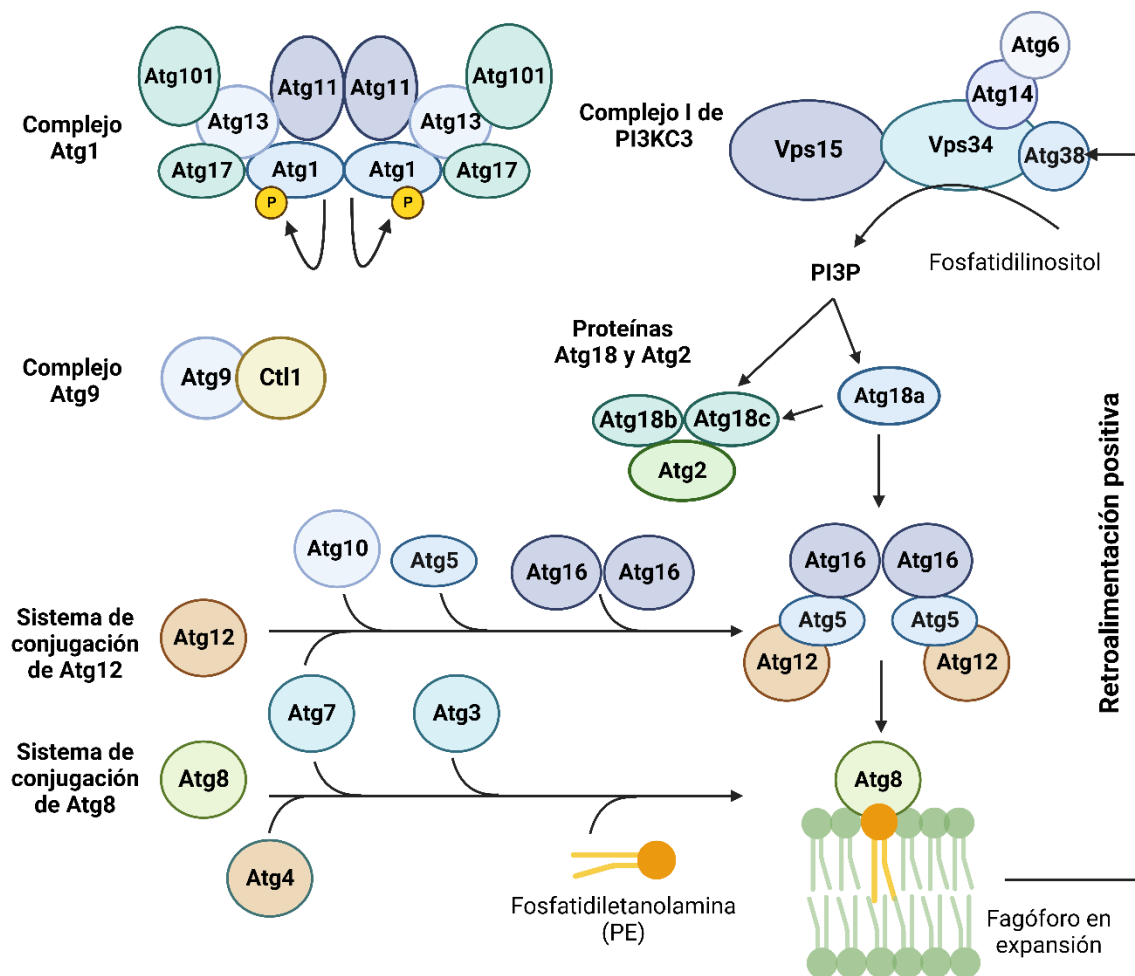


Figura 15. Complejos de la maquinaria central de la autofagia de *S. pombe*. Esquema ilustrativo de los seis grupos funcionales: el complejo Atg1, el sistema de transporte de vesículas formado por Atg9 y Ctl1; las proteínas de la familia Atg18 y Atg2; el sistema de la PI3KC3-C1; y los sistemas de conjugación similar a ubiquitina: Atg12 y Atg8. Para mayor detalle, véase el texto principal. Las modificaciones postraduccionales activadoras en forma de fosforilación están representadas en color amarillo. Adaptada de Xu & Du, 2022.

En *S. pombe* Atg13 interactúa directamente con Atg1 y Atg17 al igual ocurre en *S. cerevisiae* (Suzuki et al., 2015; Yu et al., 2021). Además, Atg1 y Atg17 de *S. pombe* también pueden interactuar directamente entre sí (**Figura 15**) (Yu et al., 2021). Respecto a Atg101, este interactúa única y exclusivamente con Atg13 estabilizándolo para evitar su degradación (Nanji et al., 2017; Suzuki et al., 2015; Yu et al., 2021). En *S. pombe*, Atg11, que es similar a FIP200 de mamíferos, es esencial para la correcta inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de nutrientes al regular la activación de Atg1, proceso independiente de Atg17 y Atg13 (Sun et al., 2013). Se ha demostrado que en *S. pombe* Atg11 puede formar homodímeros que favorecen el acoplamiento de Atg1, su autofosforilación y activación. Una vez activa, Atg1 fosforila a diversos sustratos implicados en la autofagia. No obstante, en *S. pombe* solo se ha descrito su propia autorregulación (Licheva et al., 2022; Xu & Du, 2022).

2.2.2.2.2 Características particulares de la expansión del fagóforo en *S. pombe*.

2.2.2.2.2.1 Proteína Atg9 en la autofagia: transporte de membranas y traslocación de lípidos en *S. pombe*.

En *S. pombe*, la identificación de Atg9 se consiguió en base a la homología de secuencia con Atg9 de *S. cerevisiae* (Mukaiyama et al., 2009), y presenta una localización similar a esta última estando presente en estructuras punteadas citoplasmáticas PAS y no-PAS (Sun et al., 2013). El análisis estructural mediante CryoEM (microscopía electrónica criogénica) de Atg9 en humanos y en levaduras de fisión permitió observar que Atg9 presenta unas características estructurales únicas, como una arquitectura de homotrímero que forma dos poros únicos constituidos por cuatro hélices transmembrana y dos hélices en la cara citoplásmica. Uno de los poros penetra en la membrana, mientras que el otro es lateral a la cara citoplásmica de la membrana. Esta estructura encaja con su actividad como escramblasa de lípidos, encargándose de transportar y distribuir los lípidos entre ambas caras del fagóforo en expansión (Maeda et al., 2020; Matoba et al., 2020; Noda, 2021).

En *S. pombe* no se han encontrado proteínas implicadas en el transporte anterógrado de Atg9 que sean ortólogas a Atg23 y Atg27 de *S. cerevisiae*, habiéndose identificado un nuevo factor similar funcionalmente, Ctl1 (Sun et al., 2013). Ctl1 es una proteína transmembrana que interactúa físicamente y colocaliza con Atg9 tanto en el PAS como en los compartimentos no-PAS (Sun et al., 2013). Curiosamente, en *S. pombe* se ha observado que la eliminación de *atg1⁺* o *atg2⁺* restringe la localización de Atg9 y Ctl1 a PAS, sugiriendo que el reciclaje de Atg9 del PAS a compartimentos no-PAS requiere de Atg1 y Atg2 (Sun et al., 2013; Xu & Du, 2022).

2.2.2.2.2.2 Complejo I de la fosfatidilinositol-3 quinasa de clase III en *S. pombe*

En *S. pombe*, el PI3KC3-CI está compuesto por Vps15, Vps34, Atg14, Atg6 y Atg38 (Xu & Du, 2022). Por un lado, en *S. pombe* Atg38 interactúa con Vps34, mientras que en *S. cerevisiae* Atg38 interactúa con Atg14, y en mamíferos NRBF2 (homólogo Atg38) interactúa con ATG14 y Beclin1 (homólogo de Atg6) (**Figura 12** y **Figura 15**) (Ohashi et al., 2016; Yu et al., 2020). Además, en *S. pombe* Atg38 posee un motivo AIM que le permite interactuar con Atg8, logrando así establecer un bucle de retroalimentación positivo que mejora la acumulación en PAS del PI3KC3-CI, y de los demás factores implicados en la autofagia que actúan aguas abajo de este complejo (**Figura 15**) (Yu et al., 2020). Del mismo modo, en mamíferos el dominio LIR de ATG14L interactúa con las proteínas de la familia Atg8/GABARAP/GABARAPL1 (Birgisdottir et al., 2019). Por lo tanto, este mecanismo de interacción entre Atg8 y PI3KC3-CI parece estar conservado evolutivamente (Xu & Du, 2022).

Tal y cómo vimos anteriormente, el PI3KC3-CI está implicado en la formación de PI3P que es esencial para reclutar a la maquinaria de la autofagia a la región de ensamblaje del ensamblaje del autofagosoma. En *S. pombe* es necesario para el reclutamiento de los complejos en los que están implicados Atg18a, Atg18b y Atg18c a PAS (Xu & Du, 2022).

2.2.2.2.3 El complejo Atg18-Atg2: transporte de lípidos y la formación del autofagosoma en *S. pombe*.

S. pombe codifica tres proteínas de la familia Atg18 que son esenciales para la expansión del fagóforo: Atg18a, Atg18b y Atg18c (Mukaiyama et al., 2009; Sun et al., 2013). Atg18b y Atg18c colocalizan con Atg2 en los extremos de los fagóforos en expansión participando activamente en la incorporación y transporte de lípidos (**Figura 13**). Sin embargo, Atg18a actúa como plataforma de unión para el reclutamiento del complejo Atg12-Atg5/Atg16 al PAS, por lo tanto, su delección (*atg18aΔ*) impide el reclutamiento de Atg8 a PAS (Sun et al., 2013)

Por otra parte, al igual que en *S. cerevisiae*, Atg2 se localiza en el sitio de contacto entre el borde del fagóforo y en los sitios de salida del RE (ERES, «*Endoplasmic Reticulum Exit Site*»), contribuyendo a su expansión al facilitar la transferencia de lípidos desde el RE al fagóforo (**Figura 13**) (Gómez-Sánchez et al., 2018; Kotani et al., 2018; Suzuki et al., 2013). Para ello, Atg2 presenta un pliegue tubular con una cavidad hidrofóbica que puede acomodar decenas de moléculas de fosfolípidos (Osawa et al., 2019). En humanos, la actividad de ATG2B está regulada positivamente por WIPI4 (ortólogo a Atg18 de levaduras) (**Figura 13**) (Osawa et al., 2020). Sin embargo, se desconoce si en las levaduras de fisión Atg18b y Atg18c facilitan la unión a la membrana y la actividad de transferencia de lípidos de Atg2 (Xu & Du, 2022).

2.2.2.2.4 Los complejos de conjugación similar a ubiquitina Atg8 y Atg12.

Siguiendo el modelo jerárquico de unión de la maquinaria Atg al ensamblaje del autofagosoma, los sistemas de conjugación similares a la ubiquitina son los últimos factores autofágicos en unirse (Hu & Reggiori, 2022; Mizushima, 2020). La función de ambos complejos radica principalmente en promover la lipidación de Atg8 con residuos de PE presentes en la membrana del fagóforo en expansión. Esta lipidación de Atg8 es necesaria para el reclutamiento de otros componentes de la maquinaria de la autofagia, la expansión y curvatura del fagóforo, así como para la degradación selectiva de determinados componentes celulares (Liu et al., 2023; Maruyama et al., 2021; Maruyama & Noda, 2021).

El mecanismo de acción de ambos complejos de conjugación se conserva evolutivamente desde levaduras a mamíferos. De hecho, en *S. pombe* todos los componentes excepto Atg10 y Atg16L1/2 se identificaron mediante una búsqueda de secuencias que presentasen una alta homología (Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009; Sun et al., 2013). Estas proteínas Atg son necesarias para la autofagia, pues la delección de todas ellas inhibe la inducción del proceso (Sun et al., 2013). No obstante, en *S. pombe* la delección de *atg10⁺* no inhibe la inducción de la autofagia, planteándose la posibilidad de que tanto Atg10 como Atg3 puedan actuar como enzimas E2 para la conjugación de Atg12 en determinados organismos eucariotas (**Figura 15**) (Flanagan et al., 2013).

2.2.2.2.3 Cierre y fusión autofagosoma-vacuola en *S. pombe*.

Una vez el fagóforo se ha expandido lo suficiente para secuestrar su carga, se procede al cierre por escisión. En *S. pombe* se desconocen las proteínas SNARE implicadas en la fusión del autofagosoma con la vacuola, a diferencia de *S. cerevisiae*. Sin embargo, se ha sugerido que Yep1 (ortóloga a REEP1-4 en células humanas y Atg40 de *S. cerevisiae*), podría estar implicada en el cierre del autofagosoma en la autofagia no selectiva (Wang et al., 2023). También se ha descrito que Yep1 participa en la reticulofagia y la nucleofagia, formas de autofagia selectiva (Zou et al., 2023). Ambos estudios coinciden en que una de las principales funciones de Yep1 es remodelar la membrana del autofagosoma frente a posibles alteraciones en la forma de la carga secuestrada (Wang et al., 2023; Zou et al., 2023).

Tras el cierre, se produce la fusión y liberación del cuerpo autofágico, una etapa que es crítica para prevenir la acumulación de autofagosomas en la levadura. En *S. pombe*, la fusión autofagosoma-vacuola depende de Fsc1 (dominio vacuolar fasciclin-1) (Sun et al., 2013; Xu & Du, 2022).

Tras la fusión, es enormemente relevante el papel de la proteasa Isp6, ya que en su ausencia se acumulan los cuerpos autofágicos dentro de la vacuola, lo que afecta considerablemente a la degradación de la carga citoplasmática (Nakashima et al., 2006). *S. pombe* tiene unas 80 vacuolas pequeñas, lo cual implica una mayor regulación de las cargas celulares a degradar para evitar sobrepasar las capacidades degradativas de las vacuolas (Sun et al., 2013). En células de mamíferos también hay un elevado número de lisosomas y por lo tanto, se comparte esa necesidad de velar por la homeostasis lisosomal/vacuolar (Ishii et al., 2019; Mijaljica et al., 2007; Nakashima et al., 2019).

3 Interconexión entre la señalización de la represión catabólica (CCR) y la autofagia en la adaptación de las levaduras a la escasez de glucosa.

La represión catabólica por fuente de carbono (CCR) es un mecanismo de regulación transcripcional que permite a la célula modular la expresión génica con el fin de metabolizar de forma preferente la glucosa. Este mecanismo afecta a la expresión de varios grupos de genes, incluidos los necesarios para el transporte de azúcares, el metabolismo de fuentes de carbono alternativas a la glucosa, el metabolismo respiratorio, la gluconeogénesis, la proliferación celular y la autofagia (Adnan et al., 2017; Kremling et al., 2015; Schuller, 2003; Vassiliadis et al., 2019).

S. pombe y *S. cerevisiae*, a pesar de su divergencia evolutiva, comparten una regulación transcripcional similar en respuesta al déficit de glucosa (Ver **Apartado 1.2.2**) (Kunitomo et al., 2000; Mata & Bahler, 2006; Vassiliadis et al., 2019). Por su parte, en *S. pombe*, la escasez de glucosa afecta a la expresión del 73,6% del genoma (~1749 genes) (Vassiliadis et al., 2019). De hecho, el 50% de los genes inducidos o reprimidos forman parte de la respuesta general frente a estrés (CESR, «*Core Environmental Stress Response*»), encontrándonos con genes implicados en el cambio diaúxico, el metabolismo respiratorio y la autofagia (Malecki et al., 2016; Vassiliadis et al., 2019). Además, en *S. pombe* esta respuesta transcripcional está regulada principalmente por los factores de transcripción Rst2 y Atf1; y por los represores transcripcionales Scr1 y el complejo Tup11/12-Ssn6; cuya función se encuentra modulada por las vías de señalización AMPc-PKA, AMPK, TORC1 y la ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK) (Adnan et al., 2017; Hirota et al., 2006; Malecki et al., 2016; Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Saitoh et al., 2015; Vassiliadis et al., 2019).

3.1 Los estímulos proautofágicos en *S. pombe* y *S. cerevisiae*.

La autofagia, es una respuesta adaptativa que activan los seres vivos eucariotas para hacer frente a diversos estímulos, como el estrés energético, el estrés nutricional, el estrés térmico, la hipoxia, la formación de agregados proteicos disfuncionales, la presencia de orgánulos celulares dañados, etc. (Gross & Graef, 2020; Hu & Reggiori, 2022; Lin et al., 2021). Entre todos estos ellos, el principal estímulo proautofágico común desde levaduras a células de mamífero es indiscutiblemente el déficit de nutrientes esenciales (Gross & Graef, 2020; Hu & Reggiori, 2022; Lin et al., 2021; Rabinowitz & White, 2010).

Las principales condiciones que inducen la autofagia en *S. pombe* son: el estrés reticular causado por DTT (Zhao et al., 2020) o 3,3'-Di-indolilmetano (DIM) (Emami & Ueno, 2021); el estrés oxidativo inducido por paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) (Mikawa et al., 2010) o alcanfor (Agus et al., 2019); y diversos estreses nutricionales como la inanición de nitrógeno, azufre, fósforo o leucina (Corral-Ramos et al., 2021; Shimasaki et al., 2020; Zhao et al., 2020). Además, recientemente se ha descrito que la limitación en la disponibilidad de glucosa es un estímulo proautofágico en *S. pombe*. No obstante, se atribuye la inducción de la autofagia en estas condiciones a la degradación selectiva de las mitocondrias dañadas, como resultado del intenso estrés oxidativo derivado del metabolismo respiratorio inducido bajo dichas circunstancias (Corral-Ramos et al., 2021), dado en *S. pombe*, se ha excluido ampliamente la inanición de glucosa como estímulo proautofágico (Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2010; Xu & Du, 2022). En otros modelos, no obstante, existen evidencias dispares (Adachi et al., 2017; Lang et al., 2014; Moruno et al., 2012; Ramírez-Peinado et al., 2013). Por un lado, diversos estudios en levaduras sugieren que la inanición de glucosa es un estímulo inhibitor en lugar de activador (Adachi et al., 2017; Lang et al., 2014). Asimismo, estas discrepancias también se han observado en mamíferos. En algunos trabajos la presencia de una concentración deseada de glucosa en el medio provoca una disminución del flujo autofágico mientras que en otras el efecto contrario (Li et al., 2022; Moruno et al., 2012; Ramírez-Peinado et al., 2013; Xi et al., 2013).

La investigación de los mecanismos moleculares que rigen la inducción de la autofagia ha estado predominantemente enfocada en comprender su regulación en respuesta a la privación de nitrógeno (Gross & Graef, 2020; J. Liu, Y. Jia, et al., 2015; Mukaiyama et al., 2010). En contraste, los mecanismos moleculares subyacentes a la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de otros nutrientes esenciales, como la glucosa, siguen siendo en gran medida desconocidos. En *S. cerevisiae*, se ha señalado que la autofagia inducida en respuesta a la escasez de glucosa está regulada negativamente por la CCR (Adachi et al., 2017) y, además, se ha descrito su interrelación con el metabolismo respiratorio (Graef & Nunnari, 2011; May et al., 2020; Yi et al., 2017).

3.2 Vías de señalización nutricional como reguladoras de la CCR y la autofagia.

La inducción de la autofagia está regulada por numerosas vías de señalización nutricional que transmiten a las células información acerca de la disponibilidad de nutrientes, y que influyen en su transcriptoma, proteoma, y metaboloma. Entre ellas desempeñan un destacado papel las rutas TOR, AMPK, AMPc-PKA y las vías de respuesta a estrés moduladas por MAPK (Kamada et al., 2010; Lin et al., 2021; Noda & Ohsumi, 1998; Stephan

et al., 2009; Wang et al., 2001; Yorimitsu et al., 2007). En *S. cerevisiae*, las vías de señalización mediadas por TOR y AMPc–PKA regulan negativamente la inducción de la autofagia; mientras que la AMPK y las vías dependientes de MAPK son necesarias para su completa inducción (Lin et al., 2021).

Curiosamente, en *S. pombe* el conocimiento acerca de la implicación de estas vías de señalización en la regulación de la autofagia es bastante limitado. Hasta el momento, se ha demostrado la implicación de la ruta TOR como regulador negativo y de la ruta SAPK como regulador positivo (Corral-Ramos et al., 2021).

3.2.1 Papel de las rutas de señalización antagónicas TOR y AMPK en la autofagia.

3.2.1.1 Análisis detallado de los complejos TOR y su relevancia funcional en *S. pombe*.

La ruta de señalización de la proteína quinasa diana de la rapamicina TOR («*Target Of Rapamycin*») está conservada evolutivamente en los organismos eucariotas, y se organizan en dos complejos multiproteicos denominados TORC1 y TORC2, los cuales exhiben notables diferencias estructurales y funcionales (Wullschleger et al., 2006). En células humanas hay una única proteína quinasa TOR que forma parte de ambos complejos, sin embargo, en levaduras existen dos proteínas quinasas denominadas Tor1 y Tor2 (Morozumi & Shiozaki, 2021).

3.2.1.1.1 Composición de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. pombe*.

En *S. pombe*, TORC1 está compuesto por la proteína esencial Tor2 que forma un complejo con Mip1 (homólogo a Raptor en humanos), Wat1 /Pop3, Tco89 y Tco1 (**Figura 16**) (Ikai et al., 2011; Matsuo et al., 2007; Otsubo & Yamamoto, 2008). En determinadas condiciones de estrés ambiental, especialmente la escasez nutricional, Tor1 puede formar parte de este complejo (Weisman & Choder, 2001). El complejo TORC2 está compuesto exclusivamente por la quinasa Tor1, la cual forma un complejo con Wat1/Pop3, Ste20 (homólogo a Rictor en humanos) y Sin1 y Bit61 (**Figura 16**) (Hartmuth & Petersen, 2009; Ikai et al., 2011; Otsubo & Yamamoto, 2008).

Aunque las funciones de las quinasas Tor2 y Tor1 en *S. pombe* son opuestas, ambas están implicadas en una compleja red de transducción de señales que responde frente a fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes activando diversas respuestas celulares que, en última instancia, impulsan el crecimiento y la proliferación celular, e inhiben la diferenciación sexual (**Figura 16**) (Ikai et al., 2011; Valbuena et al., 2012).

- **Tor2 (TORC1):** En *S. pombe*, Tor2 es esencial para el crecimiento celular y la represión de la diferenciación sexual, la meiosis y la esporulación (Alvarez & Moreno, 2006; Matsuo et al., 2007), para ello regula positivamente diversos procesos anabólicos, como la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos; e inhibe procesos catabólicos como la autofagia (Hall, 2008; Morozumi & Shiozaki, 2021; Teixeira, 2023). En presencia de nutrientes, entre las principales dianas de Tor2 se encuentra el factor de transcripción Gaf1. Debido a la escasez de nutrientes, TORC1 se inactiva y Gaf1 es desfosforilado, translocándose al núcleo donde promueve la expresión de genes implicados en el transporte de aminoácidos, en el metabolismo energético y en la elongación del CLS (Q. Liu et al., 2015; Rodríguez-López et al., 2020).
- **Tor1 (TORC2):** En *S. pombe*, Tor1 no es esencial para el crecimiento, pues el mutante *tor1Δ* es viable (Alvarez & Moreno, 2006; Hayashi et al., 2007). Por un lado, Tor1 tiene un papel crítico en la mitosis y la citocinesis al controlar la activación de la CDK y regular el citoesqueleto de actina (Ikai et al., 2011; Ikeda et al., 2008). Además, Tor1 es necesario para promover la entrada en fase estacionaria, el desarrollo sexual ante la escasez de nutrientes, la absorción de aminoácidos y la supervivencia celular ante una amplia variedad de condiciones de estrés (alta osmolaridad, estrés oxidativo, estrés térmico, daño en el ADN) (Schonbrun et al., 2009; Weisman & Choder, 2001; Weisman et al., 2007).

3.2.1.1.2 Regulación de TOR en *S. pombe*.

3.2.1.1.2.1 **Regulación de TORC1 por Tsc1-Tsc2/Rhb1 en *S. pombe*.**

En *S. pombe*, el principal activador de TORC1 es la GTPasa Rhb1 ortóloga a RHEB («*Ras Homolog Enriched in Brain*») de mamíferos. Rhb1 está regulada negativamente por el complejo Tsc1-Tsc2 («*Tuberous sclerosis proteins 1 and 2*») el cual actúa como una GAP (enzima que intercambia nucleótidos de GTP a GDP) de Rhb1, provocando la inhibición de TORC1 en respuesta a diferentes formas de estrés nutricional (**Figura 16**) (Long et al., 2005; Otsubo & Yamamoto, 2008; Smith et al., 2005).

- **Tsc1 y Tsc2:** En *S. pombe* Tsc1 y Tsc2 forman un heterodímero que es esencial para la adaptación frente a la inanición de nitrógeno (**Figura 16**). Estos componentes están implicados en la absorción de aminoácidos y nucleótidos, regulando la localización de permeasas y transportadores de aminoácidos (Aspuria & Tamanoi, 2008; Q. Liu et al., 2015; Matsumoto et al., 2002; Nakashima et al., 2014). La interrupción de *tsc1⁺* y *tsc2⁺* provoca un arresto del ciclo celular en G1 y defectos en la diferenciación sexual (Matsumoto et al., 2002; Murai et al., 2009; Otsubo & Yamamoto, 2008).
- **Rhb1:** En *S. pombe*, Rhb1 es un gen esencial para la proliferación celular debido a su papel como activador de TORC1 (Mach et al., 2000). De hecho, tanto la delección de

rhb1⁺ como la sobreexpresión de alelos de *rhb1⁺* que portan mutaciones dominantes afectan gravemente al crecimiento celular (Mach et al., 2000; Murai et al., 2009; Urano et al., 2005). Respecto a la activación de Tor2, Rhb1 oscila entre una isoforma activa unida a GTP (Rhb1-GTP) y una isoforma inactiva unida a GDP (Rhb1-GDP). La inactivación de Rhb1 está regulada por el complejo Tsc1-Tsc2.

La inhibición de la ruta TORC1 en *S. pombe* es una respuesta común a diferentes formas de estrés nutricional. En lo que respecta al estrés asociado con cambios en la calidad de la fuente de nitrógeno, la inactivación de TORC1 es dependiente de la AMPK Ssp2 (**Figura 16**) (Corral-Ramos et al., 2021; Davie et al., 2015). La implicación específica de la vía AMPK en esta señalización se abordará en secciones posteriores de este trabajo (Ver el **Apartado 3.2.2.2**).

3.2.1.1.2.2 Regulación de TORC2 en *S. pombe*: papel de Ryh1.

En *S. pombe*, Ryh1 (ortóloga a Rab6 en humanos) es una GTPasa de la familia Rab (Martinez & Goud, 1998; Weisman, 2016), que regula positivamente a la vía de señalización TORC2-Gad8. Ryh1 se localiza en el aparato de Golgi donde está implicada en la modulación del transporte retrogrado de proteínas y lípidos desde los endosomas al RE (Martinez & Goud, 1998). Ryh1 oscila entre una forma activa (Ryh1-GTP) y una forma inactiva (Ryh1-GDP). Este intercambio de nucleótidos de guanina está regulado por la GAP Gyp10 y por la GEF (intercambia nucleótidos de GDP por GTP) Sat1/4 (**Figura 16**) (Tatebe et al., 2010).

TORC2 tiene un sustrato directo conocido, la AGC quinasa Gad8, que está relacionada con la AKT en células humanas. Tor1 fosforila a Gad8 en los aminoácidos Ser527 y Ser546 (equivalente a Ser-473 en AKT) (**Figura 16**) (Ikeda et al., 2008; Matsuo et al., 2003). La delección de *ryh1⁺* o de sus GEFs *sat1⁺/sat4⁺* provoca una reducción significativa de la activación de Gad8 dependiente de TORC2. No obstante, Gad8 presenta una fosforilación basal en ausencia de *ryh1⁺*, lo cual indica la existencia de otras GTPasas de la familia Rab implicadas en la regulación de Gad8 (Tatebe et al., 2010)

En presencia de glucosa, la señalización TORC2-Gad8 está activa de forma dependiente de Ryh1-GTP y de la señalización de la vía AMPc-PKA (principal sensor celular de la disponibilidad extracelular de glucosa) (**Figura 16**) (Cohen et al., 2014). Sin embargo, ante la inanición de glucosa, Ryh1 se inactiva (Ryh1-GDP) provocando el apagado de la ruta TORC2-Gad8 (Alao et al., 2023; Hatano et al., 2015). Sorprendentemente, en estas condiciones de escasez de glucosa, la fosforilación de Gad8 dependiente de TORC2 se recupera gradualmente de forma independiente de Ryh1 (Hatano et al., 2015). Esta recuperación es dependiente de la AMPK Ssp2, que se ha descrito como un modulador positivo de la ruta TORC2 en *S. pombe* (Cohen et al., 2014) (**Figura 16**).

3.2.1.2 Regulación de la vía de señalización AMPK en *S. pombe*.

La vía de señalización de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es una ruta conservada evolutivamente que está implicada en el mantenimiento de la homeostasis energética celular en respuesta a estímulos ambientales (estrés nutricional, estrés osmótico, estrés energético, etc.) (Hanyu et al., 2009; Valbuena & Moreno, 2012). La actividad de la AMPK permite adaptar el metabolismo celular en función de los recursos energéticos disponibles (niveles de ATP) (Adnan et al., 2017; Galdieri et al., 2010; Gancedo, 1998; Hardie, 2007). Esta respuesta adaptativa implica: la inhibición de la actividad de TORC1; la entrada prematura en mitosis y la detención de la progresión del ciclo celular; y cambios en el transcriptoma (metabolismo, diferenciación sexual, etc.) (**Figura 17**) (Davie et al., 2015; Forte et al., 2019; Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Valbuena & Moreno, 2012).

3.2.1.2.1 Subunidades, activación y relevancia fisiológica de la vía AMPK en *S. pombe*.

En *S. pombe*, la AMPK forma un heterotrímero $\alpha\beta\gamma$ (Townley & Shapiro, 2007). A continuación, se detallan sus principales características.

- Las **subunidades- α** o catalíticas (Ssp2 y Ppk9) contienen un dominio típico de serina-treonina quinasa característico de las AMPK (Hanyu et al., 2009; Schutt & Moseley, 2017; Valbuena & Moreno, 2012). Ssp2 presenta un dominio UBA («*Ubiquitin Associated*») adyacente al dominio quinasa (Hanyu et al., 2009; Jaleel et al., 2006). Aunque este motivo no facilita la interacción de Ssp2 con la poli-ubiquitina u otras moléculas similares, es crucial para la regulación de su conformación, activación y localización intracelular (Jaleel et al., 2006).
- La **subunidad- β** reguladora (Amk2) actúa como una proteína de andamiaje necesaria para el ensamblaje del trímero y la localización subcelular del complejo AMPK (Schutt & Moseley, 2017; Valbuena & Moreno, 2012). Además, se ha descrito un posible papel de los nucleótidos de adenosina difosfato (ADP) en la regulación de la actividad de la AMPK a través de su unión a esta subunidad (Jin et al., 2007) (**Figura 17**).
- La **subunidad- γ** (Cbs2) contiene dominios de cistationina- β sintasa (CBS) que se unen a nucleótidos de adenosina, AMP (**Figura 17**) (Schutt & Moseley, 2017; Valbuena & Moreno, 2012).

La activación de Ssp2 depende de la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMKK) Ssp1. En respuesta a la escasez de nitrógeno o glucosa, Ssp1 fosforila y activa a Ssp2 en el residuo Thr189 de su bucle de activación (**Figura 17**) (Valbuena & Moreno, 2012). En condiciones de escasez o cambios en la calidad de la fuente de nitrógeno la activación de Ssp2 es independiente del ratio ATP/AMP (Davie et al., 2015). Asimismo, ante un cambio en la calidad de la fuente de nitrógeno, la CaMKK Ppk34 contribuye a favorecer la

fosforilación de Ssp2 dependiente de Ssp1 (**Figura 17**) (Davie et al., 2015). Además, en estas condiciones de estrés nutricional, los mutantes que carecen de *ssp1⁺* o *ssp2⁺* presentan un arresto en G2 y un aumento de la actividad basal de TORC1, promoviendo la resistencia a la torina (inhibidor de mTOR que compite con el ATP) (Davie et al., 2015). El mecanismo de activación de Ssp2 en otras condiciones de estrés, como el estrés osmótico o la escasez de glucosa, obedece a un modelo canónico. En estas circunstancias, se produce un descenso del ratio ATP/AMP (Schutt & Moseley, 2017), lo que desencadena la fosforilación y activación de Ssp2 dependiente de Ssp1 (Alao et al., 2023; Jin et al., 2007; Schutt & Moseley, 2017; Suter et al., 2006).

3.2.1.2.2 La AMPK y el factor de represión transcripcional Scr1: la modulación de la CCR, el cambio diaúxico y el metabolismo del glicerol en *S. pombe*.

La AMPK desempeña un papel central en la regulación de diversos procesos metabólicos, actuando como un vínculo entre el metabolismo celular y la disponibilidad energética. Puede ejercer este control de dos maneras: directamente, al actuar sobre enzimas metabólicas específicas, o indirectamente, al influir en la regulación de la expresión génica. Específicamente, la AMPK modula la inactivación de la CCR, lo que facilita la expresión de genes relacionados con el metabolismo de fuentes de carbono alternativas y el metabolismo respiratorio, entre otros (Adnan et al., 2017; Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Vassiliadis et al., 2019).

En *S. pombe*, los principales responsables de la CCR son el represor transcripcional Scr1, ortólogo de Mig1 en *S. cerevisiae*, y el complejo remodelador de la cromatina Tup11-Tup12-Ssn6 (complejo Tup11/12) (Hirota et al., 2006). Por su parte, Scr1 presenta dos motivos de dedo de zinc tipo Cys2His2 (C2H2) y dos motivos SPXX o TPXX ampliamente conservados en reguladores de la transcripción y que parecen ser necesarios para su correcto funcionamiento (Tanaka et al., 1998). En presencia de glucosa, Scr1, en cooperación con el complejo Tup11/12, reprime la expresión de genes que presentan promotores ricos en elementos CG (conocidos como motivos STREP, «*Stress Response Element in S. pombe*»), como aquellos implicados en el cambio diaúxico (*fbp1⁺*, *inv1⁺* y *gld1⁺*) (**Figura 17**). (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Tanaka et al., 1998). Además, el complejo Tup11/12 puede actuar como represor independientemente de Scr1. Así, se ha descrito que la expresión de *gld1⁺* se encuentra reprimida por Scr1 y Tup12; mientras que únicamente Tup12 y Tup11, participan en la represión de *dak1⁺* y *dak2⁺*, respectivamente (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Tanaka et al., 1998).

En ausencia de glucosa, Scr1 es fosforilado por la AMPK Ssp2 en múltiples sitios de fosforilación, entre los que destacan los aminoácidos Ser235, Ser332, Ser333, Ser408 y

Ser410. Esta fosforilación inhibe la actividad del represor transcripcional Scr1 al promover su exclusión nuclear, permitiendo la expresión de los genes necesarios para efectuar el cambio diaúxico (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012). En el mutante *ssp2Δ*, Scr1 permanece en el núcleo reprimiendo la expresión de estos genes incluso tras el agotamiento de la glucosa (Hirota et al., 2006; Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Matsuzawa et al., 2010). Esto resulta en la incapacidad del mutante para proliferar en medios donde el glicerol es la única fuente de carbono, siendo esta una fuente de carbono respirable, pero no fermentable (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012). Por su parte, la delección de *scr1⁺* induce una desrepresión constitutiva de aproximadamente el 1.5% del genoma de *S. pombe*, observándose un aumento en la expresión de genes como *fbp1⁺*, *gld1⁺* y *glt5⁺*, incluso en presencia de glucosa (Vassiliadis et al., 2019).

3.2.1.3 Análisis evolutivo de la regulación de la autofagia por las vías TOR y AMPK desde levaduras a células de mamífero: una incógnita por despejar en *S. pombe*.

En levaduras, se ha descrito que tanto la inanición de nitrógeno como el tratamiento con rapamicina desencadenan la inhibición de TORC1, el cual regula negativamente la autofagia a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Díaz-Troya et al., 2008; Noda, 2017). Por un lado, se ha demostrado, desde levaduras a células de mamíferos que Atg13/ATG13 y Atg1/Ulk1 son dianas clave de TORC1 en la autofagia (Alao et al., 2023; Gross & Graef, 2020; Kim et al., 2011; Xu & Du, 2022). Además, en levaduras, se ha descrito que las proteínas fosfatasa de la familia PP2C, Ptc2 y Ptc3, participan en la desfosforilación de Atg1 y Atg13, contrarrestando la actividad de TORC1 (Memisoglu et al., 2019). En *S. cerevisiae* TORC1 también regula a otros componentes de la maquinaria central de la autofagia como Atg2, Atg9 y Atg29 (Dokládál et al., 2021). Adicionalmente, se ha descrito que TORC1 también está implicado en la expansión de la membrana autofagosómica al regular la expresión de Atg8 (Kamada et al., 2010). Por su parte, en células de mamífero se ha descrito que mTORC1 contribuye a la represión de la autofagia a través de la fosforilación de la proteína AMBRA1 («*Autophagy and Beclin-1 regulator 1*») (Noda & Fujioka, 2015) y del complejo I de la PI3KC3 (Licheva et al., 2022).

En *S. pombe* se ha demostrado que un tratamiento combinado de rapamicina junto con cafeína y el déficit de nutrientes esenciales consiguen inhibir la actividad de TORC1, y promueven la autofagia (Rallis et al., 2013; Takahara & Maeda, 2012), gracias a la desfosforilación de Atg1 (Corral-Ramos et al., 2021). Asimismo, la inactivación de TORC2, que provoca una disminución de la actividad de TORC1 permite la inducción de la autofagia incluso en presencia de nutrientes (Corral-Ramos et al., 2021).

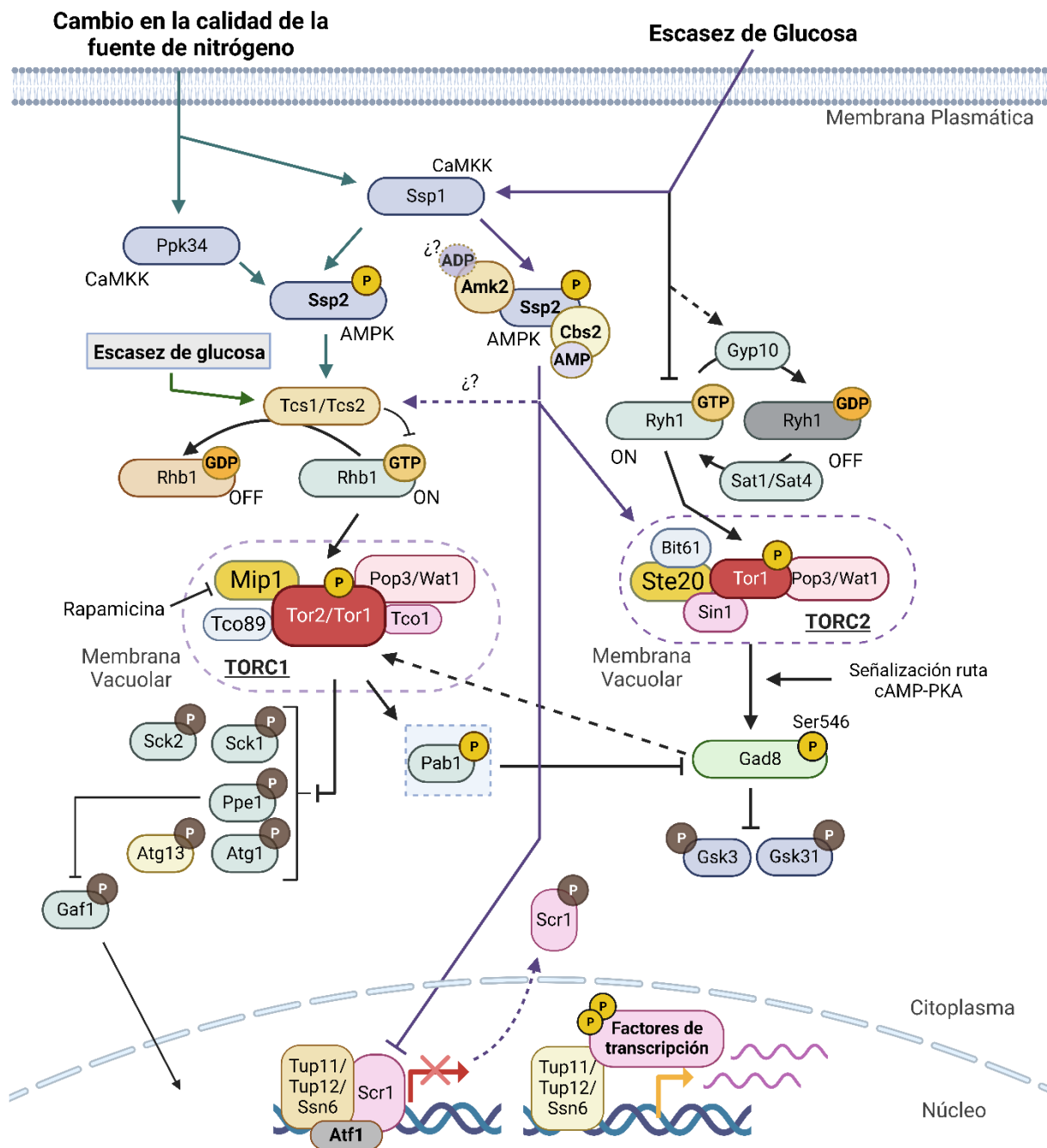


Figura 17. Interacción entre las rutas de TOR y AMPK en *S. pombe*. Las modificaciones postraduccionales en forma de fosforilación están representadas las inhibitorias en marrón, y las activadoras en amarillo. Para mayor información, véase el texto principal. Adaptada de: Alao, et al., 2023; Corral-Ramos, et al., 2021.

Por otro lado, la activación de AMPK contribuye a la inducción de la autofagia mediante diversos mecanismos moleculares conservados evolutivamente. En mamíferos, la AMPK promueve el apagado de TORC1 al fosforilar y activar a las proteínas supresoras de tumores TSC1-TSC2 promoviendo su actividad inhibidora sobre RHEB; y al regular negativamente a RAPTOR («*Regulatory-Associated Protein of mTOR*») (Hardie, 2008). Además, la AMPK activa mediante fosforilación a ULK1, ATG13, BECLIN-1 y ATG14 (Kim et al., 2011; Licheva et al., 2022). Por su parte, en *S. cerevisiae*, la AMPK Snf1 está implicada en la regulación de la autofagia al fosforilar y activar a Atg1, un proceso en el cual Atg11 también desempeña un papel crucial (Yeh et al., 2010). Además, Snf1 forma un complejo multiproteico en la membrana mitocondrial externa junto con Atg1-Atg13 (Snf1-Mec1-Atg1-Atg13) que es necesario para la inducción óptima del metabolismo respiratorio en condiciones de escasez de glucosa (Yi et al., 2017). Este aspecto en particular será objeto de análisis en un apartado posterior (Ver **Apartado 3.3.4.1**).

En relación con *S. pombe*, el papel de Ssp2 en la modulación de la autofagia aún no ha sido examinado exhaustivamente. Sin embargo, dado su rol como regulador negativo de la señalización de TORC1, se postula una probable implicación en este proceso (Alao et al., 2023).

3.2.2 La vía de señalización AMPc-PKA en *S. pombe*: Sistema de detección de la disponibilidad de glucosa y regulador clave de la reprogramación metabólica.

Numerosos seres vivos emplean el AMPc como mensajero secundario, el cual desempeña un papel crucial en la regulación de la adaptación celular frente a fluctuaciones ambientales. En *S. pombe*, este metabolito es clave en la vía de señalización de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc (AMPc-PKA), la cual se encuentra implicada en la detección de glucosa (Byrne & Hoffman, 1993); el cambio diaúxico (Galdieri et al., 2010), la función mitocondrial (Yorimitsu et al., 2007); la diferenciación sexual (Higuchi et al., 2002; Kunitomo et al., 2000), la gluconeogénesis (Otsubo & Yamamoto, 2012); la regulación de la transición a la meiosis (Maeda et al., 1994; Matsuo et al., 2008; Wu & McLeod, 1995); el CLS (Roux et al., 2006); la respuesta frente a estrés (Matsuo & Kawamukai, 2017; Matsuo et al., 2008; Stiefel et al., 2004); la segregación cromosómica (Tanabe et al., 2019); y el mantenimiento adecuado de la estructura de los microtúbulos (Tanabe et al., 2020).

3.2.2.1 Regulación y activación de la ruta AMPc-PKA en *S. pombe*.

En *S. pombe*, la vía AMPc-PKA es el principal sensor de la disponibilidad extracelular de glucosa y su activación depende únicamente del receptor transmembrana Git3 acoplado a una proteína G heterotrimérica compuesta por la subunidad α (Gpa2), la subunidad β (Git5) y la subunidad γ (Git11) (Higuchi et al., 2002). La interacción entre el receptor y la proteína G provoca la activación y liberación de Gpa2, la cual activa a Cyr1 (**Figura 18**). Asimismo, de forma independiente de la proteína G, en la activación de Cyr1 participan Git1, Git7 y Git10 (Byrne & Hoffman, 1993). Aunque se desconoce el mecanismo exacto, se ha propuesto un posible papel en el control de la localización y/o estabilidad de Cyr1 o Gpa2, o en el ensamblaje de un complejo de señalización funcional (Byrne & Hoffman, 1993). Tras la activación de Cyr1 se produce un aumento transitorio en los niveles de AMPc, que se une a las subunidades reguladoras de la PKA, liberando y activando las subunidades catalíticas que fosforilan proteínas específicas en residuos de Ser o Thr en el motivo consenso (K/R)(K/R)X(S/T) (**Figura 18**) (Higuchi et al., 2002). En diversos tipos de levaduras (*S. cerevisiae*, *S. pombe* y *Pichia pastoris*), se ha señalado que la subunidad reguladora de la PKA puede unirse tanto a AMPc como a GMPc, induciéndose los procesos regulados por la vía PKA (Cytrynska et al., 1999; Demirbas et al., 2011; Frajnt et al., 2003; Higuchi et al., 2002). Esta capacidad, parece deberse a la presencia de residuos de glutamina o asparagina en la posición 13 de la secuencia consenso del segundo casete de unión a fosfato. Por su parte, las subunidades reguladoras de PKA que son altamente selectivas para AMPc sobre GMPc poseen un residuo de alanina en esta posición (Canaves & Taylor, 2002).

De forma general, la escasez de glucosa da como resultado una rápida reducción de los niveles intracelulares de AMPc, que finalmente conduce a la inactivación de la señalización de la vía AMPc-PKA (Byrne & Hoffman, 1993). En línea con esto, en *S. pombe* se ha descrito que la escasez de nitrógeno también reduce los niveles de AMPc, sin embargo, en este caso se necesitan horas para reducir los niveles de AMPc a la mitad (Isshiki et al., 1992; Maeda et al., 1990; Mochizuki & Yamamoto, 1992).

Finalmente, respecto a la regulación negativa de esta vía de señalización, en *S. pombe* la fosfodiesterasa Cgs2 es la principal responsable de la disminución de los niveles de AMPc intracelulares, aliviando, por tanto, la inhibición de Cgs1 dependiente de este metabolito (**Figura 18**) (Demirbas et al., 2011; Higuchi et al., 2002). Así, los mutantes nulos de *cgs2 Δ* son parcialmente estériles y tienen dificultades en el establecimiento de un estado de quiescencia (DeVoti et al., 1991).

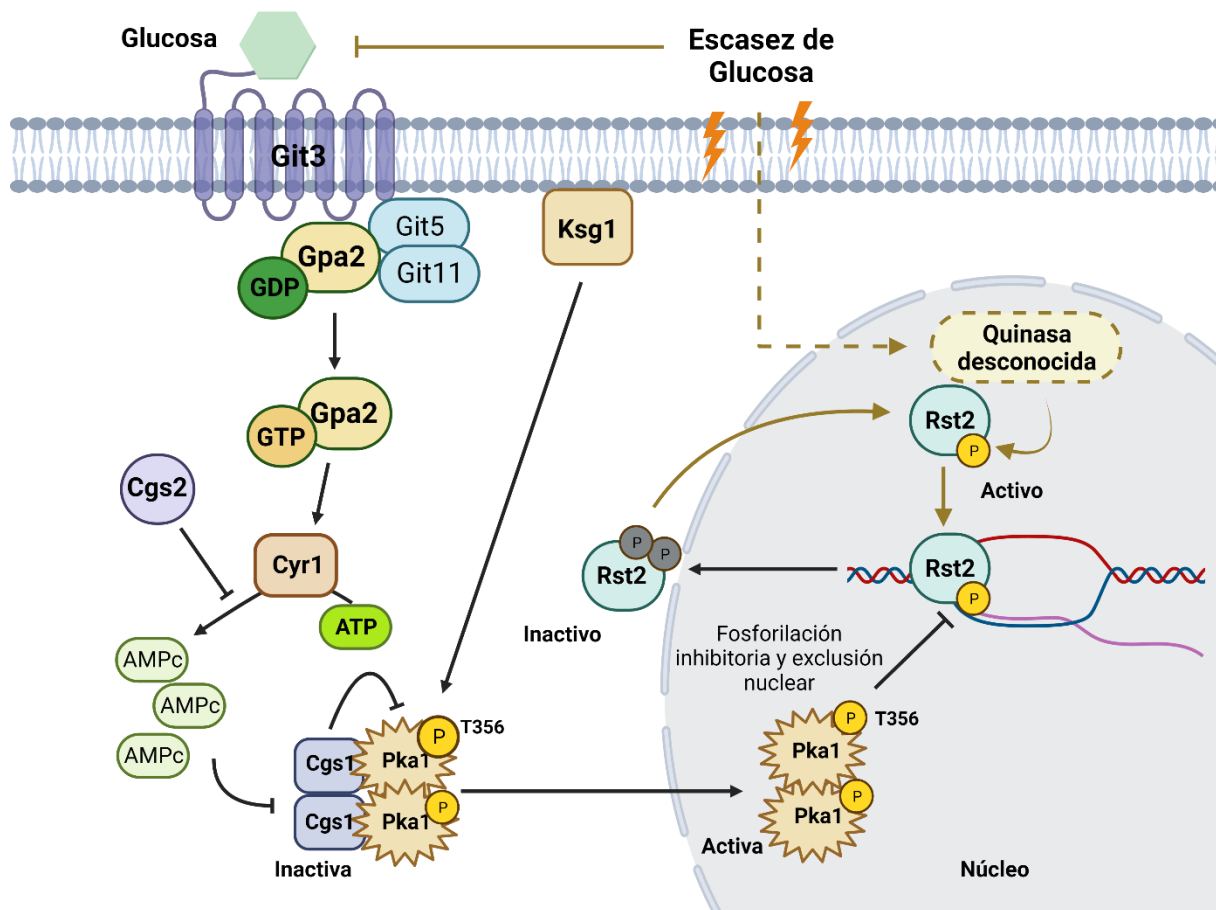


Figura 18. Ruta de señalización de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (AMPc-PKA) en *S. pombe*. La ruta PKA está implicada en el modular la progresión del ciclo celular con relación a la disponibilidad de glucosa al controlar la expresión génica asociada al cambio diaúxico y el metabolismo mitocondrial. Su principal diana es el factor transcripcional Rst2. Adaptada de Corral-Ramos, et al. 2021.

3.2.2.2 Composición y activación de la proteína quinasa A (PKA) en *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

En *S. pombe*, el heterotetrámero de la PKA está constituido por dos subunidades reguladoras codificadas por *cgs1*⁺ y dos subunidades catalíticas codificadas por *pka1*⁺ (Gupta et al., 2011a, 2011b) (**Figura 18**). Por su parte, en *S. cerevisiae* las subunidades catalíticas están codificadas por tres genes relacionados denominados *tpk1*⁺, *tpk2*⁺ y *tpk3*⁺; siendo la pérdida de las tres subunidades letal (Broach, 2012; Galdieri et al., 2010; Toda et al., 1987). Sorprendentemente, en *S. pombe* esta vía de señalización no es esencial para mantener la viabilidad celular (Gupta et al., 2011b; Higuchi et al., 2002). Este hecho convierte a *S. pombe* en un modelo de investigación tremendamente útil para el análisis funcional de la ruta AMPc-PKA en procesos tales como el metabolismo, la respuesta a estrés, la meiosis, el control del ciclo celular y dinámicas del citoesqueleto (McInnis et al., 2010).

En *S. pombe*, Pka1 es fosforilada en el residuo Thr356 de su bucle de activación por la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos Ksg1/PDK1 (**Figura 18**) (Gupta et al., 2011a, 2011b; Niederberger & Schweingruber, 1999; Tang & McLeod, 2004). Esta fosforilación es necesaria tanto para su localización intracelular como para su interacción con Cgs1, y permite a su vez que Pka1 sea hiperfosforilada en otras posiciones (Gupta et al., 2011a, 2011b). Respecto a su localización, cuando las células crecen en medios ricos en glucosa, ambas subunidades se encuentran en el núcleo, siendo la localización de Pka1 independiente de Cgs1. Tras la caída de los niveles de AMPc en respuesta al déficit de glucosa, Cgs1 se activa y secuestra a Pka1 en el citosol (**Figura 18**) (Gupta et al., 2011a, 2011b).

3.2.2.3 Regulación del factor de transcripción Rst2 por la vía AMPc-PKA y su impacto en el cambio diaúxico en *S. pombe*.

Una de las principales dianas de la ruta AMPc-PKA en *S. pombe* es el factor de transcripción Rst2. (Higuchi et al., 2002). Respecto a su estructura, Rst2 presenta en su extremo amino terminal dos motivos de dedo de zinc tipo C2H2, los cuales son capaces de reconocer regiones reguladoras que presentan motivos STREP («*Stress response Elements in S. pombe*») cuya secuencia consenso es CCCCTC (Higuchi et al., 2002; Takenaka et al., 2018). Esta secuencia presenta una alta similitud con los motivos STRE («*Stress response Elements*») de *S. cerevisiae*, que es reconocida por Msn2 y Msn4 (Marchler et al., 1993).

En presencia de glucosa, tras su activación, Pka1 se trasloca al núcleo y fosforila al factor de transcripción Rst2 en los residuos Ser139, Thr140, Thr141, y Thr253 en una región próxima a cinco residuos de arginina consecutivos (Arg134-Arg138) que constituyen una señal de localización nuclear. Esta fosforilación regula negativamente la función de Rst2 al promover su exclusión nuclear e inactivación (**Figura 18**) (Higuchi et al., 2002; Kunitomo et al., 2000; Takenaka et al., 2018). Es precisamente mediante la regulación de la actividad de Rst2, cómo la vía AMPc-PKA modula los cambios en los patrones de expresión génica relacionados con el cambio diaúxico y el metabolismo respiratorio (Asada et al., 2015; Higuchi et al., 2002; Hirota et al., 2006; Takenaka et al., 2018; Vassiliadis et al., 2019).

En respuesta al déficit de glucosa y a un tratamiento con inhibidores de la ETC mitocondrial, Rst2 es activado mediante hiperfosforilación. Aunque ambas condiciones están relacionadas con el incremento en la producción de ROS y óxido nítrico, esa activación no se observa en otras formas de estrés como son el estrés oxidativo, el estrés osmótico y el estrés inducido por metales pesados (Jiang et al., 2021; Kato et al., 2013). En *S. pombe*, aún no se han identificado las quinasas responsables de esta hiperfosforilación de Rst2 (Figura 18), aunque se sabe que la activación es independiente de PKA (Higuchi et al., 2002; Kato et al.,

2013). Sin embargo, en *S. cerevisiae*, la MAPK Hog1 (ortóloga a Sty1 en *S. pombe*) regula positivamente la actividad de Msn2 y Msn4, ortólogos de Rst2 (Deckert & Struhl, 2001; Gorner et al., 1998; Malcher et al., 2011).

Por otra parte, Rst2 presenta una alta homología en sus dedos de zinc con el represor transcripcional Scr1 (Hirota et al., 2006). Esto convierte a Rst2 y Scr1 en reguladores antagonistas de la expresión de genes como *fbp1⁺* y *gld1⁺* (**Figura 18**) (Asada & Hirota, 2022; Vassiliadis et al., 2019). Por un lado, Scr1, junto con el complejo Tup11/12, mantiene inaccesible el promotor de *fbp1⁺* en presencia de glucosa. Tras el déficit de glucosa, Scr1 es exportado rápidamente al citoplasma a la vez que Rst2 es importado al núcleo promoviendo la expresión de *fbp1⁺* (Asada & Hirota, 2022; Asada et al., 2015) (**Figura 18**).

3.2.2.4 Interconexiones de la vía AMPc-PKA y sus implicaciones en la adaptación celular ante la escasez de nutrientes desde levaduras a mamíferos.

3.2.2.4.1 Interconexión de la ruta AMPc-PKA con el apagado de TORC1 en respuesta a la escasez nutricional en levaduras.

En *S. cerevisiae*, la activación constitutiva de la ruta PKA es capaz de bloquear distintas respuestas inducidas tras la inhibición de la actividad de TORC1 con rapamicina como la disminución de la biogénesis de ribosomas, la activación de la respuesta a estrés (STRE), la inducción de la autofagia, e incluso la ruta Cvt (Budovskaya et al., 2005; Budovskaya et al., 2004). En el caso de la autofagia, esto puede ser debido a que cuando PKA está activa fosforila a la proteína quinasa Ksp1, que a su vez fosforila y activa a TORC1, desencadenando la hiperfosforilación e inhibición de Atg13 (Umekawa & Klionsky, 2012). Por otro lado, tanto la ruta TORC1 como la ruta AMPc-PKA tienen un papel relevante al reprimir la función de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 en presencia de glucosa (Galdieri et al., 2010; Tate et al., 2010; Yorimitsu et al., 2007). Tras el déficit de glucosa y la inactivación de ambas rutas, Msn2 y Msn4 se activan promoviendo la expresión de genes implicados en la respuesta a estrés, la vía de respuesta retrógrada, el ciclo del TCA y la autofagia (Miller-Fleming et al., 2014; Yorimitsu et al., 2007).

Aunque en *S. pombe* no se ha descrito esta interconexión, se ha propuesto que las proteínas quinasas de la familia AGC, Sck1 y Sck2, podrían ser posibles puntos de interconexión funcional entre las vías de señalización AMPc-PKA y TORC1 (Otsubo et al., 2017; Wahls & Smith, 1994). Así, la sobreexpresión de las dianas de TORC1 *sck1⁺* y *sck2⁺* suprime los defectos de la ruta AMPc-PKA en *S. pombe* (Roux et al., 2006; Soto et al., 1997). Además, también se ha descrito que la disponibilidad de glucosa modula la activación de TORC2-Gad8, y por tanto de TORC1 a través de la vía AMPc-PKA (**Figura 17**) (Cohen et al., 2014).

3.2.2.4.2 La interconexión de la vía AMPc-PKA y la señalización mitocondrial: los niveles de ATP modulan la inducción de la autofagia, una vía por explorar en *S. pombe*.

Las mitocondrias son orgánulos celulares que aparte de estar encargados del metabolismo celular (producción de ATP), están implicados en la señalización de numerosos procesos como la muerte celular, la diferenciación y la autofagia (Abate et al., 2020; Shen et al., 2022). Por su parte, la autofagia es un proceso adaptativo altamente demandante de energía, pues el ensamblaje del autofagosoma es un sumidero de ATP. Ante la escasez de glucosa, se produce una caída brusca de los niveles intracelulares de ATP (Ashe et al., 2000; Lang et al., 2014). Tal y como hemos visto, en estas condiciones es clave transitar hacia un metabolismo energético que permita sacar el máximo rendimiento energético posible a partir de los recursos disponibles. Así, las células que efectúan eficazmente el cambio diaúxico y la activación del metabolismo respiratorio mantendrán los niveles intracelulares de ATP bajo estas condiciones, permitiéndoles inducir con éxito la autofagia (Adachi et al., 2017; Graef & Nunnari, 2011).

En *S. cerevisiae* un déficit en la respiración mitocondrial suprime el flujo autofágico (Graef & Nunnari, 2011). En este contexto se promueve la reactivación de la señalización mediada por la vía AMPc-PKA transitando hacia un crecimiento fermentativo. Esta transición metabólica requiere de la inhibición de la autofagia para evitar la degradación de los componentes celulares citoplasmáticos implicados en la producción glicolítica de ATP (Adachi et al., 2017; Graef & Nunnari, 2011). Por su parte, en *S. pombe* no está claro la relación entre la autofagia y las mitocondrias. No se ha descrito ninguna relación entre metabolismo respiratorio y la inducción de la autofagia, más allá de la observación de que mutantes nulos para componentes de la maquinaria central de la autofagia presentan una reducción en su actividad OXPHOS (Fukuda et al., 2020). Adicionalmente, se ha señalado que en *S. pombe* el adecuado mantenimiento de la quiescencia celular depende de la degradación selectiva de mitocondrias (mitofagia), al reducir la acumulación de ROS derivadas del metabolismo mitocondrial (Takeda et al., 2010).

3.2.2.4.2 Regulación de la autofagia mediante la vía AMPc-PKA: comparativa entre *S. cerevisiae*, mamíferos y particularidades en *S. pombe*.

En *S. cerevisiae*, la ruta de señalización AMPc-PKA regula negativamente la autofagia mediante la fosforilación de Atg1, Atg13 y Atg18, que inhibe su reclutamiento a PAS (Budovskaya et al., 2005; Budovskaya et al., 2004; Cebollero & Reggiori, 2009; Stephan et al., 2009; Yorimitsu et al., 2007). En el caso de células de mamíferos, la PKA está implicada en la regulación de diferentes etapas del ensamblaje del autofagosoma. Así, PKA fosforila directamente las posiciones Ser269 y Ser287 de ATG16L1 promoviendo su inestabilidad y

degradación (Zhao et al., 2019). No obstante, una vez inducida la autofagia, esa inestabilidad es contrarrestada por la fosforilación de ATG16L1 efectuada por ULK1 en la Ser278 (Alsaadi et al., 2019). Por otro lado, en células neuronales la PKA fosforila directamente a LC3 inhibiendo su reclutamiento al autofagosoma, constituyendo así un reservorio de LC3 inactivo, cuya desfosforilación permitirá que las células cambien rápidamente de la autofagia basal a la inducida (Cherra et al., 2010; Zhao et al., 2018)

Sin embargo, en *S. pombe* la ruta AMPc-PKA ha sido ampliamente descartada como regulador de la autofagia hasta la fecha en base a las siguientes evidencias: (1) La incapacidad de *S. pombe* de inducir la autofagia en respuesta a un ayuno completo de glucosa (Corral-Ramos et al., 2021; Mukaiyama et al., 2010; Xu & Du, 2022); y (2) el tratamiento con altas concentraciones de AMPc o la hiperactivación constitutiva de la ruta PKA en el mutante *cgs1Δ* no ocasionó defectos en la inducción de la autofagia en respuesta a un ayuno de nitrógeno (Corral-Ramos et al., 2021; Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009). Todos estos resultados sugieren que la ruta AMPc-PKA y la disponibilidad de glucosa no parecen desempeñar un papel regulador clave de la autofagia en *S. pombe*.

3.2.3 Ruta de señalización mediada por proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK): Respuesta frente al estrés y adaptación celular en eucariotas.

Las vías de señalización mediadas por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) permiten a los seres vivos adaptarse frente a los diferentes estímulos medioambientales propios de un entorno cambiante. Estas vías de transducción de señales se encuentran altamente conservadas y su organización básica consiste en: (i) un mecanismo de recepción de señal que es específico de estímulo (Pérez & Cansado, 2010); (ii) un módulo de transmisión formado por tres proteínas quinasas que se fosforilan secuencialmente: la MAPK, la MAPK quinasa (MAP2K) y la MAP2K quinasa (MAP3K); (iii) proteínas diana de la cascada de señalización que son fosforiladas por las MAPK, como factores de transcripción (Chen et al., 2003; Madrid et al., 2004; Sanso et al., 2008; Wilkinson et al., 1996), proteínas reguladores del ciclo celular (Madrid et al., 2021; Shiozaki & Russell, 1995; Whitaker & Cook, 2021) y proteínas de unión a ARN (Dean et al., 2004; Prieto-Ruiz et al., 2020), entre otras.

En las células de levadura, se ha descrito que los estímulos que activan las cascadas de señalización por MAPK son detectados por diferentes clases de sensores, entre los que destacan proteínas integrales de membrana, sistemas de dos componentes, receptores transmembrana acoplados a proteínas G (Pérez & Cansado, 2010). Una vez detectado el estímulo, la MAP3K es activada por acción de las quinasas o GTPasas de la familia Ras o Rho (Pérez & Cansado, 2010). A continuación, la MAP3K fosforila la MAP2K en dos residuos

(Ser y Thr) localizados en el dominio de activación presente en su extremo N-terminal. Posteriormente, la MAP2K activa a la MAPK al fosforilarla en dos residuos de Thr y Tyr de su bucle de activación que están separados por un aminoácido (**Figura 19**) (Johnson et al., 1996). La naturaleza de ese aminoácido ha sido empleada en la clasificación del tipo de MAPK. En las rutas de respuesta a estrés desde levaduras a mamíferos es común el motivo Thr-Gly-Tyr (Gustin et al., 1998).

Las levaduras presentan diferentes rutas mediadas por MAPK que responden a una amplia variedad de estímulos ambientales como el déficit de nutrientes, el estrés osmótico, el estrés oxidativo, el daño en pared, etc. (Gustin et al., 1998). Estas rutas de señalización mediadas por MAPK presentan una alta plasticidad y especificidad que viene determinada por la interacción física entre los distintos componentes de la ruta; la interacción mediada por proteínas adaptadoras que permiten la construcción de un macrocomplejo específico de la cascada de señalización; y la distribución/localización subcelular de los componentes de la ruta (Paul et al., 1997; Pérez & Cansado, 2010).

3.2.3.1 Ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK).

La ruta de señalización de MAPK de respuesta a estrés (SAPK, «*Stress Activated Protein Kinase*») presenta un papel clave en la detección, la transmisión y la respuesta adaptativa frente a diversos estímulos ambientales. En células de mamíferos, las principales vías de MAPK de respuesta a estrés están principalmente orquestadas por: la MAPK JNK, la cual se activa en respuesta a diversos estímulos, entre ellos, la inflamación, el estrés oxidativo, infecciones, el estrés osmótico, daño al ADN y alteraciones en el citoesqueleto (Abdelrahman et al., 2021); y, por otro lado, la MAPK p38, que juega un papel crucial frente al estrés oxidativo, estrés osmótico, exposición a la radiación ultravioleta o gamma, así como en la respuesta celular a citocinas y señales inflamatorias (Canovas & Nebreda, 2021; Schaeffer & Weber, 1999). Por su parte, en *S. cerevisiae*, la ruta SAPK está mediada por la MAPK Hog1 («*High Osmolarity Glycerol*») y está implicada principalmente en la respuesta adaptativa a condiciones de alta osmolaridad (Chen & Thorner, 2007; Gustin et al., 1998). En *S. pombe*, la vía SAPK está mediada por la MAPK Sty1 que es homóloga tanto a Hog1 de *S. cerevisiae* como a p38 de mamíferos (**Figura 19**) (Pérez & Cansado, 2010).

3.2.3.1.1 La ruta SAPK en *S. pombe*: composición y señalización.

En *S. pombe*, la ruta SAPK es el principal regulador de la respuesta general frente a estrés y de la progresión del ciclo celular en función de las señales ambientales (Shiozaki & Russell, 1995). Esta vía se activa en respuesta a numerosas condiciones adversas entre las que destaca el estrés osmótico, el choque térmico, el estrés oxidativo, el estrés por bajas temperaturas, la escasez de glucosa o de nitrógeno (Pérez & Cansado, 2010). En respuesta

a la escasez de glucosa se induce el metabolismo respiratorio, provocando un aumento en la producción de ROS, y por tanto, la activación de la señalización dependiente de la MAPK Sty1. Esta respuesta permite orquestar la defensa frente al estrés endógeno, la entrada en un estado de quiescencia y la extensión del CLS (Madrid et al., 2004; Zuin, Carmona, et al., 2010). De hecho, la relevancia de Sty1 como sensor nutricional es tal que durante el crecimiento de *S. pombe* en un medio mínimo sintético (EMM, «*Edinburgh Minimal Media*»), se produce un incremento en su nivel basal de activación (Zuin, Carmona, et al., 2010).

Actualmente, se desconoce la identidad de los sensores responsables de la detección y transmisión de la mayoría de los estímulos que activan la ruta SAPK en *S. pombe*, con la excepción del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno (H_2O_2). En presencia de H_2O_2 las histidinas quinasas (Mak2 y Mak3) se autofosforilan y promueven que la proteína Mpr1/Spy1 transfiera un grupo fosfato (a través de un residuo de histidina) al regulador de respuesta Mcs4 (**Figura 19**) (Aoyama et al., 2001; Aoyama et al., 2000; Nakamichi et al., 2002; Shieh et al., 1997). Mcs4 es esencial para la activación de la ruta SAPK en respuesta a cualquier tipo de estrés (**Figura 19**) (Shieh et al., 1997; Soto et al., 2002). De hecho, se ha demostrado que Mcs4 tiene una función dual, pues por un lado, es capaz de detectar la señalización proveniente del sistema de dos componentes (Mak2/Mak3-Mpr1); y por otro, es capaz de estabilizar el complejo heteromérico que se forma entre las MAP3K, cuya integridad es necesaria para interactuar con la MAP2K Wis1 (Morigasaki & Shiozaki, 2013). Una vez activa, Wis1 fosforila a Sty1 (MAPK) en los residuos adyacentes Thr171 y Tyr173 del motivo conservado -TGY- (**Figura 19**) (Pérez & Cansado, 2010). Una vez activa, Sty1 se acumula transitoriamente en el núcleo, adaptando la compleja maquinaria transcripcional para dar una respuesta específica a las señales extracelulares. La activación de Sty1 ocurre de forma transitoria, es más, la intensidad y cinética de la respuesta dependerá de la magnitud y naturaleza del estímulo inductor (Pérez & Cansado, 2010). Adicionalmente, la respuesta adaptativa inducida promoverá la expresión de genes necesarios para proteger a la célula frente a otros estímulos que puedan comprometer, posteriormente, la viabilidad celular (Zuin, Carmona, et al., 2010; Zuin, Castellano-Esteve, et al., 2010)

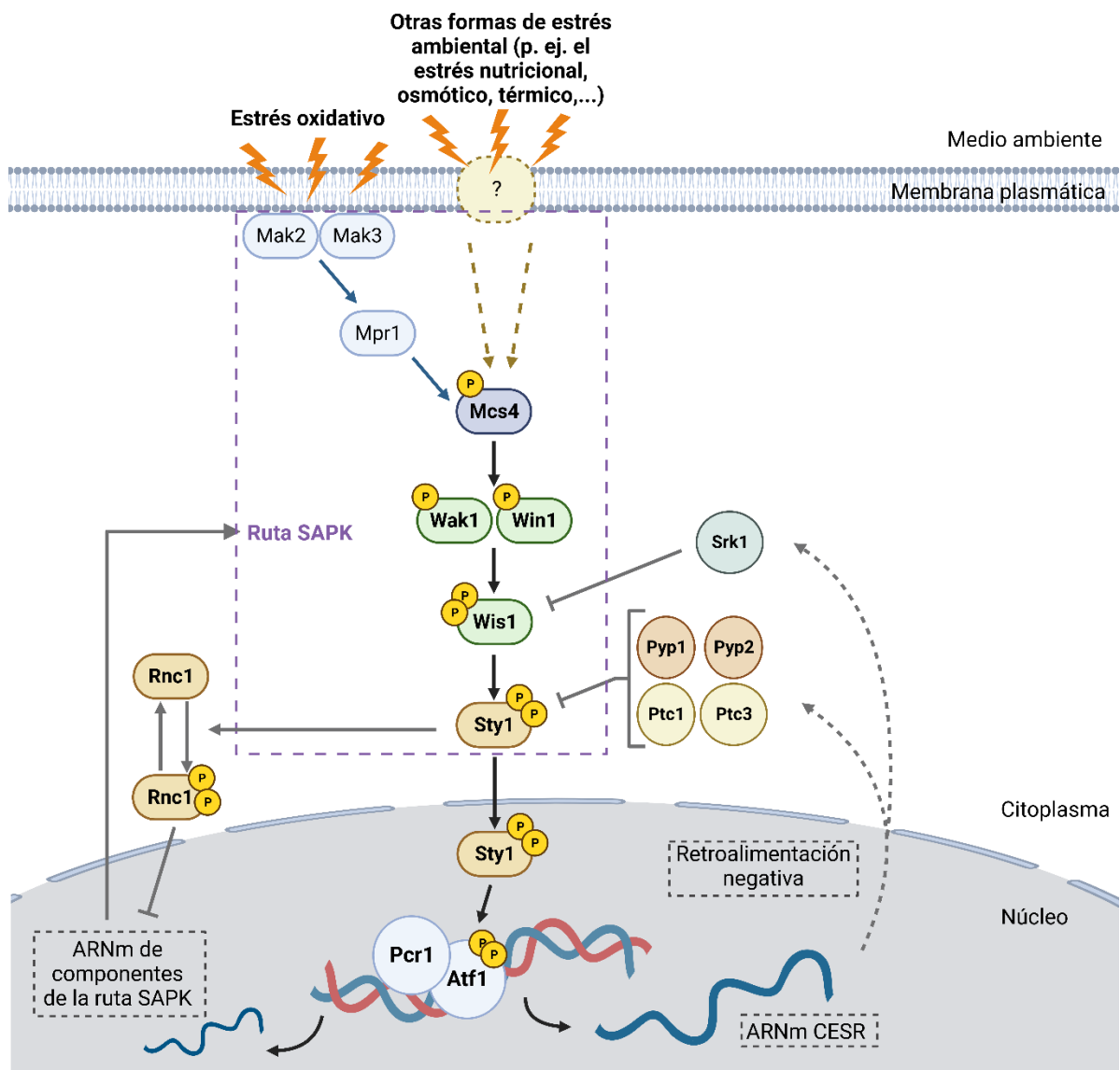


Figura 19. Ruta de señalización de MAPK de respuesta a estrés (SAPK). En *S. pombe* la ruta SAPK, cuyo elemento central es la MAPK Sty1 (ortóloga a p38 de mamíferos) está implicada en la regulación transcripcional y traduccional del metabolismo y la progresión por el ciclo celular en respuesta a estrés, activándose ante una amplia variedad de estímulos. La principal diana de Sty1 es el factor de transcripción Atf1 que regula la expresión de genes de respuesta a estrés (CESR). Adaptada de Marquina et al. 2022.

3.2.3.1.2 Reguladores negativos de la ruta SAPK.

La inactivación de esta ruta es esencial para garantizar el control de la respuesta frente al estrés agudo sin que se vea comprometida la viabilidad celular. Es por ello que la célula cuenta con diversos mecanismos de retroalimentación negativa donde la actividad de Sty1 contribuye a la inactivación de la ruta SAPK (Karin & Hunter, 1995):

- Las fosfatasas de las MAPK. Estas pueden presentar una alta especificidad por residuos de tirosina (fosfatasas de tirosina), de serina y treonina (fosfatasas de serina y Treonina) o tirosina y treonina (fosfatasas de especificidad dual) (Farooq & Zhou, 2004). En *S. pombe*, las fosfatasas Pyp1/2 (fosfatasas de tirosina), y Ptc1/3 (fosfatasas de serina y treonina) actúan sobre Sty1 desfosforilándola *in vivo* (Millar et al., 1995; Pérez & Cansado, 2010). Pyp1, es la principal responsable de desactivar a Sty1 en condiciones de crecimiento vegetativo, sin embargo, ante situaciones de estrés, la inactivación de Sty1 requiere de la acción colaborativa de Pyp1 y Pyp2 (Degols et al., 1996; Millar et al., 1995; Shiozaki & Russell, 1995). Además, en condiciones de estrés, la expresión de *pyp1⁺*, *pyp2⁺*, y *ptc1⁺* está regulada por la vía SAPK de manera dependiente del factor de transcripción Atf1, estableciendo un bucle de retroalimentación negativa (**Figura 19**) (Degols et al., 1996; Millar et al., 1995; Santo et al., 1996; Shiozaki & Russell, 1996).
- Rnc1, una proteína de unión a ARNm. En condiciones de estrés, Sty1 fosforila y activa a la proteína Rnc1 provocando la desestabilización de ARNm que codifica componentes de la vía SAPK como *wak1⁺*, *wis1⁺* y *pyp1/2⁺* (**Figura 19**) (Prieto-Ruiz et al., 2020).
- La proteína quinasa Srk1. Esta vía se ha descrito recientemente como un nuevo mecanismo de retroalimentación negativa de la vía SAPK. En ella la MAPKAP («MAPK-activated protein kinases») Srk1 regula negativamente la vía Sty1 a través de la fosforilación e inhibición de Wis1 (**Figura 19**) (Marquina et al., 2022).

3.2.3.1.3 Efectores de la ruta SAPK.

La ruta SAPK presenta diversos efectores implicados en la organización de la respuesta adaptativa frente a estímulos externos. La MAPK Sty1 se ha relacionado con la regulación del ciclo celular en condiciones de crecimiento vegetativo y en condiciones de estrés (Millar et al., 1995; Shiozaki & Russell, 1995). Es más, se ha propuesto que Sty1 es responsable de la fosforilación de diversos sustratos involucrados en el control de la mitosis y el tamaño celular como Srk1 (López-Avilés et al., 2005) y Plo1 (Petersen & Nurse, 2007). Además, en condiciones de estrés, Sty1 modula la actividad de diferentes proteínas quinasas (Cmk2,...), proteínas de unión a ARN (Csx1, Upf1, Cip1/2), factores implicados en la traducción de proteínas (eIF2 α , eEF2, eIF3a) y factores de transcripción (Atf1, Pap1,...) (Pérez & Cansado, 2010; Toone et al., 1998). Además, Sty1, independientemente de Atf1, es

capaz de regular la expresión de genes de respuesta a estrés (Sanso et al., 2008), entre los que se encuentran diversos genes *atg*⁺ implicados en la regulación de la autofagia en condiciones de estrés nutricional (Corral-Ramos et al., 2021).

3.2.3.1.3.1 Modulando la expresión génica en respuesta a estrés: el factor de transcripción Atf1 en *S. pombe*.

Una vez activa, la MAPK Sty1 se trasloca al núcleo donde se acumula y fosforila al factor de transcripción Atf1 (Lawrence et al., 2007; Shiozaki & Russell, 1995, 1996), regulando así la expresión génica de la CESR (Chen et al., 2003). La relevancia funcional de Atf1 en la adaptación celular de *S. pombe* es tan significativa que su delección, de forma análoga al mutante *sty1Δ*, provoca defectos en la diferenciación sexual, así como una sensibilidad moderada frente al estrés osmótico y oxidativo (Chen & Thorner, 2007).

Estructura y activación de Atf1.

Atf1 es un factor de transcripción que tiene una localización nuclear constitutiva (Salat-Canela et al., 2017; Sánchez-Mir et al., 2018). Respecto a su estructura, Atf1 contiene un dominio C-terminal de cremallera de leucina (bZIP) propio de la familia CREB/ATF (Chen et al., 2003; Sanso et al., 2008; Shiozaki & Russell, 1996). Los dominios bZIP se unen al ADN en motivos CRE («*cAMP-Response Element*») (Takeda et al., 1995).

Atf1 es fosforilado por Sty1 en once residuos, de los cuales solo seis (Ser152, Ser172, Thr204, Thr216, Ser226 y Thr249) son importantes para la actividad del factor de transcripción (Sánchez-Mir et al., 2018). Por otro lado, Sty1 fosforila a Atf1 en residuos no canónicos que son importantes para su activación y función (Sánchez-Mir et al., 2020).

La fosforilación de Atf1 no tiene un efecto sobre la capacidad de unión de Atf1 al ADN. Es más, se ha propuesto que Atf1 está constitutivamente unido a sus promotores, y que el papel principal de Sty1 en la respuesta transcripcional es fosforilar Atf1 permitiendo el reclutamiento de la maquinaria transcripcional como el complejo remodelador de la cromatina (SAGA) o a la ARN polimerasa II (Pol-II) (Salat-Canela et al., 2017; Sánchez-Mir et al., 2018), descartándose la implicación de Sty1 en la estabilización de Atf1 o en la fases del inicio y elongación de la transcripción (Salat-Canela et al., 2017; Sánchez-Mir et al., 2018).

Interacción de Atf1 con otros moduladores de la expresión génica.

En *S. pombe*, dependiendo del estímulo, la respuesta adaptativa puede requerir que Atf1 forme heterodímeros con Pcr1 o que forme homodímeros. Los fenotipos de las células que carecen de Atf1 o Pcr1 no son idénticos, teniendo ambos factores funciones superpuestas (Lawrence et al., 2007; Sanso et al., 2008). Por su parte, Atf1 es el sustrato directo de la MAPK Sty1 (Wilkinson et al., 1996); y respecto a Pcr1, se ha propuesto que su implicación en la transcripción de genes dependiente de Sty1 y Atf1 probablemente consista en el

reconocimiento de los sitios de unión de Atf1 en los promotores (**Figura 19**) (Salat-Canela et al., 2017). Mediante la formación de diferentes tipos de homodímeros o heterodímeros, se consigue una mayor maquinaria de regulación transcripcional que permite diversificar y aumentar las respuestas adaptativas que impliquen cambios en el patrón de expresión génica, así como facilitar la remodelación de la cromatina y el ensamblaje de la maquinaria de transcripción génica (Lawrence et al., 2007; Oda et al., 2015).

Por otro lado, se ha observado que, dependiendo del subconjunto de genes, pueden darse dos situaciones: (1) Atf1 puede encontrarse ya unido y la fosforilación solo es importante para promover el inicio de la transcripción; (2) Atf1 está interactuando moderadamente con los promotores de los genes en condiciones basales, y para regular la expresión génica en respuesta a estímulos externos requiere de la implicación de otro factor de transcripción (Sánchez-Mir et al., 2018). Atf1 en su estado no fosforilado interactúa con complejos que actúan como represores transcripcionales como Tup11 y Tup12 (Janoo et al., 2001), y también, recluta a proteínas con función represora de la transcripción como los factores de ensamblaje de heterocromatina Clr3, Clr4, Clr6 y Swi6 (Jia et al., 2004; Kim et al., 2004; Yamada et al., 2005). En condiciones de estrés, Atf1 activo consigue remodelar la cromatina y permitir el acceso de la maquinaria de expresión génica al favorecer el reclutamiento de moduladores de la cromatina como las subunidades SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetiltransferasa), Snf22, Hrp1, Hrp3 y Mts2 (Hirota et al., 2008; Yamada et al., 2004).

3.2.3.2 Regulación de la expresión de *fbp1⁺*: paradigma de la interconexión entre las vías de señalización AMPK, AMPc-PKA y SAPK.

La regulación transcripcional es fundamental para dar una respuesta adecuada a las fluctuaciones ambientales. Para una regulación precisa de la transcripción, las células han desarrollado sistemas reguladores en la arquitectura del genoma, incluida la estructura cromosómica (formación de bucles en la cromatina), la ubicación de las secuencias de unión del factor de transcripción, la transcripción del ARN no codificante (ncRNA), configuración de la cromatina (posicionamiento de nucleosomas y modificaciones de histonas) y el estado topológico de la doble hélice del ADN (Asada & Hirota, 2022; Asada et al., 2020; Senmatsu et al., 2019). Para comprender cómo estas arquitecturas de cromatina del genoma y sus reguladores establecen respuestas estrictas y específicas en la etapa de transcripción, el gen *fbp1⁺* de la *S. pombe* se ha analizado como un sistema modelo durante décadas.

Durante el crecimiento vegetativo en presencia de glucosa, en *S. pombe*, la ruta AMPc-PKA está activa promoviendo la inhibición del factor de transcripción Rst2 (**Figura 18**). Tras el déficit de glucosa, la ruta AMPc-PKA se inactiva, lo cual permite la traslocación de Rst2 al núcleo, así como su activación (Higuchi et al., 2002; Hirota et al., 2003). Paralelamente, se

produce la activación de la MAPK Sty1 que promueve la activación del factor de transcripción Atf1 responsable de CESR (**Figura 19**) (Chen et al., 2003; Madrid et al., 2004; Palabiyik et al., 2016). Adicionalmente, la AMPK Ssp2 fosforila a Scr1 promoviendo su inactivación y exclusión del núcleo, poniendo así fin a la CCR (**Figura 17**) (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012). En definitiva, se establece un nuevo patrón de expresión génica que está implicado en la regulación de procesos como la diferenciación sexual y el cambio diaúxico (Hirota et al., 2006; Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Vassiliadis et al., 2019). En estas condiciones se está promoviendo la expresión de genes con motivos STREP y CRE como es el caso de *fbp1⁺*, *rsv1⁺*, *ste11⁺* y *gld1⁺* (Hirota et al., 2003; Kunitomo et al., 2000; Matsuzawa et al., 2010; Neely & Hoffman, 2000).

3.2.3.3 Regulación de la autofagia dependiente de las rutas de señalización de MAPK.

En mamíferos, la ruta de MAPK de respuesta a estrés cuya quinasa central es p38 está implicada en la regulación de la autofagia en respuesta a diversos estímulos. Sin embargo, esta implicación parece ser dual, como regulador negativo (Hwang et al., 2017; Keil et al., 2013; Webber & Tooze, 2010; Wu & Cederbaum, 2013) y positivo (Ge et al., 2013; J. Liu, F. Chang, et al., 2015; Zhang et al., 2020), dependiendo de la naturaleza del estímulo, el tipo celular y la duración de la activación de la cascada de MAPK (Webber, 2010). En cuanto a la función de p38 en la regulación de la maquinaria central de la autofagia se ha descrito que en células embrionarias de riñón sometidas a inanición, la desactivación de p38 favorece la interacción de ATG9a con p38IP, impulsando el tráfico vesicular hacia el omegasoma. Sin embargo, con un aumento en la disponibilidad de aminoácidos, la reactivación de p38 sequestra p38IP, inhibiendo la autofagia al obstruir el tráfico vesicular de ATG9a (Webber & Tooze, 2010). Por otro lado, en fibroblastos de ratón se ha descrito que la fosforilación en Thr75 de Atg5 mediada por p38 reprime la activación de la autofagia en respuesta a la inanición de nutrientes esenciales (Keil et al., 2013).

En *S. cerevisiae*, el estrés nutricional promueve una contracción de la superficie celular, lo cual aumenta la susceptibilidad de la autofagia a otros estímulos ambientales como el estrés osmótico (Prick, Thumm, Haussinger, et al., 2006; Prick, Thumm, Kohrer, et al., 2006). Por otra parte, las vías de señalización mediadas por MAPK participan en la regulación de diversos tipos de autofagia selectiva; la MAPK Hog1 en la regulación de la mitofagia (Mao et al., 2011); la MAPK Slt2 (MAPK de la vía de integridad celular) tanto en la regulación de la mitofagia como de la pexofagia (Mao et al., 2011); y, finalmente, Bck1 (MAP3K de la vía de integridad celular) en la regulación de la pexofagia (Manjithaya et al., 2010). No obstante, ni Slt2 ni Hog1 estarían actuando directamente sobre la maquinaria central de la autofagia (Mao et al., 2011).

En el caso de *S. pombe*, se ha demostrado recientemente que la MAPK Sty1, cuando se activa en respuesta al ayuno de nitrógeno, está implicada en la regulación de la macroautofagia al modular la expresión de los genes *atg1⁺*, *atg4⁺*, *atg6⁺*, *atg9⁺* y *atg22⁺*; independientemente del factor de transcripción Atf1 (Corral-Ramos et al., 2021).

3.2.4 Otras vías de señalización implicadas en la regulación transcripcional y traduccional de la autofagia en levaduras.

En *S. cerevisiae*, la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa está regulada negativamente por la CCR (Adachi et al., 2017). La magnitud de la respuesta autofágica depende del tamaño de los autofagosomas que se están formando, lo que a su vez depende de la lipidación de Atg8 (Jin & Klionsky, 2014; Maruyama et al., 2021; Xie et al., 2008). Es por este motivo que, principalmente, la escasez nutricional, a través de las vías de señalización como TOR, actúa modulando la expresión de genes implicados en la lipidación de Atg8, como *atg1⁺*, *atg3⁺-5⁺*, *atg7⁺-8⁺*, *atg12⁺-14⁺* (Chan et al., 2001; Hardwick et al., 1999; Kirisako et al., 1999).

Por otro lado, la regulación traduccional tiene un fuerte impacto en la inducción de la autofagia tanto en células de mamíferos (Acevo-Rodríguez et al., 2020) como en levaduras (Barba-Aliaga & Alepuz, 2022; Jimenez-Saucedo et al., 2021; Shen et al., 2019). Por un lado, tanto en *S. pombe* como en *S. cerevisiae*, se ha observado que, tras el déficit de nutrientes, la fosforilación del factor de traducción eIF2 es necesaria para la traducción de genes Atg (Jimenez-Saucedo et al., 2021; Shen et al., 2019). Por su parte, en *S. cerevisiae*, se ha descrito que esa fosforilación de eIF2 es dependiente de Gcn2, y que es necesaria para promover la expresión de un activador transcripcional llamado Gcn4 que regula la expresión de varios genes Atg (Shen et al., 2019). Adicionalmente, en levaduras también se ha demostrado el papel del factor de traducción eIF5 en la regulación de la traducción de genes Atg, como Atg3 (Barba-Aliaga & Alepuz, 2022).

3.3 Implicaciones de la autofagia en la fisiología de las levaduras: reposición de recursos nitrogenados y homeostasis energética.

En los organismos eucariotas, la autofagia presenta una enorme relevancia fisiológica como respuesta adaptativa al estar implicada directamente en la homeostasis celular, la adaptación al estrés, suministro de nutrientes, la regulación del metabolismo, el desarrollo celular y la longevidad (Gross & Graef, 2020; Lin et al., 2021).

En *S. pombe*, la delección de la serina-proteasa Isp6 desencadena dificultades en la degradación de la carga autofágica entregada a la vacuola, defectos en la conjugación y en la esporulación, además de una pérdida de la viabilidad tras el ayuno de nitrógeno (Nakashima

et al., 2006). Estos defectos se observan también en los mutantes carentes de los genes Atg (Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009; Sun et al., 2013; Tsukada & Ohsumi, 1993). Curiosamente, la adición exógena de una fuente de nitrógeno revierte estos fenotipos, lo que sugiere que el principal papel de la autofagia es proveer de nitrógeno a la célula cuando éste no está disponible (Mukaiyama et al., 2009; Nakashima et al., 2006). De esta manera, la autofagia contribuye a la renovación del proteoma, la homeostasis de nucleótidos y la integridad del genoma nuclear y mitocondrial (Gross & Graef, 2020). Además, en *S. pombe* la autofagia es esencial para la progresión de la meiosis contribuyendo en el mantenimiento de la integridad de la membrana del núcleo, el nucléolo y la segregación cromosómica (Matsuhara & Yamamoto, 2016). Este papel puede ser debido a la liberación de recursos nitrogenados procedentes de la autofagia y la consiguiente reactivación de TORC1. En estas condiciones, TORC1 modula la localización y/o actividad de la aurora quinasa Ark1, evitando su acumulación excesiva en el centrómero y en el huso, lo cual afectaría a la progresión de la meiosis (Matsuhara & Yamamoto, 2016).

3.3.1 Interrelación entre la respiración mitocondrial y la autofagia: una vía por descubrir en *S. pombe*.

Mantener la homeostasis implica el equilibrio entre degradación y síntesis, presentando esta última un coste energético elevado durante la adaptación, donde hay que renovar el proteoma, transcriptoma y lipidoma celular (Mukaiyama et al., 2009). En vista de esto, ante la escasez nutricional, es sorprendente que la autofagia sea capaz de mantener el estatus energético celular necesario (Rabinowitz & White, 2010). Por un lado, la degradación autofágica promueve la liberación de aminoácidos y nucleósidos. En el caso de los nucleósidos se pueden degradar a ribosas-fosfato mediante la vía PPP rindiendo finalmente glucosa. Además, el rendimiento energético producido por el metabolismo de 5 moléculas de ribosa-fosfato es equivalente al de cinco glucosas-fosfato (Lin et al., 2021). Respecto al metabolismo energético de los aminoácidos y lípidos, este es exclusivamente a través de la fosforilación oxidativa; y su incorporación al metabolismo es más diversificada entrando a nivel del piruvato, el ciclo de Krebs y la acetil-CoA (Lin et al., 2021; Rabinowitz & White, 2010).

En *S. cerevisiae*, se ha descrito que la respiración es necesaria para la inducción de la autofagia, y además que la correcta progresión de la autofagia es esencial para sustentar el metabolismo respiratorio (May et al., 2020; Yi et al., 2017). Sin embargo, en *S. pombe*, no existen evidencias que señalen al metabolismo respiratorio como regulador clave de la autofagia ante la escasez de glucosa o viceversa.

3.3.1.1 Regulación de la respiración mitocondrial dependiente de la autofagia en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa depende de un complejo compuesto por Snf1-Mec1-Atg1 localizado en la superficie de la mitocondria, necesario para mantener la respiración mitocondrial (**Figura 20**) (Yi et al., 2017). Mec1/ATR este es un miembro de la familia de proteínas quinasas relacionadas con la PI3K que desempeña un papel central en la repuesta al daño en ADN (Friedel et al., 2009). Sorprendentemente, ningún otro componente de esta vía de reparación del ADN salvo Mec1 participa en la regulación de la autofagia inducida por un déficit de glucosa. Es más, recientemente, se ha descrito que Mec1 es necesario para favorecer la localización de Atg13 en PAS (Yao et al., 2023). Respecto al complejo Snf1-Mec1-Atg1, Mec1 es reclutado a la mitocondria por Ggc1, una proteína implicada en el mantenimiento del genoma mitocondrial (Vozza et al., 2004). En la superficie de la mitocondria, Mec1 es fosforilado por la AMPK, favoreciendo su interacción con Atg1 y Atg13 independientemente del PAS (**Figura 20**) (Yi et al., 2017).

Por otra parte, se ha demostrado que la activación de la autofagia contribuye al mantenimiento de la respiración al sustentar la síntesis de proteínas mitocondriales. En levaduras, la mayoría de las proteínas mitocondriales inducidas en respuesta a un déficit de glucosa están codificadas en el ADN nuclear, no obstante, un número reducido están codificadas por el genoma mitocondrial (May et al., 2020). La expresión de estas proteínas está regulada por el factor de iniciación mitocondrial 2 (mIF2), el cual tiene un papel fundamental reclutando el ARNm y el ARNt^{Met} de inicio a los ribosomas mitocondriales. Para mejorar la eficacia de la traducción mitocondrial ese ARNt^{Met} de inicio debe ser modificado mediante una formilación rindiendo ARNt^{fMet} necesario. En esa modificación está implicada la serina proveniente de la autofagia, la cual es transformada en la mitocondria en el grupo formilo (**Figura 20**) (May et al., 2020)

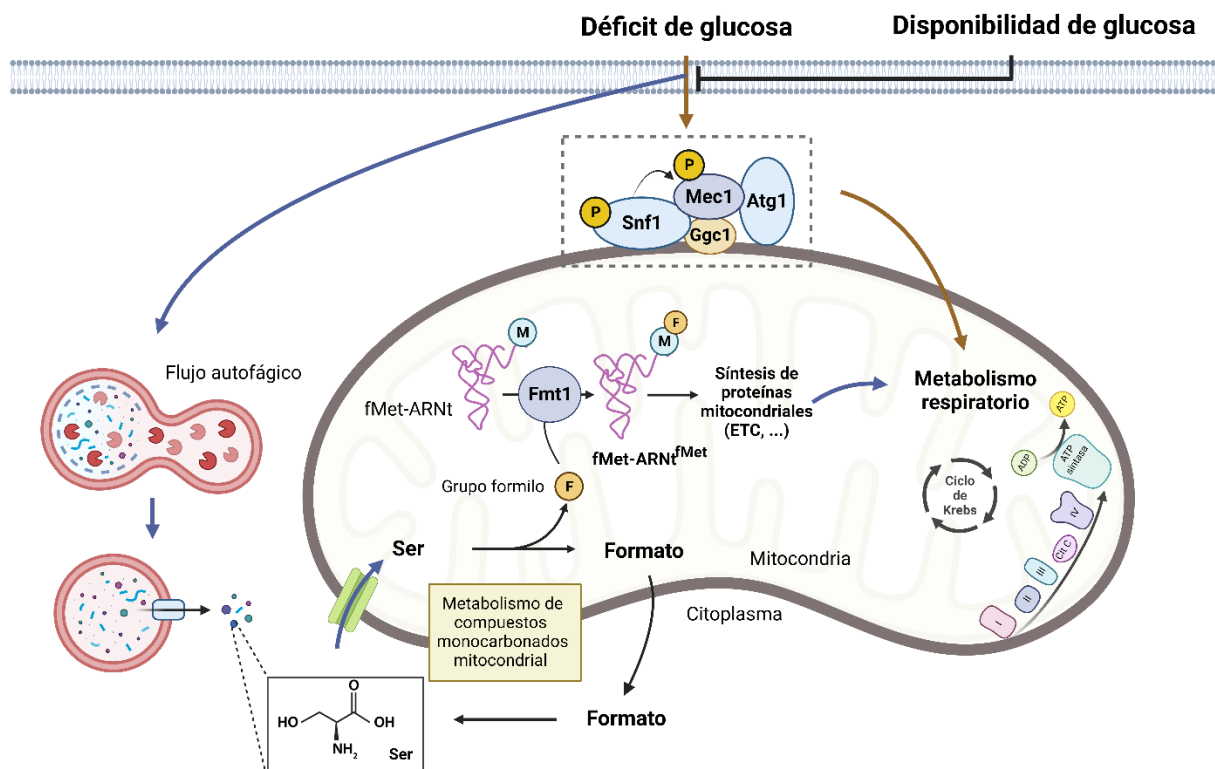


Figura 20. Regulación de la respiración mitocondrial dependiente de la autofagia en *S. cerevisiae*. Por un lado (Vía verde), observamos la formación de un módulo compuesto por Snf1-Mec1-Atg1 en la superficie mitocondrial. Por otro lado (Vía azul), observamos el papel de la serina en el metabolismo de compuestos monocarbonados mitocondrial y su conexión con la síntesis de proteínas mitocondriales. En *S. cerevisiae*, ambas rutas son necesarias para conseguir el establecimiento de forma adecuada del metabolismo respiratorio en respuesta a la escasez de glucosa. Adaptada de Yi et al., 2017 y May et al., 2020.

Objetivos

La adaptación a los cambios ambientales que afectan a la calidad y disponibilidad de nutrientes es crucial para la supervivencia celular. La glucosa, la fuente de carbono y energía más comúnmente usada por los seres vivos, es metabolizada a través de la fermentación o la respiración mitocondrial; siendo esta última mucho más eficaz respecto a la energía y biomasa generada por molécula de glucosa. En las levaduras Crabtree positivas como *Schizosaccharomyces pombe*, el exceso de glucosa promueve el metabolismo fermentativo y reduce de forma significativa el metabolismo mitocondrial (Malina et al., 2021), al reprimir la expresión de genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas a través de un mecanismo conservado evolutivamente llamado represión catabólica por fuente de carbono (CCR) (Adnan et al., 2017). En *S. pombe*, tras el déficit de glucosa, se produce la transición de un metabolismo fermentativo al crecimiento respiratorio, el cambio diaúxico (Oda et al., 2015). Uno de los principales reguladores de este cambio es la AMPK Ssp2 que regula la exclusión nuclear del represor transcripcional Scr1 (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012; Tanaka et al., 1998). A su vez, tras el déficit de glucosa, la señalización de la ruta AMPc-PKA se inhibe permitiendo la activación del factor de transcripción Rst2 (Higuchi et al., 2002); y, paralelamente, se induce la señalización dependiente de la ruta SAPK que activa al factor de transcripción Atf1 promoviendo la expresión de los genes CESR (Asada et al., 2015; Zuin, Carmona, et al., 2010). Por lo tanto, en estas condiciones, se promueve la expresión de genes implicados el cambio diaúxico, como aquellos implicados en el metabolismo de fuentes de carbono no fermentables como el glicerol (Klein et al., 2013; Malecki & Bähler, 2016; Matsuzawa et al., 2010). Curiosamente, *S. pombe* es incapaz de crecer en un medio donde el glicerol o el etanol sean la única fuente de carbono disponible (de Jong-Gubbels et al., 1996; Galdieri et al., 2010; Tsai et al., 1987). Sin embargo, la adición de cantidades mínimas de glucosa o etanol a un medio con glicerol revierte ese fenotipo, indicando que la asimilación de glicerol viene determinada por fuentes de carbono adicionales (Tsai et al., 1987).

En los seres vivos eucariotas, una de las respuestas fisiológicas más importantes que se activa durante la escasez de nutrientes esenciales es la macroautofagia, promoviendo la degradación de componentes celulares y obteniendo precursores nutricionales que puedan ser empleados para mantener la viabilidad celular en estas condiciones (Rabinowitz & White, 2010). En *S. cerevisiae*, la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa está regulada directa e indirectamente por las vías de señalización que detectan y responden frente a las variaciones en su disponibilidad como las vías AMPK, TOR, AMPc-PKA y Sch9 (Alao et al., 2023; Wen & Klionsky, 2016; Yorimitsu et al., 2007). Además, en *S. cerevisiae* la respiración mitocondrial es crucial para la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de aminoácidos y glucosa (Graef & Nunnari, 2011).

Aunque *S. cerevisiae* y *S. pombe* comparten muchos componentes en la maquinaria de autofagia, su organización funcional difiere en numerosos aspectos. Además, a diferencia de *S. cerevisiae* donde la regulación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa ha sido ampliamente estudiada, en *S. pombe* poco se sabe sobre la regulación de la macroautofagia ante este estímulo. Es más, hasta la fecha, únicamente se ha descrito la implicación de TORC1, TORC2 y de la MAPK Sty1 en la regulación de la autofagia en respuesta a la inanición de nitrógeno (Corral-Ramos et al., 2021). De hecho, en trabajos previos se ha descrito que la inanición completa de glucosa resulta en un bloqueo completo de la macroautofagia en *S. pombe* (Mukaiyama et al., 2010). Sorprendentemente, resultados recientes muestran que la autofagia puede inducirse cuando las células de *S. pombe* crecen en condiciones limitantes de glucosa donde se ha transitado eficazmente del metabolismo fermentativo al metabolismo respiratorio. No obstante, en ese estudio señalan que la inducción de la autofagia observada, podría deberse a una degradación selectiva de las mitocondrias dañadas por la intensa actividad oxidativa derivada del metabolismo respiratorio, no estableciendo ninguna relación entre el crecimiento respiratorio y la inducción de la autofagia (Corral-Ramos et al., 2021).

En base a todos estos antecedentes, la presente Tesis Doctoral se ha enfocado en el análisis exhaustivo de la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa en *S. pombe*, así como la naturaleza de las vías de señalización que modulan esa señal nutricional a la maquinaria de la autofagia. Es por ello que el objetivo fundamental es:

- 1- Estudio de las vías de señalización mediadas por la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA), la ruta de proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la vía de MAPK activadas por estrés (SAPK) como reguladores de la inducción de la autofagia ante un déficit de glucosa en *Schizosaccharomyces pombe*.
- 2- Estudio de la relevancia biológica del cambio diaúxico, el uso de fuentes de carbono alternativas como el glicerol y el metabolismo respiratorio mitocondrial en la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa en *S. pombe*.

Las evidencias obtenidas tras el desarrollo de este objetivo han sido publicadas en el siguiente artículo:

- Pérez-Díaz, A. J., Vázquez-Marín, B., Vicente-Soler, J., Prieto-Ruiz, F., Soto, T., Franco, A., Cansado, J., & Madrid, M. (2022). cAMP-Protein kinase A and stress-activated MAP kinase signaling mediate transcriptional control of autophagy in fission yeast during glucose limitation or starvation. *Autophagy*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.212520>

Materiales y Métodos

1. Microorganismos empleados en este trabajo.

1.1 Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*.

Las cepas de *S. pombe* empleadas en este trabajo se encuentran recopiladas en la **Tabla 2**. Varias de las cepas mutantes se obtuvieron de la colección de cepas de *S. pombe* con deleciones sencillas en genes no esenciales comercializada por la empresa Bioneer (Kim et al., 2010) o del *Yeast Genetic Resource Center* (YGRC) de Japón (<https://yeast.nig.ac.jp/yeast/>). El resto fueron construidas mediante el método de transformación estándar de *S. pombe* (Ver **Apartado 5.2 de Materiales y Métodos**) o tras selección aleatoria de esporas obtenidas tras el cruce genético de los parentales adecuados en medio SPA (Ver **Apartado 5.1 de Materiales y Métodos**).

Tabla 2. Tabla de cepas de *S. pombe* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Fuente
AI030	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 leu1-32 ura4-D18</i>	Sun L-L, et al. (2013)
AJ311	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 atg1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ083	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 atg1::natMX6 pka1:: kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ312	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 atg11::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AI035	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 atg4::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AI036	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 atg5::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ340	<i>h⁺ atg1-HA:kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ163	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 nde1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ26	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rip1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ27	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 qcr2::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ166	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 atp11::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
BV1100	<i>h⁺ rad3::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
AJ478	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rad3::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ974	<i>h⁺ ssp2::ura4 (prototrofa) leu1-32 ura4-D18</i>	Sergio Moreno.
AJ1004	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 ssp2::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ1006	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 ssp2::ura4 pka1::NatMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ1178	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 scr1::NatMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ306	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 git3::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ361	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 gpa2::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ308	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 cyr1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ332	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ956	<i>h[?] atg1-HA:KanMX6 pka1:: NatMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AI005	<i>h⁺CFP-atg8: leu1 cgs1:kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ176	<i>h⁺ CFP-atg8:leu1 rst2:: natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ335	<i>h⁺ CFP-atg8:leu1 pka1:: kanMX6 rst2::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
BV1343	<i>h⁻ rst2-3HA:NatMX6 (prototrofa)</i>	YGRC (FY32541) (JB729)

BV1344	<i>h⁻ rst2.M3-3HA:NatMX6 (ura4⁺) leu1-32</i>	YGRC (FY32542)(JB 731)
AJ021	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ023	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:natMX6 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ287	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 rst2.M3-3HA:natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ953	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2.M3-3HA:natMX6 cgs1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ084	<i>h⁺ CFP-atg8:leu1 sty1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
BV981	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 sty1::natMX6 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ168	<i>h⁻ atf1::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	YGRC (FY20910)(MY 6940)
AJ194	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 atf1::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ208	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 pka1::natMX6 atf1::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ910	<i>h⁻ gld1-HA:hphMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ944	<i>h[?] gld1-HA:hphMX6 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ941	<i>h[?] gld1-HA:hphMX6 atf1:ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ942	<i>h[?] gld1-HA:hphMX6 rst2:: NatMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ1012	<i>h[?] gld1-HA:hphMX6 atf1:ura4 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ1017	<i>h[?] gld1-HA:hphMX6 rst2:: natMX6 pka1::KANMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ829	<i>h⁺ gld1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
AJ919	<i>h⁺ dak1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
AJ920	<i>h⁺ dak2::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
AJ879	<i>h[?] CFP-atg8:leu gld1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ882	<i>h[?] CFP-atg8:leu gld1::kanMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ959	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 dak1::kanMX6 dak2::hphMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ965	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 dak1::kanMX6 dak2::hphMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ488	<i>h⁺ isp6::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
AJ734	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:kanMX6 lsp6::hphMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ751	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2-3HA: kanMX6 lsp6:: hphMX6 sty1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ767	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2-3HA: kanMX6 lsp6::hphMX6 atf1::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ737	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:kanMX6 lsp6::hphMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ755	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:kanMX6 lsp6:: hphMX6 sty1::kanMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ741	<i>h[?] CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:kanMX6 lsp6:: hphMX6 atf1::ura4 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
MM1	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Colección Laboratorio
AJ118	<i>h⁺ Rst2:: natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ216	<i>h⁺ sty1:: kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Colección Laboratorio
AJ31	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo

AJ43	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 rst2-3HA:kanMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ34	<i>h⁻ CFP-atg8:leu1 rst2(S292A)-3HA:kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ717	<i>h² CFP-atg8:leu1 rst2(S292A)-3HA:kanMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
BV050	<i>h² ksg1-208 leu1-32 ura4-D18</i>	Colección Laboratorio
BV973	<i>h² CFP-atg8:leu1 ksg1-208 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
BV945	<i>h⁻ pka1-13myc:KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Colección Laboratorio
BV1026	<i>h² CFP-atg8:leu1 Pka1-13myc:KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
BV925	<i>h⁹⁰ pka1(T356A)-13myc:KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Colección Laboratorio
BV1032	<i>h² CFP-atg8:leu1 pka1(T356A)-13myc:KanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ164	<i>h² CFP-atg8:leu1 nde1::natMX6 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ709	<i>h² CFP-atg8:leu1 rip1::natMX6 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ713	<i>h² CFP-atg8:leu1 qcr2::natMX6 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ167	<i>h² CFP-atg8:leu1 atp11::natMX6 pka1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ861	<i>h⁺ gut2::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
AJ834	<i>h⁺ gpd1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
BV1087	<i>h⁺ fbp1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Bioneer
AJ864	<i>h² CFP-atg8:leu1 gut2::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ865	<i>h² CFP-atg8:leu1 gut2::kanMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ869	<i>h² CFP-atg8:leu1 gpd1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ870	<i>h² CFP-atg8:leu1 gpd1::kanMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ827	<i>h² CFP-atg8:leu1 fbp1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ828	<i>h² CFP-atg8:leu1 fbp1::kanMX6 pka1::natMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
AJ32	<i>h² CFP-atg8:leu1 rst2(S245A)-3HA:kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo

Las interrupciones genéticas se realizaron reemplazando la ORF («*Open Reading Frame*») del gen de interés con el casete de G418 (kanR; *Calbiochem*, 345810), nourseotricina (NAT; *Jena Bioscience*, AB-102L) o higromicina B (*Roche*, 10843555001); (Hentges et al., 2005; Sato et al., 2005), mediante técnicas de recombinación homóloga basada en PCR (Bähler et al., 1998); empleando los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 3**

Respecto a la construcción de las fusiones genómicas de proteínas de interés en esta investigación como Rst2, Gld1 y Atg1, a epítomos como GFP («*Green Fluorescent Protein*») o HA («*Hemagglutinin*»); se emplearon los plásmidos pFA6a-GFP-kanMX6 y pFA6a-3HA-kanMX6 para construir las versiones genómicas marcadas en C-terminal. Para ello se amplificó mediante PCR fragmentos de ADN que codifican el epítomo y el correspondiente marcador de selección (Bähler et al., 1998). Las cepas que expresan diferentes fusiones genómicas en los diferentes fondos genéticos se construyeron mediante transformación o tras selección aleatoria de esporas obtenidas tras el cruce genético de los parentales adecuados en medio SPA (Composición del Medio en la **Tabla 4**).

Tabla 3. Tabla de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia
Atg1-del-R	ATTCATAACAAAATTTAGACTCAGAGCTCAGCTCATACAATATGCGAATTTGTT CAATAAAAGGGCGAAATCGTCGGTGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Atg1-del-F	TTGCCAACTCCCATGCTATCAAAGTGAGTATAAAGGCAGCTAAAACCCCTTACA CCTGTCTTATCGTGAACCGAAGCTGTCGGATCCCCGGGTTAATTA
Atg1-C-tag-R	ATTCATAACAAAATTTAGACTCAGAGCTCAGCTCATACAATATGCGAATTTGTT CAATAAAAGGGCGAAATCGTCGGTGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Atg1-C-tag-F	AATCGAAACAAATCCAGGCTAATGTAGCCAACAAAGTAACAGAAAGTGTTCG GAAAATAACACTTGCCCCCAATCTTGCTCGGATCCCCGGGTTAATTA
Pka1-Del-5'	GGGTACTTTATAAGTTTGACGAACGATTAGTGAATTTAATTATCTTTTCGTGT ATAAACGCTATTTACATTTGACTCCGGATCCCCGGGTTAATTA
Pka1-Del-3'	AACGTCACTTGCATTGCACTAAATCAAATAGGCATTCGTTGCTCAACGCTTTA AGGCAATAGTACAATGAATCAATAAGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Rst2-Del-F	TTTGAATCCTGATTGCAATCACTTTCAAGCTTTATTTCCCTTCATATCTTTTATT TTAACACATATTCTTCTTTTGAACGGATCCCCGGGTTAATTA
Rst2-Del-R	CAGATCAATCCTTAAATTAATTAATAAACCGAATCAAAGCTAGTTGATTTTTGTT TAAAAAACTAAAAGATGCATTTTCATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Rad3del-F	TAATTCTATTGAGATATTTTACTTACAATCGTCTTTTATAAATGCTCAAGAC TTTGAACGCGCGTGTTCGTTTTAACGGATCCCCGGGTTAATTA
Rad3del-R	ACAAGAAATGAACAACCTCAGCGAGAATTCCTCATCGGATTAATAAATAAATA TCTTCGATTCAAATCATAAGTTTAAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Rst2-tag-F	GGTCTTCAGACTTTAATTTACTGATCCGAAACTTCCGGTTTGCTTACAGATA ATAATCGGAATCAACCGCCCTCATTTCGGATCCCCGGGTTAATTA
Rst2-tag-R	AGTTGATTTTTGTTTTAAAAAACTAAAAGATGCATTTCAATTAAGAAACAAATAG TATAAATATAAAGATATGAAAAAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Qcr2(CIII)-DEL-F	CAACTCCCACCTCTGTTGCAAGCAGCGTAATTTAGTAAACACCGATTAAAAAC TTTTTCGAAAAGTCTAAATAGGTAATCGGATCCCCGGGTTAATTA
Qcr2(CIII)-DEL-R	ACATCATCCTAAGCTTATGGTGTATAAAAAAGTTTTCAAAGAAAGATTTTCGATA AAAAAAAAGATTTGTAGAGAAGTATCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Rip1(CII)-DEL-R	GCTAAAGAAGAAGTAAAAGAGAGGGGAGAAAAAGGGAGGAAATCAGCT AGGACAAAAGTTTTTGAGCGAAATAAATTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Rip1(CII)-DEL-R	AGAGGCAGCTTGACGTTTTCTTCCCAACCGCTACCCACCGAATATTTCAACAA CCTGTTTCTCTTTAAAACGTTGTAACCGGATCCCCGGGTTAATTA
Scr1-Del-F	AACCTACCCTTACTCGTGCTATTTTTTCTTCTTTTTTACTTCTCCTTCTTT GCCGTGCTCTGTTTACTTTCGTCGGATCCCCGGGTTAATTA
Scr1-Del-R	AAATGTATAACACACAACCAAGGTGTTTAGATGGTTTTAAGGAAGCAAAGGTA ACTAGCGTTTACAGCGCAAATATTGGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Gld1-C-TAG-F	TCACAAAAATGGCAAGAACAACCTGGGATGGACCGAGCGTTTTAGATTACCC CCTTCTCGTCATAGTCTCAGTTGACCGACATTCATCCACGGATCCCCGGGT TAATTA
Gld1-C-TAG-R	TTAATGATCAATGAAGAAAACCCGCTTAAAAATTTCTTTTCTTTTGGATTTA CTAGGGAAAATTGAAGCTGGGGATAAAAAAATGCGAATTCGAGCTCGTTTAA AC

1.2 Cepas de *Escherichia coli*.

En este trabajo, con el fin de mantener y amplificar diferentes plásmidos se empleó como cepa hospedadora, la cepa DH5 α de *E. coli* (Hanahan, 1983) cuyo genotipo es el siguiente: *Sup E44 Δ lac U 169 (\emptyset 80 lacZ Δ M15) hsdR17 rec Δ 1 end Δ 1 gyr Δ 96 thi-1 rel Δ 1*.

2. Condiciones de crecimiento.

2.1 Medios de cultivo empleados para el crecimiento de *S. pombe*.

S. pombe se cultivó de forma rutinaria en agitación orbital (280 r.p.m) a 28 °C en los siguientes medios:

- **Medio YES** («*Yeast Extract with Supplements*»). Medio de cultivo nutricionalmente rico empleado rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe* (**Tabla 4**) (Moreno et al., 1991).

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo de uso rutinario para el crecimiento en condiciones de fermentación o respiración, y conjugación de *S. pombe* (Adaptada de Moreno et al., 1991).

	Medio rico (YES) 2% glucosa	YES + 3% Glicerol 3% glicerol	YES 3% Gly + 0.05% Glucosa 3% Glicerol + 0.5% glucosa.	Medio de esporulación SPA
Pre-autoclavado				
Estracto de levadura	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%
Glucosa	2%	x	0.5%	55.5 mM
Adenina	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	x
Agar*	2%	2%	2%	3%
KH ₂ PO ₄	x	x	x	7.3 mM
Uracilo	x	x	x	200 mg/L
Histidina	x	x	x	200 mg/L
Leucina	x	x	x	200 mg/L
Glicerol	x	24 mL 100% + 26 mL (de agua)	24 mL de Gly 100% + 26 mL (de agua)	x
Agua	1000 mL	950 mL	950 mL	480 mL
Post-autoclavado				
Stock CaCl ₂ 50x	x	x	x	20 mL
Stock Vitaminas 1000x	x	x	x	1mL
Stock Minerales 10.000x	x	x	x	x
Stock CaCl ₂ 50x	500 gr/L			
Stock Vitaminas 1000x	4.20 mM de ácido pantoténico, 81.2 mM de ácido nicotínico, 55.5 mM de inositol y 40.8 µg de biotina			
*	Prescindir en caso de medio líquido			

- **EMM** («*Edinburgh Minimal Medium*»). Medio de cultivo pobre nutricionalmente (químicamente definido) empleado para el crecimiento vegetativo de *S. pombe* en los experimentos de déficit nutricional. Este medio se suplementa con determinados aminoácidos o bases nitrogenadas en aquellos casos en los que la cepa lo requiera para su crecimiento (auxotrofías) (**Tabla 5**) (Moreno et al., 1991).

2.2 Tratamientos de estrés nutricional en *S. pombe*.

El cultivo de *S. pombe* en condiciones de desrepresión se realiza rutinariamente en medio con glicerol 3% más trazas de glucosa. En estos medios, el glicerol se emplea como una fuente de carbono respirable y no fermentable, que además actúa como agente osmoprotector evitando que las células detecten cualquier otra perturbación en el medio distinta al estrés nutricional (estrés osmótico). Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en medio EMM con 7% de glucosa hasta fase exponencial temprana ($DO_{600} = 0,5-0,8$). Acto seguido, las células se recogieron por filtración y fueron lavadas con el medio de cultivo correspondiente al tratamiento de estrés nutricional a ensayar (ayuno o limitación de glucosa). Finalmente, esas células fueron transferidas a un medio de cultivo que se indica a continuación:

- Ayuno completo de glucosa. Se realizó la transferencia de las células desde EMM con 7% de glucosa a un medio osmóticamente equilibrado, EMM con 3% de glicerol. En caso de que el experimento así lo indique, este medio fue suplementado con fármacos inhibidores de la ETC.
- Limitación de glucosa. Se realizó la transferencia de las células desde EMM con 7% de glucosa a un medio osmóticamente equilibrado, EMM con 3% de glicerol suplementado con una concentración limitante de glucosa (0.01-0.2%). Salvo que se indique lo contrario, por defecto el EMM empleado contiene una concentración final de glucosa del 0.04%. En caso de que el experimento así lo indique, estos medios fueron suplementados con fármacos inhibidores de la ETC.
- Ayuno de nitrógeno. Se realizó la transferencia de las células desde un medio EMM con 2% en glucosa a un medio que carece de cualquier fuente nitrogenada (EMM-N₂). En caso de que el experimento así lo indique, este medio fue suplementado con fármacos inhibidores de la ETC.
- Ayuno de glucosa (Sorbitol). Se realizó la transferencia de las células desde EMM con 7% de glucosa a un medio osmóticamente equilibrado con sorbitol, EMM con 7% de sorbitol. En este caso, *S. pombe* no es capaz de metabolizar la fuente de carbono disponible, actuando meramente como un agente osmoprotector.

Tabla 5. Composición de los medios mínimos (EMM) utilizados rutinariamente para los experimentos de estrés nutricional en *S. pombe* (Adaptada de Moreno et al., 1991).

	EMM 2% glucosa	EMM 7% glucosa	Ayuno completo de Glucosa EMM 3% glicerol	Limitación de Glucosa EMM 3% Glicerol + X% glucosa.	Ayuno de Nitrógeno EMM 2% Glucosa Sin Nitrógeno.	Ayuno de Glucosa (Sorbitol) EMM 7% Sorbitol
Pre-autoclavado						
Phtalato de potasio	14.7 mM	14.7 mM	14.7 mM	14.7 mM	14.7 mM	14.7 mM
Na ₂ HPO ₄	15.5 mM	15.5 mM	15.5 mM	15.5 mM	15.5 mM	15.5 mM
NH ₄ Cl	93.5 mM	93.5 mM	93.5 mM	93.5 mM	x	93.5 mM
Adenina	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	x	200 mg/L
Uracilo	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	x	200 mg/L
Histidina	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	x	200 mg/L
Leucina	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	x	200 mg/L
Glicerol	x	x	24 mL	x	x	x
Agua	480 mL	480 mL	956 mL	480 mL	480 mL	480 mL
Post-autoclavado						
Stock Sales 50 X	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Stock Vitaminas 1000x	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Stock Minerales 10.000x	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Glucosa	Botella separada al 2% de glucosa (20 gr en 500 mL H ₂ O). Añadir en campana	Botella separada al 7% de glucosa (70 gr en 500 mL H ₂ O). Añadir en campana.	x	Botella separada al X% de glucosa (X gr en 500 mL H ₂ O). Añadir 24 mL de glicerol. Añadir en campana.	Botella separada al 2% de glucosa (20 gr en 500 mL H ₂ O). Añadir en campana.	Botella separada al 7% de glucosa (70 gr en 500 mL H ₂ O). Añadir en campana.
Stock Sales 50x	0.26 MgCl ₂ hexa-hidratado, CaCl ₂ di-hidratado 4.99 mM, KCl 0.67 M, Na ₂ SO ₄ 14.1 mM					
Stock Vitaminas 1000x	4.20 mM de ácido pantoténico, 81.2 mM de ácido nicotínico, 55.5 mM de inositol y 40.8 µg de biotina					
Stock Minerales 10.000x	80.9 mM de ácido bórico, 23.7 mM de MnSO ₄ , 13.9 mM ZnSO ₄ hepta-hidratado, 7.40 mM de FeCl ₂ hexa-hidratado, 2.47 mM de ácido molibdicco, 6.02 mM de KI, 1.60 mM de CuSO ₄ penta-hidratado y 47.6 mM de ácido cítrico					

Finalmente, en los experimentos de estrés nutricional realizados con inhibidores de ETC (**Figura 8**), las células se cultivaron hasta fase exponencial y se pretrataron con: 25.6 µg/ml de rotenona (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-203242), 0.5 µM de AA (*Sigma-Aldrich*, A8674), 2 Mm de TTF2A (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-251801), 10 µM de Oligomicina (*Sigma-Aldrich*, 495455), o 500 µM de DCCD (*Sigma-Aldrich*, D80002) durante 1 hora. Posteriormente, se recuperaron las células por filtración y se resuspendieron en los medios indicados anteriormente en presencia de las drogas correspondientes.

2.3 Medio de cultivo empleados para el crecimiento de *E. coli*.

- **Medio LB** (Luria-Bertani): Este medio de cultivo se emplea rutinariamente para el cultivo de *E. coli*. Este medio está compuesto por triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%. Previamente a la esterilización en el autoclave, el pH se ajusta entre 7.2-7.4.

3. Condiciones de cultivo de los microorganismos, estimación del crecimiento y recuento celular.

3.1 Condiciones de cultivo para el crecimiento de *S. pombe*.

Los cultivos de *S. pombe* se realizaron en cultivo líquido en matraces Erlenmeyer, manteniendo en 1/3 la relación entre volumen del medio y la capacidad total del matraz. El cultivo se efectuó en los medios indicados (YES o EMM), a 28°C y en incubadores con agitación orbital. Respecto a los cultivos en medio sólidos se incubaron en estufas a una temperatura establecida, que osciló entre 25 y 37°C. En los experimentos realizados con células en fase exponencial de crecimiento, las muestras se obtuvieron cuando los valores de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) estaban comprendidos entre 0,5 y 0,8. En cualquier otro caso, las muestras se obtuvieron a la densidad óptica indicada en el experimento.

Respecto a los experimentos con el mutante termosensibles *ksg1-208* (BV973), las células se cultivaron en EMM con 7% de glucosa hasta una densidad óptica de 0.5 a 28°C (temperatura permisiva). Acto seguido, las células se recuperaron por filtración, y se transfirieron a EMM con 3% glicerol, y se incubaron a 36.5°C.

3.2 Estimación del crecimiento y recuento *S. pombe*.

El crecimiento de *S. pombe* en medio líquido se siguió mediante turbidimetría midiendo la densidad óptica a 600 nm. Para efectuar la medición se lleva a cabo una dilución 1/10 de la muestra y posteriormente se multiplica el resultado por el correspondiente factor de dilución. Respecto al recuento de células totales de *S. pombe*, este se efectuó mediante conteo directo en una cámara o hemocitómetro Neubauer en un microscopio óptico. La concentración celular se expresó como el número de células por mililitro (N) según la fórmula:

$$N = 2.5 \cdot 10^5 \cdot \bar{x} \cdot d$$

En ella, \bar{x} es la media del número de microorganismos determinado en los recuentos efectuados por cuadrícula de la cámara, y **d** es el factor de dilución.

3.3 Condiciones de cultivo para el crecimiento de *E. coli*.

Los cultivos líquidos de *E. coli* se incubaron en medio LB con agitación orbital (250 r.p.m.) a una temperatura de 37°C. Por su parte, los cultivos sólidos se incuban en estufas a 37°C.

4. Ensayos de viabilidad celular.

4.1 Ensayos de crecimiento en gota.

La viabilidad celular de las cepas de *S. pombe* en presencia de fuente de carbono no fermentables (glicerol), no metabolizables (sorbitol) y en presencia de agentes que bloquea el correcto funcionamiento de la ETC (Oligomicina, DCCD, Rotenona y Antimicina A) se realizó mediante la técnica de las diluciones seriadas en gota. Para realizar esta técnica, se tomó una alícuota en fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 0,8$) de cada cultivo de las cepas de *S. pombe* empleadas en el experimento, y se determinó el número de células por mililitro (N) (Ver **Apartado 3.2 de Materiales y Métodos**).

Una vez ajustada la concentración celular de dicha alícuota a 10^7 células/mL, se realizaron diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 células/mL en una placa multipocillos, y se depositaron gotas de 10 μ L de cada dilución sobre placas los medios adecuados (por duplicado). Los resultados se registraron mediante la toma de fotografías tras 3 días de incubación a 28°C, salvo que en el experimento se especifique lo contrario. Los medios de cultivo empleados son los descritos en la **Tabla 4**.

4.2 Medición de la viabilidad celular

La cepa control (AI30) de *S. pombe* se cultivó en EMM con 7% glucosa hasta una DO_{600} final de 0.5. Las células se recuperaron por filtración, se incubaron durante los tiempos indicados en el mismo medio sin glucosa (EMM con 3% glicerol). La viabilidad celular en los diferentes tiempos se midió contando las UFC de las diluciones apropiadas en placas YES incubadas durante 3 días a 30°C. Se expresa como porcentaje de UFC y se calculó de la siguiente manera:

$$UFC (\%) = \frac{UFC \text{ escasez de glucosa}}{UFC \text{ crecimiento en glucosa}} \cdot 100$$

4.3 Medición del envejecimiento cronológico (CLS).

El efecto provocado por el estrés nutricional sobre la supervivencia celular se evaluó mediante un análisis comparativo de supervivencia celular de distintas cepas mutantes con la cepa control. Para ellos las células de *S. pombe* se cultivaron en un medio EMM con 7% glucosa hasta un A_{600} final de 0.5. Posteriormente, las células se recuperaron por filtración, y se incubaron en: (i) EMM con 0.08% de glucosa más 7% de sorbitol durante 6 h (con preadaptación); (ii) EMM con 7% de sorbitol durante 7 días (sin preadaptación). Una vez transcurridas las 6h, las células preadaptadas se recuperaron por filtración y se resuspendieron durante 7 días en el mismo medio sin glucosa (EMM con 7% sorbitol). La viabilidad celular se midió después de este período de incubación de 7 días contando las unidades formadoras de colonias (UFC) de las diluciones apropiadas en placas YES incubadas durante 3 días a 30 °C. El porcentaje de viabilidad se expresa como la relación entre el número de colonias formadas y el número total de células sembradas. Se realizaron tres experimentos independientes.

5. Construcción de cepas.

5.1 Conjugación y aislamiento de ascosporas al azar.

La inducción de la conjugación entre dos cepas de *S. pombe* requiere del uso de estirpes heterotálicas sexualmente opuestas (h^+ o h^-). Estas cepas se incubaron durante 24 horas en placas de medio YES a 28°C. Seguidamente, se inoculó aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa y se mezcló en un pequeño volumen de agua estéril (25 μ L). Posteriormente, esta suspensión celular se depositó en una placa de medio SPA (**Tabla 4**). Los zigotos se originan tras 12-20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas después de 1-2 días de incubación a 25°C.

La obtención de ascosporas y purificación sigue el protocolo descrito por Kelly y colaboradores (Kelly et al., 1993). Mediante este método se efectúa la digestión de las paredes de células vegetativas y ascas por acción de la glucosidasa, induciendo su lisis osmótica sin afectar a la capacidad germinativa de las ascosporas. Para ello se procedió a resuspender la mezcla de conjugación (masa celular de la placa SPA a 25°C) en agua estéril. Esta suspensión celular se trató con 2050 unidades de glucosidasa (*Sigma*) durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, esta suspensión de ascosporas se centrifugó a 3.000 r.p.m durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante y se procedió al lavado y resuspensión de las ascosporas con agua estéril. Se realizaron diluciones seriadas para obtener entre 100 y 1.000 esporas por placa, y se sembraron por extensión en placas de YES. Seguidamente, las placas fueron incubadas durante 3 días a 25°C- 28°C, según fenotipos de termosensibilidad. Las cepas con el genotipo deseado fueron seleccionadas tras su réplica en diferentes medios selectivos.

5.2 Transformación de *S. pombe*.

La transformación de *S. pombe* se realizó de acuerdo al siguiente protocolo que ha sido adaptado a partir del procedimiento propuesto por Moreno y colaboradores (Moreno et al., 1991). Primeramente, se estableció un cultivo de 50 mL en medio YES de la cepa de *S. pombe* a transformar. Una vez alcanzó una DO_{600nm} entre 0.8 y 1.2, las células se recogieron y se centrifugaron a 1.800 r.p.m. durante 4 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con 20 mL de agua destilada, se resuspendieron y se volvieron a centrifugar a 1.800 r.p.m. durante 4 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, se lavaron en 20 mL de AcLi/TE 1X (Acetato de litio 0,1M, Tris-HCl 10 mM pH 7,6 y EDTA 1mM) y se volvieron a centrifugar a 1.800 r.p.m. durante 4 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendieron las células en 100 μ L de AcLi/Te 1X, y se añadieron 20 μ L de ADN de salmón (10 mg/mL) previamente hervido, así como 10 μ L del ADN para transformar (plásmido o productos de PCR). Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 260 μ L de AcLi/TE/PEG₄₀₀₀ 40% y la muestra se incubó durante 40 minutos a 30°C. Una vez finalizada la incubación, se añadió a cada muestra 43 μ L de DMSO, y las alícuotas se transfirieron a un baño/termobloque a 42°C durante 5 minutos. Finalmente, se recogieron las muestras, y se procedió al lavado de las células mediante centrifugación a 1.800 rpm durante 2 minutos y resuspensión posterior en 500 μ L de agua destilada estéril. Las transformaciones se sembraron en medio rico y se incubaron durante 1 día a temperatura permisiva según el genotipo (25-30°C). Una vez crecidas, las placas fueron replicadas en medio selectivo con antibióticos o EMM sin el aminoácido adecuado, y se incubaron durante 4 o 5 días.

5.2.1 Mutagénesis dirigida.

Para construir el plásmido molde pTA-Rst2:HA se empleó el marco de lectura abierto de *rst2*⁺ marcado con HA en el extremo C-terminal con sus secuencias reguladoras. Se amplificó el casete kanMX6 y la UTR 3' mediante PCR usando ADN genómico de células Rst2-3HA como molde; el oligonucleótido 5', Rst2-HA-FWD, que hibrida de 1025 a 1000 pb aguas arriba del codón de inicio *rst2*⁺; el oligonucleótido 3', Rst2-HA-REV, que hibrida de 580 a 605 pb aguas abajo del codón de STOP de *rst2*⁺ (**Tabla 6**). El fragmento de PCR se clonó en el plásmido pCR2.1 utilizando el kit de clonación TOPO TA (*Thermo Fisher Scientific*, 451641) y se confirmó mediante secuenciación. Los plásmidos pTA-Rst2^{S292A}-HA y pTA-Rst2^{S245A}-HA se obtuvieron mediante PCR mutagénica dirigida en un solo paso utilizando el plásmido pTA-Rst2:HA como molde y los correspondientes pares de oligonucleótidos mutagénicos Rst2-S292A-FWD/Rst2-S292A-REV y Rst2-S245A-FWD/Rst2-S245A-REV (**Tabla 6**).

Los plásmidos anteriores se usaron como moldes de PCR para obtener los fragmentos de ADN correspondientes, que se transformaron en la cepa control (MM1). A continuación, se verificó la correcta integración mediante PCR e inmunoensayo Western-blot. La incorporación de los residuos mutagenizados se confirmó mediante secuenciación.

Tabla 6. Tabla de oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida de Rst2.

Nombre	Secuencia
Rst2-HA-Amplicon-F	CAGATCATTGAAGATTATTGCACTA
Rst2-HA-Amplicon-R	TTTCGCTAATAACTCCTTATTTGAC
Rst2-S245A-R	CGATAGTACAAAGGAGCGTCGGGTCCATAAGGC
Rst2-S245A-F	GCCTTATGGACCCGACGCTCCTTTGTACTATCG
Rst2-S292A-R	TGAAACGGCGTTAGGTGCATACGGCATTCTAGC
Rst2-S292A-F	GCTAGAATGCCGTATGCACCTAACGCCGTTTCA

5.3 Transformación de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo se transformaron mediante choque térmico tras acondicionamiento previo. En este tipo de transformación, el acondicionamiento previo implica un tratamiento químico con sales como CaCl₂ o MgCl₂. El objetivo de este tratamiento es neutralizar con sal las cargas negativas de la bicapa de fosfolípidos, permitiendo que el ADN externo se aproxime a la superficie celular. De este modo se está modificando la permeabilidad de la membrana y la pared celular, facilitando que las células de *E. coli* sean competentes para absorber el ADN extraño (Panja et al., 2006). En todos los casos el marcador de selección de los transformantes fue la resistencia a ampicilina. Una vez sometidas las células al choque térmico, se sembraron en placas de LB más ampicilina.

6. Técnicas de Manipulación de Ácidos nucleicos.

6.1 Obtención y manipulación de muestras de ADN.

6.1.1 Obtención de ADN genómico de *S. pombe*.

El ADN genómico de *S. pombe* se obtuvo siguiendo el protocolo de Hoffman y colaboradores (Hoffman & Winston, 1987). Inicialmente, se cultivaron las células en 10 mL de YES hasta alcanzar una DO_{600nm} elevada. Posteriormente, se obtuvo la fracción celular mediante centrifugación a 5000 g durante 2 minutos. Las células fueron lavadas 2 veces con agua destilada y finalmente se resuspendieron en 200 μ L de tampón T (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8) y 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Seguidamente, las células se rompieron mediante 60 segundos de disrupción mecánica en el vórtex empleando perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro), y posterior, enfriamiento en hielo durante 60 segundos. Una vez lisadas, se adicionaron 0.2 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8; y se centrifugaron los extractos celulares durante 5 minutos a 10.000 g. Se retiró el sobrenadante a un tubo estéril y se le añadió 1 mL de etanol absoluto. Seguidamente, se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 g. El precipitado obtenido fue resuspendido en 400 μ L de tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8, al que se le añadió 3 μ L de RNasa (10 mg/mL) y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente, se procedió a la precipitación del ADN. Para ello se añadieron 10 μ L de acetato de amonio a 4M y 1 mL de etanol absoluto. La muestra se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 50 μ L de agua MiliQ.

6.1.2 Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.

La obtención del ADN plasmídico de *E. coli* se efectuó mediante el uso de un kit comercial (*High Pure Plasmid Isolation Kit*) siguiendo las instrucciones del fabricante (*Roche*).

6.1.3 Medición de la concentración de ADN total.

La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 220-280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 100 siguiendo las instrucciones del fabricante (*Thermo Scientific*). Se utilizó la relación 260/280 como indicador del grado de pureza de la preparación (>1.6 en el caso de ADN).

6.1.4 Digestión del ADN con enzimas de restricción.

La digestión con enzimas de restricción permitió la caracterización de fragmentos de ADN, y fue necesario para la construcción de moléculas recombinantes. El tratamiento con las enzimas de restricción siguió las instrucciones específicas recomendadas por los proveedores (*Roche, Fermentas, Amersham Life Science y Gibco BRL*), así como, las indicaciones generales descritas por Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989).

6.1.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa, y purificación de ADN a partir de los geles.

Los fragmentos de ADN de diferentes tamaños se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa preparados a la concentración adecuada para el tamaño del fragmento a separar. El marcador de peso molecular empleado corresponde con los fragmentos producto de la digestión del genoma del virus lambda (λ) con HindIII (*Fermentas*). La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 65-90 V. El tampón empleado fue TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). Como agente empleado para la detección del ADN mediante iluminación con luz ultravioleta, se empleó Bromuro de Etidio (1 μ g/mL).

Finalmente, el aislamiento y purificación de fragmentos específicos de ADN a partir del gel de agarosa se realizó haciendo uso del kit *UltraClean PCR Clean-up DNA Purification Kit (MoBio laboratorios Inc.)* siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.1.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR («*Polymerase Chain Reaction*») se realizaron en un termociclador Eppendorf (modelo *Mastercycler Personal*). Cada reacción de PCR contenía 100 pmoles de cada oligonucleótido sintético (*Roche*), 20 ng de ADN molde, 20 pmoles de una mezcla de desoxirribonucleótidos y 1,5 unidades de *Expand High Fidelity Polymerase (Roche Molecular Biochemicals)*, en 50 μ L de solución tamponada. Las condiciones de amplificación variaron según el tamaño del ADN a amplificar y la temperatura de hibridación (T_m) de los oligonucleótidos. Las etapas de la amplificación constaban de una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos; y de 35 ciclos de una desnaturalización-hibridación-polimerización (95°C, 30 segundos), hibridación (T_m , oscila entre 45-65°C, 30-90 segundos) y polimerización (72°C, 1-4 minutos); polimerización final (72°C, 2 min) y conservación (4°C).

6.1.6.1 Comprobación del genotipo de los transformantes mediante PCR.

Se diseñaron oligonucleótidos que hibridan en una posición específica de la secuencia del marcador (resistencia a antibiótico,...) y en las secuencias adyacentes a la ORF del gen marcado o delecionado. Se prepararon tubos con reacciones de PCR sin la polimerasa y a cada uno se le añadió ADN obtenido de la colonia correspondiente a analizar. Finalmente, se añadió la polimerasa. Estas muestras se sometieron a las condiciones estándar de amplificación descritas previamente, y el producto se analizó en geles de agarosa.

6.2 Análisis de Expresión génica.

6.2.1 Experimentos de micromatrices (*Microarray*) y análisis de enriquecimiento.

Se cultivaron células de las estirpes *control*, *pka1Δ*, *pka1Δ rst2Δ* y *pka1Δ atf1Δ* de *S. pombe* hasta fase exponencial en EMM con 7% en glucosa. Se realizaron dos réplicas biológicas para cada cepa. Se recogieron los pellets celulares y se congelaron a -80°C. Posteriormente, se procedió a la extracción del ARN con el mini kit RNeasy (*Qiagen*), según las instrucciones del fabricante, y se comprobó la cantidad y calidad del ARN con un Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies*).

El ADNc se sintetizó a partir de 100 ng de ARN total de cada muestra utilizando el kit de reactivos GeneChip 3' IVT PLUS (*Affymetrix, ThermoFisher Scientific*). La cantidad y la calidad de los intermedios de ADNc y ARNc se verificaron con Nanodrop 2000 (*ThermoFisher Scientific*) y Bioanalyzer 2100. Se purificaron los ARNc diana marcados y se añadieron 5 µg de ARNc biotinilado fragmentado en la mezcla de hibridación mediante el kit GeneChip Hybridization, Wash and Stain (*Affymetrix, ThermoFisher Scientific*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las preparaciones resultantes se hibridaron con las micromatrices GeneChip Yeast Genome 2.0 (*Affymetrix, ThermoFisher Scientific*), que incluyen 5021 sondas de prueba con 11 pares de oligonucleótidos correspondientes a 5031 genes presentes en el genoma de *S. pombe*.

Después de escanear, los datos de las micromatrices se procesaron utilizando Affymetrix Expression Command Console (*Affymetrix, ThermoFisher Scientific*), y todas las muestras pasaron los criterios de calidad. El análisis de datos se realizó con RMA (*Robust Multiarray Average*). Los valores de intensidad de señal sin procesar se corrigieron en un segundo plano, calculándose el log₂. Posteriormente, se normalizaron en cuantiles para obtener un valor de intensidad individual para cada conjunto de sondas con el software Partek Genomics Suite y Partek Pathways (*Partek Incorporated, St. Louis, EE. UU.*).

Para el análisis estadístico de los datos, se aplicó una prueba de ANOVA (T-student) con un umbral restrictivo en el valor de p ajustado por $FDR \leq 0.05$ y $FCh \geq 2$. Los datos completos de las micromatrices están disponibles en ArrayExpress (número de acceso E-MTAB-11624).

Finalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento GO de las proteínas codificadas por los 145 genes sobreexpresados en las células *pka1Δ*, cuya expresión es dependiente de los factores de transcripción Rst2 y Atf1. Este análisis se realizó utilizando la herramienta de análisis de enriquecimiento del sistema de clasificación PANTHER (Mi et al., 2013), con respecto al proceso biológico GO como se indica en PomBase (Lock et al., 2019).

6.2.2 Síntesis de ADNc y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RtqPCR).

El ARN total fue extraído y purificado a partir de las cepas mutantes y control de *S. pombe* utilizando un mini kit RNeasy (*Qiagen*), en presencia de SUPERase RNase Inhibitor (*Invitrogen*). Posteriormente, se cuantificó la cantidad y calidad del ARN con un espectrofotómetro Nanodrop 100 (*Thermo Scientific*). Seguidamente, se retrotranscribió 1 μ g de RNA total a ADNc con el Kit de síntesis de cDNA iScript (*BioRad*). Las qPCR se realizaron con iTaq Universal SYBR Green Supermix (*BioRad*) y un sistema de PCR en tiempo real CFX96 (*BioRad, EE.UU*). La expresión génica relativa se cuantificó con base en el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se normalizó usando la expresión del RNA 28S en cada muestra. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes $\pm SD$. La comparación estadística entre las cepas y los valores P se analizaron mediante *one - way* ANOVA.

7. Técnicas de Manipulación de Proteínas.

7.1 Obtención de extractos celulares y preparación de muestras.

Una vez realizados los tratamientos indicados, las células (10 ml de cultivo) se recogieron por centrifugación (3.200 r.p.m) a 4°C, y se resuspendieron una vez en tampón STOP frío. Tras una nueva centrifugación, la masa celular obtenida se congeló inmediatamente a - 80°C para su procesamiento posterior. Los extractos celulares se obtuvieron, a menos que se indique lo contrario, tras precipitación con ácido tricloroacético (TCA [Sigma]) tal y como se describe en (Grallert & Hagan, 2017). Para ello se resuspendieron las células en 200 μ L de TCA 20%, y se transfirieron a un tubo de rotura de fondo cónico relleno con 500 mg de esferas de vidrio (0,4 mm, Sigma). La rotura celular se llevó a cabo por disrupción mecánica empleando el sistema Fast-Prep. Posteriormente, se añadió a los lisados 400 μ L de TCA 5%. Seguidamente se perforó el fondo cónico con ayuda de agujas hipodérmicas, y mediante centrifugación durante 3 minutos a 3.000 r.p.m. se obtuvo el lisado

celular. A continuación, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de TCA 0.01%. Se le añadió a cada muestra 70 µl de tampón de carga para geles de poliacrilamida-SDS (Sambrook et al., 1998) y 30 µl de Tris-HCl 1M pH 8.0. La muestra se hirvió a 100°C durante 5 minutos y se centrifugó 1 minuto a 13.000 r.p.m. En el caso de muestras donde interesa el estado de fosforilación de la proteína (Rst2 y Atg1), la muestra se sometió a un tratamiento térmico de 70°C durante 10 minutos y, finalmente, se centrifugó 1 minuto a 13.000 r.p.m.

Respecto a la detección de la fosforilación de Rst2 en S292, las muestras se obtuvieron mediante el uso de un tampón con urea tal y como se describe en (Prieto-Ruiz et al., 2020).

7.2 Electroforesis en SDS-PAGE.

La separación de las proteínas se efectuó según diferencias de tamaño mediante la electroforesis de proteínas en geles verticales de poliacrilamida-SDS en condiciones desnaturalizantes (Brunelle & Green, 2014). Los geles de poliacrilamida se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida (30% y 0,8% respectivamente; *Protogel, National Diagnostics*). Se emplearon geles de una concentración del 6-12% para el gel de resolución (según el tamaño de la proteína de interés), y del 5% para el concentrador. Para esta técnica se utilizaron dos equipos, cuyo uso dependía del número de muestras a analizar: el sistema *Mini Protean III* para geles de 1,5 mm de grosor; y el sistema *Criterion*, ambos de Bio-Rad. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante que varió según el sistema utilizado entre 90-120 V (*Mini Protean*) y 120 V (*Criterion*). Como marcador de peso molecular se empleó el suministrado Sigma (*Prestained Molecular Weight Marker*) que permite resolver proteínas en un rango de entre 26 y 180 kDa. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a un soporte sólido de nitrocelulosa para ser detectadas con anticuerpos específicos mediante la técnica de Western (Towbin et al., 1979).

A continuación, se detallan las concentraciones de acrilamida empleadas para la separación de las proteínas objeto de análisis en este trabajo:

- Ensayo de procesamiento CFP-Atg8. Se emplearon geles del 12% de acrilamida.
- Control de carga total (Cdc2). Se emplearon geles del 12% de acrilamida.
- Cambio de movilidad de Atg1. Se emplearon geles del 10% de acrilamida.
- Detección de Gld1. Se emplearon geles del 10% de acrilamida.
- Cambio de movilidad de Rst2. Se emplearon geles del 8% de acrilamida.
- Detección de la fosforilación de Rst2 *in vivo* en S292. Se emplearon geles del 8% de acrilamida.

7.3 Western blot.

7.3.1 Transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Amersham*, 10600003) empleando un equipo Transblot Turbo Transfer System (*Biorad*), y tiras de papel de filtro Whatman 3MM Chr empapadas en tampones de elaboración propia: Tampón ánodo (Tris-HCl 0,3 M y metanol 10%, pH 10,4) y tampón cátodo (Tris-HCl 25 mM, ácido aminocaproico 40 mM y metanol 20%, pH 9,4). La transferencia se realizó a temperatura ambiente y aplicando una intensidad de corriente constante de 300 mA durante 60 minutos.

7.3.2 Inmunodetección de las proteínas fijadas en membranas de nitrocelulosa.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se trataron con una solución de bloqueo (suspensión de tampón específico del anticuerpo a usar, y leche (o albumina)) (**Tabla 7**) durante, al menos, 1 hora. Transcurrido ese tiempo, la solución de bloqueo se eliminó mediante 3 lavados de 10 minutos con el tampón específico del anticuerpo, y las membranas se incubaron, durante toda la noche a 4°C en presencia del anticuerpo primario a la concentración indicada (**Tabla 7**). En función del anticuerpo primario empleado, se utilizaron distintos tampones, concentraciones y anticuerpos secundarios (**Tabla 7**).

Tabla 7. Tabla resumen de los anticuerpos y condiciones empleados en este trabajo

Anticuerpo Primario	Bloqueo	Lavados	Anticuerpo secundario
Anti – GFP 1:1000 PBST 0.05%	PBST 0.05% + leche	PBST 0.05%	Anti – IgG:HRP (mouse) 1:2000 PBST 0.05% + leche
Anti – Cdc2/Cdk1 1:5000 PBST 0.05%	PBST 0.05% + leche	PBST 0.05%	Anti – IgG:HRP (rabbit) 1:2000 PBST 0.05% + leche
Anti – HA:HRP 1:1500 PBST 0.05% + leche	PBST 0.05% + leche	PBST 0.05%	x
Anti – fosfoRst2.S292 1:3000 TBST 0.1% + Albumina	TBST 0.1% + Leche	TBST 0.1%	Anti – IgG:HRP (rabbit) 1:2000 PBST 0.05% + leche

Al día siguiente, tras eliminar el exceso de anticuerpo con 3 lavados de 10 minutos, las membranas se incubaron durante 60 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario. Finalmente, el exceso de anticuerpo secundario no unido se eliminó mediante otros 3 lavados con el tampón adecuado.

A continuación, se resumen los anticuerpos empleados en los principales experimentos realizados en el presente trabajo:

- Proteólisis de CFP-Atg8: La detección se efectuó haciendo uso de un anticuerpo anti-GFP policlonal de ratón (*Roche*). Paralelamente, se usó anti-PSTAIR monoclonal de conejo (anti-Cdc2; *Sigma-Aldrich*) para el control de carga. Las bandas inmunorreactivas se revelaron con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con HRP (*Abcam*) y anti-conejo conjugado con HRP (*Abcam*) (**Tabla 7**).
- Fosforilación de Rst2 en S292: La detección se efectuó con un anticuerpo antifosfopoliclonal producido por inmunización de conejos con un fosfopéptido sintético correspondiente a los residuos que rodean a Ser292 de Rst2 (*GenScript*) (**Tabla 7**).
- Niveles de proteína Rst2, Atg1 y Gld1: La detección requirió del empleo un anticuerpo anti-HA conjugado con HRP monoclonal de rata (3F10 [*Roche*]). Se usó anti-PSTAIR monoclonal de conejo (anti-Cdc2 [*Sigma-Aldrich*]) para el control de carga. Las bandas inmunorreactivas se revelaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP anti-conejo (*Abcam*) (**Tabla 7**).

Para el revelado de la señal se utilizó el sistema *Amersham ECL Western Blotting Detection* (*GE Healthcare*) que permite la detección de la actividad peroxidasa asociada al anticuerpo secundario mediante quimioluminiscencia. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron al exponer películas *Hyperfilm ECL* (*GE Healthcare*) sobre las membranas durante tiempos variables en casetes de autorradiografía.

7.4 Tratamiento con fosfatasa lambda (Desfosforilación).

En el ensayo de desfosforilación de Rst2, se trataron 10 µg de extractos desnaturalizados con urea total con 40 U de proteína λ fosfatasa (*New England Biolabs*, P0753S), en presencia/ausencia de ortovanadato de sodio 5 mM durante 50 min a 30°C, como se describe en (Prieto-Ruiz et al., 2020). La electroforesis de proteínas se realizó en geles de SDS-PAGE al 8 % y se detectaron los niveles totales de Rst2-HA y la fosforilación en S292 como se indicó anteriormente.

7.5 Cuantificación y reproducibilidad de Western blot.

La cuantificación densitométrica de las señales de Western blot a partir de imágenes digitales .jpg de 16 bits de se realizó utilizando Fiji (*ImageJ*) (Schneider et al., 2012). Las bandas deseadas más el fondo se dibujaron como rectángulos y se obtuvo un gráfico de perfil para cada banda (picos). El porcentaje de proteólisis de CFP-Atg8 se estimó en cada punto de tiempo determinando la relación de señal de la banda de CFP-Atg8 con respecto a la banda de CFP libre y se normalizó con anti-Cdc2 (control de carga interno).

Dependiendo del experimento, los datos de cuantificación mostrados pueden corresponder a experimentos representativos, o aquellos realizados como duplicados o triplicados biológicos. Se muestran las unidades relativas medias \pm SD y/o los resultados representativos. Los valores de *P* se analizaron mediante *one - way* ANOVA. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron con Prism 6.0 (*GraphPad Software*).

8. Medición del consumo de oxígeno.

Para los experimentos de consumo de oxígeno, las células se cultivaron en EMM con 7% de glucosa hasta un A_{600} final de 0.4. Las mediciones se realizaron con un oxímetro HI7640714 (*Hanna Instruments*), y las lecturas se registraron cada minuto durante 15 min, según el protocolo descrito en (Zuin et al., 2008)

9. Microscopía.

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio Leica DM4000B equipado con una cámara Leica DC400F y se procesaron con el software IM500 Image Manager. El porcentaje de células donde se observa el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS se determinó en cada punto de tiempo (número de células \geq 300) de al menos tres experimentos independientes y se representó como media \pm SD. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron utilizando GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software*). La comparación estadística entre grupos se realizó mediante *one - way* ANOVA.

Resultados

1. El déficit de glucosa es un estímulo proautofágico en *Schizosaccharomyces pombe*.

Hasta la fecha, la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa en *S. pombe* es un tema controvertido. Por un lado, el ayuno completo de glucosa ha sido descartado como un estímulo proautofágico (Mukaiyama et al., 2010). Por otro lado, recientemente, se ha descrito que *S. pombe* es capaz de inducir la autofagia en respuesta a concentraciones limitantes en la disponibilidad de glucosa (Corral-Ramos et al., 2021). En vista de estos resultados, en esta Tesis Doctoral se ha abordado el análisis de las peculiaridades de la respuesta adaptativa de *S. pombe* frente a la escasez de glucosa y su relación con la activación de la autofagia. Para ello, el primer objetivo fue determinar las concentraciones de glucosa que promueven la inducción de la autofagia como respuesta adaptativa.

En los experimentos realizados se cuantificó y monitorizó el flujo autofágico desde el ensamblaje del autofagosoma hasta su posterior transferencia a la vacuola y degradación (Klionsky et al., 2021). Para ello, se validó el método de procesamiento de CFP-Atg8, ampliamente utilizado en la investigación de la autofagia en *S. pombe*, en nuestras condiciones experimentales (Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009; Mukaiyama et al., 2010). Atg8 es una proteína esencial en el proceso autofágico, reclutada a la región de ensamblaje del fagóforo (PAS) al inducirse la autofagia. Esta se sitúa en ambas caras del fagóforo en expansión, participando en la curvatura de la membrana y en el reclutamiento de otras proteínas Atg necesarias para la expansión del fagóforo (**Figura 21**) (Maruyama et al., 2021; Xie et al., 2008). Así, en condiciones donde se induce la autofagia, el reportero CFP-Atg8 nos permite observar en el microscopio de fluorescencia la aparición temporal de estructuras puntiformes (*puncta*) en el citoplasma celular que corresponde con el PAS (Kohda et al., 2007). Una vez formado el autofagosoma, el Atg8 unido en la cara citoplasmática del autofagosoma es escindido por acción de la cisteína proteasa Atg4, quedando libre y disponible para su reciclaje y reutilización en nuevos ciclos de la autofagia (**Figura 21**) (Kaufmann et al., 2014; Sanchez-Wandelmer et al., 2017). No obstante, en la cara luminal del autofagosoma Atg8 permanece anclado siendo degradado tras la fusión del autofagosoma con la vacuola. Es en esta etapa donde el reportero CFP-Atg8 nos permite monitorizar y medir cuantitativamente la degradación vacuolar del dominio Atg8, pues la etiqueta CFP no es degradada por acción de las proteasas vacuolares, permaneciendo estable y pudiendo ser detectado con el transcurso del tiempo mediante un análisis por Western-Blot (**Figura 21**) (Klionsky et al., 2021).

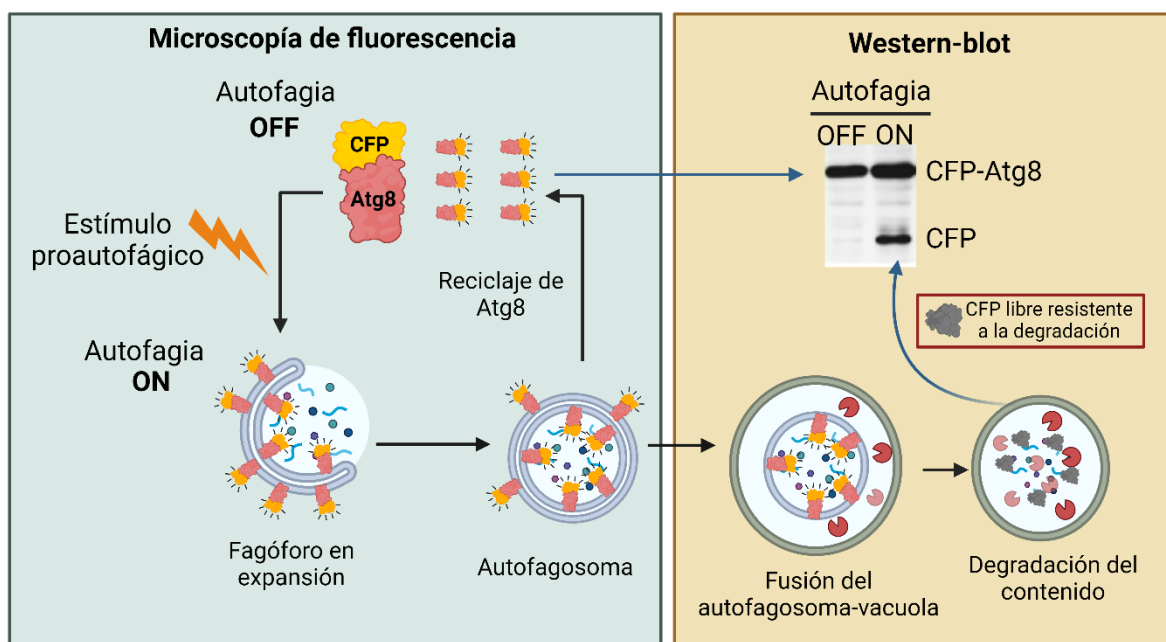


Figura 21. Esquema del método de procesamiento de CFP-Atg8 empleado para el análisis de la autofagia en *S. pombe*. Para mayor información, véase el texto principal. Adaptado de Kohda et al., 2007.

La validación de este sistema comenzó con el análisis de la respuesta frente al ayuno de nitrógeno, un potente estímulo proautofágico en *S. pombe* (Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009; Mukaiyama et al., 2010). Para ello, se analizó la respuesta de las células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (A130), y estaban creciendo exponencialmente en un medio mínimo (EMM con 2% de glucosa). Estas células fueron transferidas a un medio similar carente de fuente de nitrógeno (EMM-N₂). Se tomaron muestras a distintos tiempos y se analizaron mediante Western-blot. Tal y cómo se esperaba, la respuesta inducida mostraba la aparición temporal de estructuras puntiformes en el citoplasma que corresponde con el PAS (**Figura 22**, panel A).

Además, se realizó un análisis detallado de la proteólisis vacuolar mediante Western-blot. En condiciones de crecimiento vegetativo, la señal obtenida se correspondió íntegramente a la proteína de fusión CFP-Atg8 (tiempo 0). Sin embargo, tras el ayuno de nitrógeno (EMM-N₂), se detectó un incremento gradual de los niveles de CFP libre resistente a la actividad proteasa (**Figura 22**, panel B). Estos resultados evidencian que el ayuno de nitrógeno es un potente estímulo proautofágico en *S. pombe*, y corroboran que el flujo autofágico puede ser monitorizado eficazmente mediante el empleo del reportero CFP-Atg8.

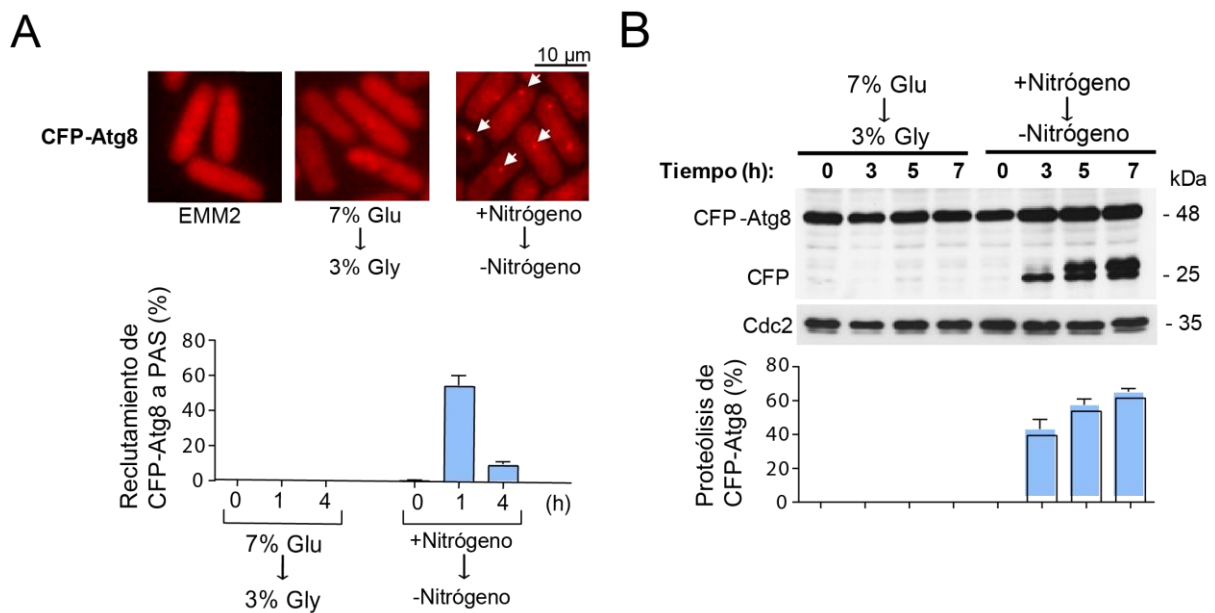


Figura 22. Comparativa del flujo autofágico en respuesta a la inanición de glucosa y nitrógeno. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (AI30) en: (i) EMM con 7% de glucosa (7% Glu); y (ii) EMM con 2% de glucosa (+ Nitrógeno); hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, las células se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (i) medio mínimo carente de glucosa, EMM con 3% glicerol (3% Gly) para analizar el ayuno de glucosa; (ii) o al mismo medio EMM, pero sin fuente de nitrógeno (EMM-N₂) para analizar el ayuno de nitrógeno. Se tomaron muestras en los tiempos indicados. (A) Comparativa de la cinética de reclutamiento a PAS de CFP-Atg8 tras el ayuno de glucosa y de nitrógeno. (B) Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos se muestran como (media ± SD) y corresponden a triplicados biológicos.

A continuación, evaluamos la respuesta de *S. pombe* frente a la inanición completa de glucosa. Para ello, se cultivaron células de la cepa AI30 hasta mitad de la fase exponencial de crecimiento en EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a EMM sin glucosa y osmóticamente equilibrado con un 3% de glicerol (una fuente de carbono alternativa respirable y no fermentable). Se tomaron muestras a distintos tiempos y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y Western-blot. Tal y como se había descrito (Kohda et al., 2007), este estímulo no indujo el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS ni su proteólisis (**Figura 22**). Para descartar que esto se debiese a la muerte celular en estas condiciones, se estudió la viabilidad a lo largo del tratamiento (0-7h). Para ello, se determinó el porcentaje de unidades formadoras de colonia de levadura (%UFC). Nuestros resultados mostraron que la inanición de glucosa no afectó a la viabilidad celular durante el periodo de ayuno (**Figura 23**, panel A). Por lo tanto, la muerte celular no es responsable de la incapacidad de *S. pombe* para inducir la autofagia en respuesta al ayuno de glucosa.

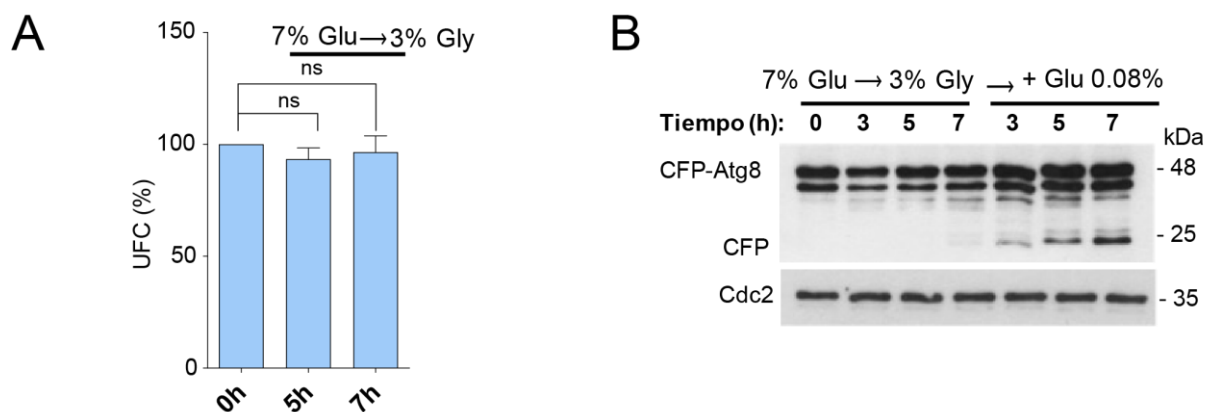


Figura 23. El ayuno de glucosa no compromete la viabilidad celular de *S. pombe*, además la adición de concentraciones limitante de glucosa rescata la inducción autofagia. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (AI30) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se resuspendieron durante los tiempos indicados en EMM con 3% de glicerol (3% Gly). (A) La viabilidad se midió mediante el porcentaje relativo de formación de colonias por células de levadura. Todos los valores son el promedio de tres repeticiones técnicas. ns, no significativo, calculado mediante *one-way* ANOVA. (B) Se tomaron muestras durante a diferentes tiempos del ayuno completo. Después, se añadió glucosa al medio a una concentración final de 0.08%. Se tomaron muestras a los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

No obstante, tal y como comentamos previamente, resultados recientes han demostrado que el flujo autofágico se activa cuando las células de *S. pombe* se transfieren de un medio rico en glucosa a un medio suplementado con concentraciones limitantes de la misma (Corral-Ramos et al., 2021). No obstante, la naturaleza y los mecanismos precisos de esta respuesta siguen siendo desconocidos. Para explorar esta cuestión, comenzamos determinando con precisión el rango fisiológico de concentraciones limitantes de glucosa que promueven la inducción de la autofagia en *S. pombe*. Como se muestra en el panel A de la **Figura 24**, las células de *S. pombe* de la cepa AI30 cultivadas en EMM con 7% de glucosa se transfirieron a EMM 3% glicerol suplementado con un rango de concentraciones crecientes de glucosa (0.01%; 0.02%; 0.04%; 0.08%; 0.12%; 0.16%; y 0.2%). Como se evidencia en el panel B de la Figura 24, el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS en EMM con 3% glicerol suplementado con glucosa al 0.01% fue mínimo. Sin embargo, en medio con glucosa al 0.02%, este reclutamiento se intensificó, alcanzando su punto máximo cuando la concentración de glucosa aumentó al 0.04%. Por otro lado, el porcentaje de células que incorporaban CFP-Atg8 al PAS disminuyó gradualmente al incubarlo en medios con concentraciones de glucosa de 0.08-0.16%. En medios con 0.2% de glucosa, el reclutamiento observado fue prácticamente nulo (**Figura 24**, panel B).

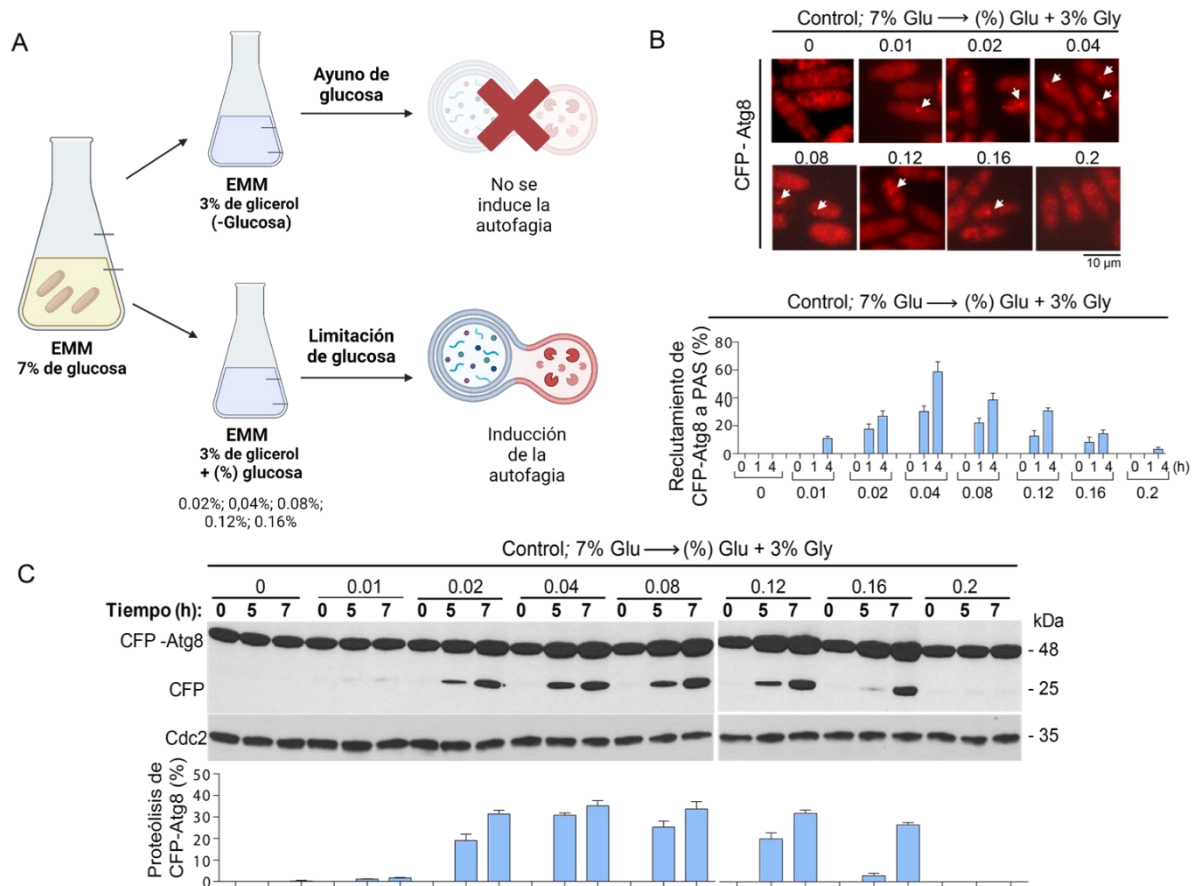


Figura 24. La limitación de glucosa es un estímulo proautofágico en *S. pombe*. (A) Esquema metodológico donde se indica la diferencia entre ayuno de glucosa y limitación de glucosa. Para ello, se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (AI30) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron al mismo medio sin glucosa (EMM con 3% de glicerol (3% Gly)) o suplementado con cantidades limitantes de Glu (0.01 a 0.2%) en presencia de 3% de Gly. Se tomaron muestras a los tiempos indicados. (B) El porcentaje de células que reclutan CFP-Atg8 a PAS se estimó en cada momento mediante microscopía de fluorescencia (número de células > 300; tres réplicas biológicas) y se representa como (media \pm SD). Se tomaron micrografías representativas de las células después de 4h de incubación mediante microscopía de fluorescencia. Flechas: señal de CFP-Atg8. (C) Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos se muestran como (media \pm SD) y corresponden a triplicados biológicos.

Como se muestra en el panel C de la **Figura 24**, el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS provocó un incremento progresivo en la cantidad de CFP libre (resistente a proteasa) tras 5 y 7 horas de incubación en unos medios enriquecidos con 0.02; 0.04 o 0.08% de glucosa. La cantidad máxima de CFP libre se observó con concentraciones de glucosa entre 0.04-0.08% de glucosa; y disminuyó paulatinamente a medida que la concentración de glucosa se elevaba, llegando a ser casi imperceptible en medios con 0.2% de glucosa (**Figura 24**, panel C). Por lo tanto, la inducción de la autofagia en *S. pombe* en respuesta a la limitación de glucosa ocurre dentro de un rango específico de concentraciones de glucosa.

Basándonos en nuestros resultados, consideramos si, al añadir cantidades limitantes de glucosa, podríamos revertir el bloqueo de la autofagia observado en condiciones de ayuno completo de glucosa (**Figura 23**, panel B). Para ello, tras realizar un ayuno completo de glucosa de 7 horas en EMM con 3% glicerol, se añadió glucosa hasta alcanzar una concentración final en el medio de 0.08%. Posteriormente, se recolectaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se examinaron mediante Western-blot. Tal y como se esperaba, la inducción de la autofagia quedó evidenciada por la proteólisis de CFP-Atg8 (**Figura 23**, panel B). Este resultado, en línea con los anteriores, sugiere que en *S. pombe* la inducción de la autofagia requiere de una adaptación celular progresiva y no abrupta a la escasez de glucosa.

Durante el crecimiento en glucosa, las levaduras Crabtree positivas como *S. pombe* crecen fermentando la glucosa y excretan etanol al medio, y a medida que la glucosa comienza a ser un recurso escaso se inicia el metabolismo de fuentes de carbono alternativas, tales como el etanol o el glicerol (De Deken, 1966; Pfeiffer & Morley, 2014). *S. pombe* no es capaz de crecer en un medio de cultivo donde el etanol o el glicerol sean las únicas fuentes de carbono disponible. No obstante, *S. pombe* puede metabolizar el glicerol como fuente de carbono en presencia de concentraciones limitantes de otras fuentes de carbono alternativas como glucosa y etanol (Klein et al., 2013; Matsuzawa, Hara, et al., 2012; Matsuzawa et al., 2010). Por lo tanto, cabría esperar que en condiciones en las que el etanol está disponible se induzca la autofagia. Para analizar esta cuestión, se transfirieron células AI30 de *S. pombe*, en crecimiento exponencial en medio EMM con 7% en glucosa, a un medio EMM con 3% de glicerol y 0.5% de etanol. Posteriormente, se recolectaron muestras a distintos intervalos de tiempo y se analizaron mediante Western-blot. Como se muestra en el panel A de la **Figura 25**, las células en un medio con una combinación de etanol y glicerol exhibieron una inducción de la autofagia comparable a la observada durante la limitación de glucosa.

En este punto, nos planteamos estudiar la relevancia del glicerol como fuente de carbono alternativa respirable pero no fermentable en nuestras condiciones experimentales. Para ello, analizamos la inducción de la autofagia en células transferidas a medio EMM conteniendo 0.04% de glucosa y 7% de sorbitol (agente osmoprotector y fuente de carbono no metabolizable por *S. pombe*) en lugar de glicerol. Posteriormente, se procedió a la recolección de muestras a distintos intervalos de tiempo para su análisis por Western-blot. Sorprendentemente, en estas condiciones la proteólisis de CFP-Atg8 se redujo parcial, pero reproduciblemente (**Figura 25**, panel B). Estos resultados sugieren una posible influencia del metabolismo del glicerol en la regulación de la autofagia en respuesta a la limitación de glucosa en *S. pombe*.

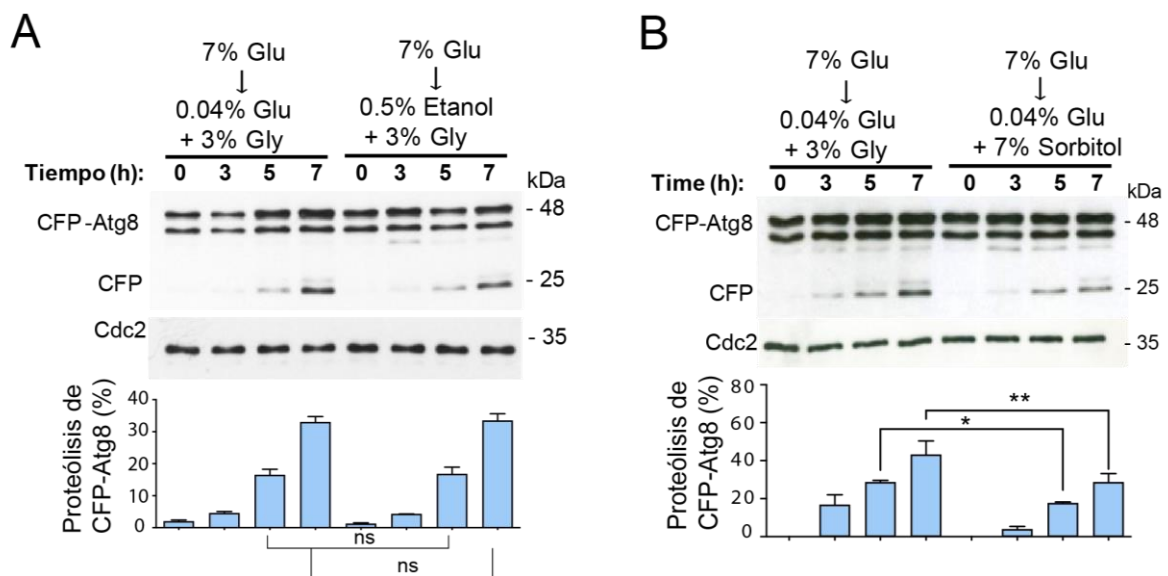


Figura 25. Inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa en *S. pombe* durante el crecimiento en medios EMM que combinan etanol-glicerol y glucosa-sorbitol como únicas fuentes de carbono disponibles. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (AI30) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (A) EMM con 0.5% etanol más 3% de Gly; (B) EMM con 0.04% de glucosa más 7% de sorbitol. Finalmente, se tomaron muestras a los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos se muestran como (media \pm SD) y corresponden a triplicados biológicos. ns, no significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; calculado mediante one-way ANOVA

2. Activación de Atg1: Una respuesta diferencial frente a la limitación y la inanición de glucosa en *S. pombe*.

La serina/treonina quinasa Atg1 es la principal diana molecular de varias cascadas de señalización nutricional debido a que es un regulador fundamental de la inducción de autofagia en eucariotas, incluida *S. pombe* (Gross & Graef, 2020; Pan & Du, 2021; Xu & Du, 2022). Recordemos que *S. pombe* el complejo de iniciación o de Atg1 está compuesto por la propia Atg1, Atg11 (ortóloga a FIP200 de mamíferos), Atg13, Atg17 y Atg101 (homóloga a ATG101 de mamíferos) (Xu & Du, 2022). Por ello, nuestro siguiente objetivo consistió en analizar la relevancia y el estado de activación del complejo de Atg1 en condiciones de ayuno completo y de limitación de glucosa en *S. pombe*.

En primer lugar, examinamos si la ausencia de Atg1 afectaba al reclutamiento de CFP-Atg8 al PAS y/o a su proteólisis. Cabe destacar que, pese a su importancia en la inducción del flujo autofágico en *S. pombe*, la privación de nitrógeno promueve el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS en mutantes nulos de *atg1* Δ y *atg11* Δ (Sun et al., 2013). Para comprobar si este fenotipo se reproducía en condiciones de escasez de glucosa se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *atg1* Δ (AJ311), *atg11* Δ (AJ312), *atg4* Δ (AI035), *atg5* Δ (AI036) en EMM con 7% de glucosa hasta mitad de fase exponencial. Acto seguido, se recogieron por filtración y se transfirieron a un medio EMM con 0.04% de glucosa y 3% glicerol. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y Western-blot. Como se muestra en el panel A de la Figura 26, en los mutantes *atg1* Δ y *atg11* Δ se produjo la incorporación de CFP-Atg8 al PAS en condiciones de limitación de glucosa de manera similar a lo que ocurre durante el ayuno de nitrógeno. Sin embargo, este comportamiento no se observó en los mutantes *atg4* Δ y *atg5* Δ (sistema de conjugación de Atg8) (**Figura 26**, panel A), lo que confirma que la estructura puntiforme observada cuando se induce la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa corresponde al PAS. Por otro lado, la proteólisis de CFP-Atg8 en las células *atg1* Δ , *atg11* Δ , *atg4* Δ y *atg5* Δ se encuentra comprometida en dichas condiciones (**Figura 26**, panel B), subrayando el papel esencial de Atg1 en el inicio de la autofagia ante este estímulo.

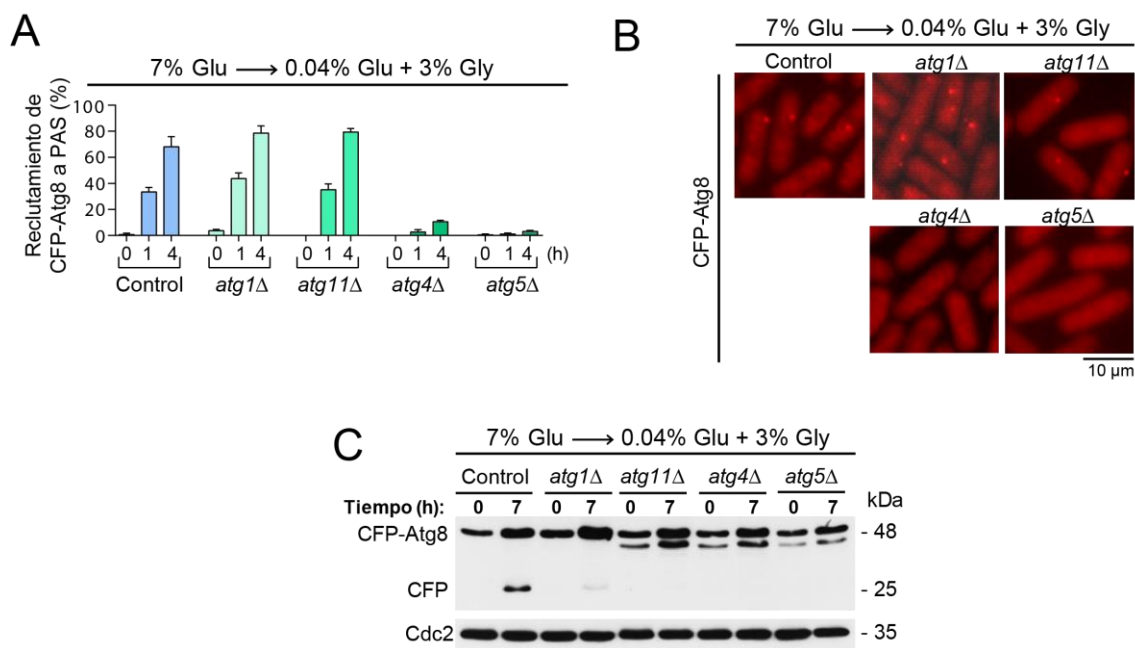


Figura 26. La autofagia inducida en respuesta a una limitación en la disponibilidad de glucosa requiere de los componentes *atg1Δ*, *atg11Δ*, *atg4Δ* y *atg5Δ*; de la maquinaria central de la autofagia. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *atg1Δ* (AJ311), *atg11Δ* (AJ312), *atg4Δ* (AI035) y *atg5Δ* (AI036) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol (0.04 % Glu + 3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. (A) Porcentaje de células donde CFP-Atg8 es reclutada a PAS. Los datos se muestran como (media ± SD) y corresponden a triplicados biológicos. (B) Se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de muestras de células después de 4 h de incubación. (C) Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

A tenor de estos resultados, decidimos analizar la activación de Atg1 como reportero de una adecuada activación de la maquinaria autofágica en nuestras condiciones de estudio. La autofosforilación de Atg1 en su bucle de activación es esencial para su activación. Esta fosforilación provoca un retraso en la movilidad electroforética de Atg1, sirviendo como un indicador de su actividad quinasa (Yeh et al., 2010). Por otro lado, la inhibición de la quinasa TORC1 provoca la desfosforilación de Atg1 lo que ocasiona una mayor movilidad electroforética que se emplea comúnmente como marcador del inicio y la progresión de la autofagia (Corral-Ramos et al., 2021; Kohda et al., 2007). Para analizar la activación de Atg1 ante la escasez de glucosa procedimos a transferir células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión Atg1-HA (control, AJ340) y estaban creciendo exponencialmente en EMM con 7% de glucosa a: (i) EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol; y (ii) EMM con 3% glicerol. Tal y como se aprecia en el panel B de la **Figura 27**, la movilidad electroforética de una fusión genómica Atg1-HA disminuyó ligeramente en células control tras la limitación de

glucosa. Posteriormente, se observó un incremento progresivo tanto en los niveles de la proteína como en su movilidad a las 3 y 5 horas de incubación. Sin embargo, a pesar de que se ha descrito la inactivación de TORC1 tras la limitación y/o ayuno de glucosa (Corral-Ramos et al., 2021), no se observó un incremento en la movilidad electroforética de la fusión Atg1-HA durante la inanición completa de glucosa (**Figura 27**, panel B). Por lo tanto, la falta de inducción de autofagia en *S. pombe* durante la inanición de glucosa, a diferencia de la limitación de glucosa, podría deberse a una activación ineficiente de la quinasa Atg1, aunque los mecanismos moleculares implicados aún requieren de un estudio más detallado y profundo.

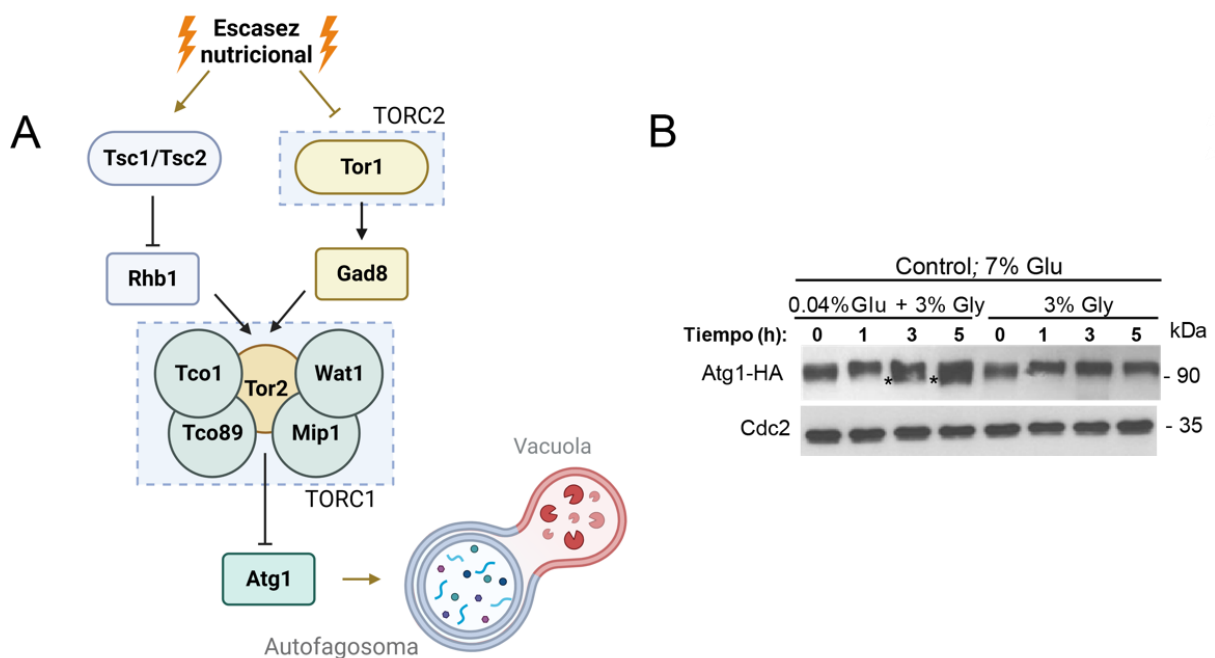


Figura 27. La cinética de activación de Atg1 difiere entre la limitación y el ayuno completo de glucosa. (A) Modelo de regulación de la activación de Atg1 mediado por TORC1 y TORC2 en respuesta al déficit nutricional. Adaptado de Corral-Ramos et al., 2021. (B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión Atg1-HA (control, AJ340) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a: EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04 % Glu + 3% Gly) o EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. El cambio de movilidad de Atg1 se detectó mediante Western-blot de extractos de proteína precipitados con TCA haciendo uso del anticuerpo anti-HA-HRP. El * indica las bandas de menor movilidad. Se usó Anti-Cdc2 como control de carga. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

3. La respiración mitocondrial es fundamental para la inducción de la autofagia ante un déficit de glucosa en *S. pombe*.

En *S. cerevisiae*, la autofagia inducida en respuesta al déficit de glucosa es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial, es decir, mantener la síntesis de ADN mitocondrial (ADNmt), y por ende la función mitocondrial. De hecho, defectos en la inducción de la autofagia en estas condiciones provocan desajustes en la homeostasis de nucleótidos y desencadena una intensa degradación del ADNmt, que ocasiona una disminución de la función respiratoria y de la producción de ATP (Gross & Graef, 2020). Curiosamente, en *S. cerevisiae*, las mitocondrias no son esenciales para mantener la viabilidad celular pues las células que pierden el ADNmt (conocidas como «células p^0 » o «células *petite* positiva») o aquellas que carecen de genes que codifican proteínas implicadas en la traducción mitocondrial (69 genes) son capaces de proliferar (Bulder, 1964a, 1964b; Kim et al., 2010).

Por su parte, *S. pombe* es una levadura «*petite* negativa» que requiere de sus mitocondrias para crecer en medios estándar que contienen glucosa incluso en anaerobiosis (Bulder, 1964a, 1964b; Kim et al., 2010; Zuin et al., 2008). Además, tanto en *S. pombe* como en células humanas, el bloqueo en la traducción mitocondrial provoca defectos de forma significativa en el mantenimiento del ADNmt lo que es incompatible con el mantenimiento de la viabilidad celular (Chiron et al., 2005). Durante el crecimiento exponencial fermentativo, *S. pombe* presenta una baja actividad mitocondrial cuya inhibición no afecta a la proliferación en condiciones de abundancia de glucosa (Takeda et al., 2015). No obstante, cuando las concentraciones de glucosa son inferiores al 0.1% y el crecimiento celular depende del metabolismo respiratorio, un tratamiento con 4.4 μM de Antimicina A (AA), un inhibidor del Complejo ETC III/IV, detiene completamente la proliferación celular (Takeda et al., 2015).

Basándonos en estos antecedentes, planteamos la hipótesis de que la activación del metabolismo respiratorio podría ser esencial para una inducción óptima de la autofagia ante la limitación de glucosa. Para analizar esta posibilidad, bloqueamos farmacológicamente el flujo de electrones de la ETC mitocondrial mediante un tratamiento con AA en condiciones de limitación (EMM 0.04% glucosa 3% glicerol). Inicialmente, cultivamos células de la cepa control (AI30) hasta mitad de la fase exponencial en EMM con 7% de glucosa. A continuación, se realizó un pretratamiento de 1 hora con o sin 0.5 μM de AA. Tras ello, las células se filtraron y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol en presencia de AA. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo y se procedió a su análisis mediante microscopía de fluorescencia y Western-blot. Como era de esperar, al bloquear el metabolismo respiratorio durante la escasez de glucosa, se observó una inhibición completa del reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS y de su proteólisis (**Figura 28**, paneles A y B).

Curiosamente, la inducción de la autofagia no se vio afectada por el tratamiento con AA cuando las células control se sometieron a un ayuno de nitrógeno (**Figura 28**, paneles C y D).

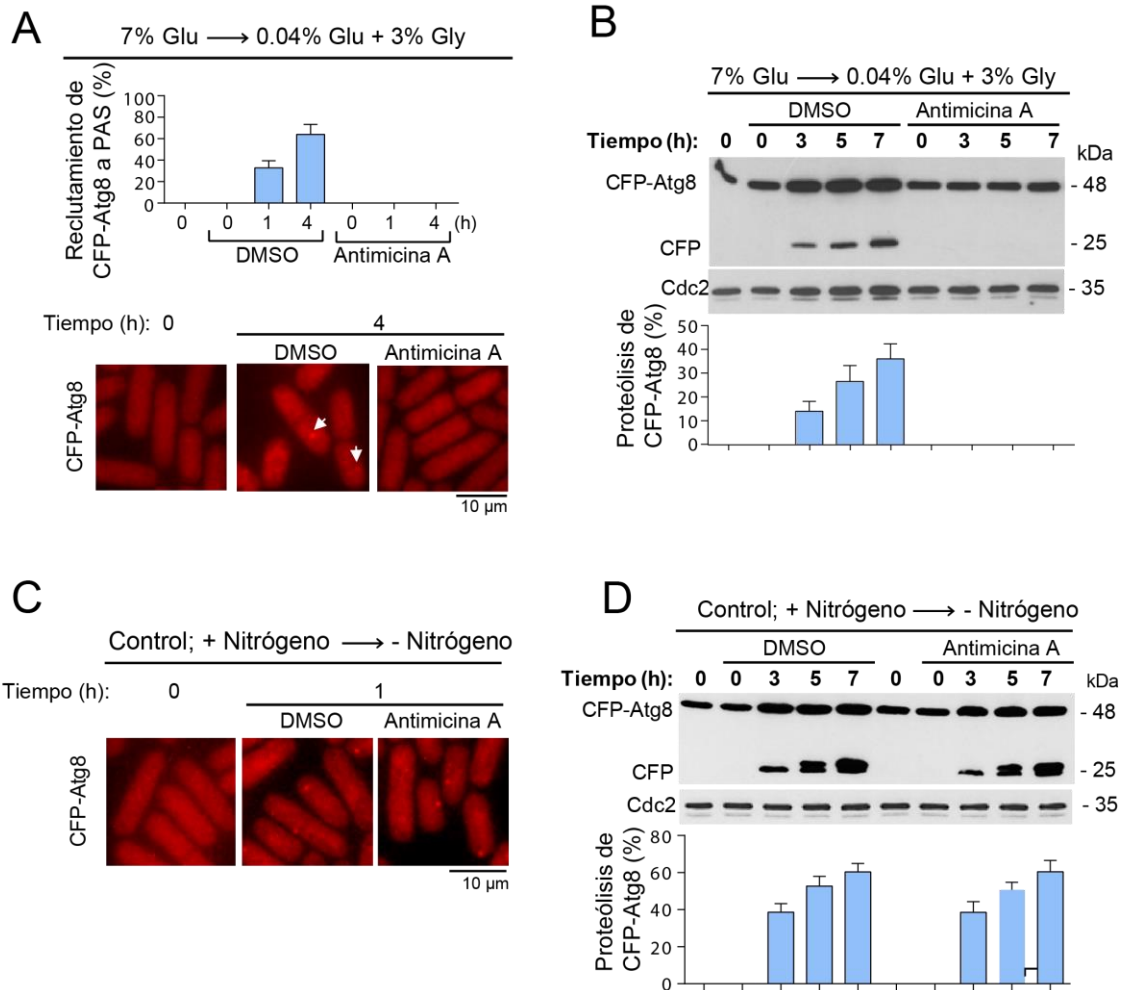


Figura 28. El tratamiento con Antimicina A (AA) bloquea la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa, pero no de nitrógeno. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (AI30) en: (A y B) EMM al 7% de glucosa (7% Glu); (C y D) EMM al 2% de glucosa (+Nitrógeno); hasta mitad de fase exponencial. Se realizó un pretratamiento con o sin 0.5 μ M AA. Posteriormente, las células se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (A y B) EMM al 0.04% de glucosa más 3% glicerol (0.04% Glu + 3% Gly); y (C y D) EMM-N₂. Se tomaron muestras en los tiempos indicados con o sin 0.5 μ M AA (DMSO (dimetil sulfóxido); control de solvente). (A y C) El porcentaje de células que han sido capaces de reclutar CFP-Atg8 a PAS se determinó mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas obtenidas mediante de microscopía de fluorescencia. Flechas: CFP-Atg8. (B y D) Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Todos los datos se muestran como (media \pm SD) y corresponden a triplicados biológicos.

Asimismo, se procedió a evaluar si los defectos observados en la activación de Atg1 en respuesta al ayuno completo de glucosa, se manifestaban en las condiciones descritas anteriormente. Consistentemente con los hallazgos previos, la proteína de fusión Atg1-HA no experimentó desfosforilación con condiciones de limitación de glucosa en presencia de AA (**Figura 29**), sino que permaneció invariable de manera similar a lo observado en las células sometidas a ayuno de glucosa (**Figura 27**). Estos datos refuerzan la hipótesis de que la inducción de la autofagia ante concentraciones restringidas de glucosa en *S. pombe* exige una adaptación óptima al metabolismo respiratorio.

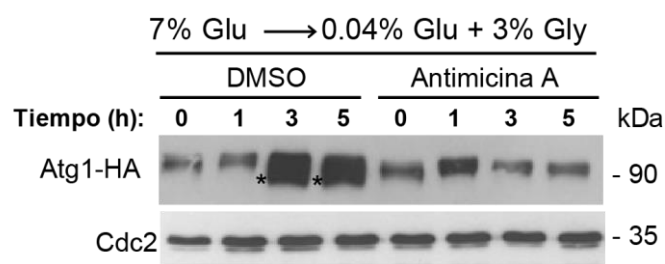


Figura 29. El tratamiento con Antimicina A (AA) bloquea la activación de la proteína quinasa Atg1 en respuesta a la limitación de glucosa. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión Atg1-HA (AJ340) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Se realizó un pretratamiento en presencia con o sin 0.5 μ M AA. Posteriormente, se recuperaron las células por filtración y se transfirieron a un medio EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol (0.04% Glu + 3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados con o sin 0.5 μ M AA (DMSO; control de solvente). Atg1 total se detectó mediante Western-blot de extractos de proteína precipitados con TCA haciendo uso de un anticuerpo anti-HA-HRP. El * indica las bandas de menor movilidad. Se usó Anti-Cdc2 como control de carga. Se muestran los resultados de un experimento representativo. «*» muestra la banda de proteína hipofosforilada y de mayor movilidad.

Estos hallazgos nos llevaron a explorar la relevancia biológica de otros componentes de la ETC durante la inducción de la autofagia tras la limitación de glucosa. Con este propósito, cultivamos células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (AI30), en EMM con 7% de glucosa hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial. Posteriormente, estas células fueron sometidas a un pretratamiento con agentes farmacológicos que inhiben distintos componentes de la ETC mitocondrial, tales como: rotenona (para el complejo I), 2-tenoiltrifluoroacetona (TTFA; dirigido al complejo II), oligomicina (específico del complejo V ATP sintasa) o N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCCD; inhibidor de la bomba de protones) (**Figura 30**, panel A) (Jiang et al., 2021). Posteriormente, las células se recuperaron mediante filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol. Seguidamente, se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para su análisis mediante Western-blot.

Tal como se ilustra en el panel B de la **Figura 30**, la exposición a rotenona, TTFA y DCCD resultó en una disminución marcada del flujo autofágico tras la limitación de glucosa. En contraste, la oligomicina no tuvo un efecto inhibitorio en el proceso autofágico bajo las mismas condiciones.

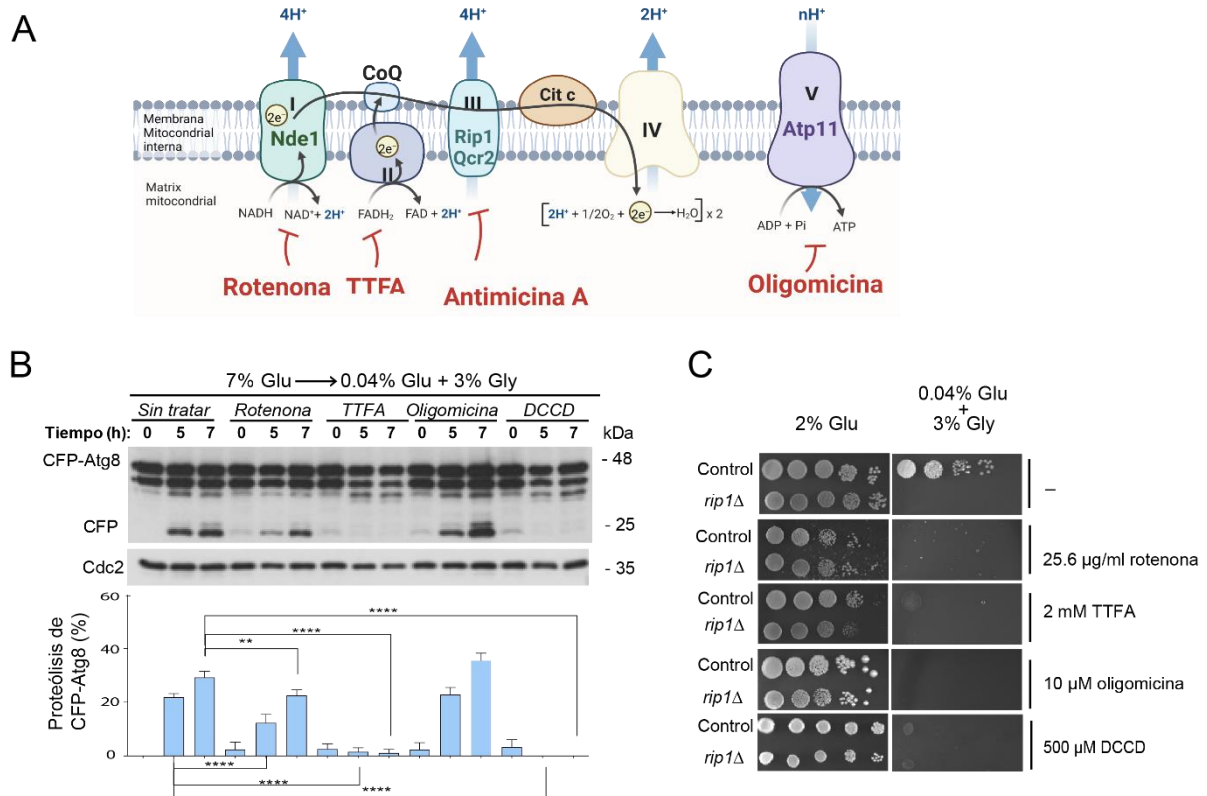


Figura 30. La inhibición farmacológica de distintos componentes de la ETC durante una limitación de glucosa compromete la inducción de la autofagia y el crecimiento respiratorio. (A) Esquema de la inhibición farmacológica de los distintos componentes de la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial. (B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 (AI30) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Los cultivos fueron pretratados 1h con rotenona 25.6 μ g/ml, TTFA 2 mM, oligomicina 10 μ M o DCCD 500 μ M. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol (0.04 % Glu + 3% Gly) en presencia nuevamente de los fármacos a la concentración previamente indicada. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, sin tratamiento adicional (sin tratar) o tratadas. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos de proteólisis de GFP-Atg8 se muestran como (media \pm SD) y corresponden a réplicas biológicas. ns, no significativo, ****, $p < 0.0001$, **, $p < 0.01$, calculado mediante *one-way* ANOVA. (C) Diluciones seriadas de las cepas AI30 (control) y AJ26 (*rip1* Δ); se inocularon en placas sólidas de YES al 2% de glucosa o Yes al 0.04% de glucosa más 3% glicerol con rotenona 25.6 μ g/ml, TTFA 2 mM, oligomicina 10 μ M o DCCD 500 μ M. Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días y se fotografiaron. Se muestra un experimento representativo

Debido a las divergencias observadas entre los distintos compuestos, decidimos analizar si las dosis de los fármacos empleadas presentaban alguna toxicidad para las células y si afectaban a su crecimiento respiratorio. Todos los fármacos en las dosis empleadas fueron capaces de inhibir la proliferación celular en medios sólidos con glucosa al 0.04% más glicerol al 3% (crecimiento respiratorio); sin afectar el crecimiento en medios sólidos con glucosa al 2% (**Figura 30**, panel C).

Para comprender con más detalle el papel de la ETC mitocondrial en este proceso, construimos cepas de *S. pombe* carentes de genes que codifican diferentes componentes de los complejos de la ETC. Estos genes incluyen *nde1⁺* (complejo I), *rip1⁺* y *qcr2⁺* (ambos relacionados con el complejo III) y *atp11⁺* (componente F1-FO de la ATP sintasa; complejo V) (**Figura 31**, panel A). Posteriormente, se cultivaron células de estas cepas de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8, hasta la fase exponencial en EMM con 7% de glucosa, transfiriéndose a continuación a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol. Se tomaron muestras a distintos intervalos para su análisis por Western-blot. Conforme a nuestras expectativas, la ausencia de los genes del complejo III, *rip1⁺* y *qcr2⁺*, bloqueó la inducción de la autofagia; mientras que la falta de *atp11⁺* causó una notable reducción en el flujo autofágico en respuesta a la limitación de glucosa (**Figura 31**, panel A). Además, al igual que en *S. cerevisiae*, la delección de *nde1⁺* no influyó en la inducción de este mecanismo degradativo bajo estas condiciones específicas (Yi et al., 2017).

A continuación, decidimos investigar el efecto de cada componente de los complejos de la ETC analizados en el rendimiento global del metabolismo respiratorio. Para ello, se procedió a medir el consumo de O₂. Durante la respiración, el consumo de O₂ ocurre a nivel del complejo IV, donde el O₂ acepta los electrones provenientes del flujo electrónico de la ETC reduciéndose a H₂O. Por lo tanto, defectos en el consumo de O₂ sugieren interrupciones en el flujo de electrones de la ETC mitocondrial, cuya severidad depende de la importancia funcional de la subunidad analizada. Para este experimento, se partió de cultivos de células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *nde1Δ* (AJ163), *rip1Δ* (AJ26), *qcr2Δ* (AJ25) y *atp11Δ* (AJ166) en medio EMM con 7% de glucosa (**Figura 31**, panel B). Elegimos estas condiciones dado que *S. pombe* depende de sus mitocondrias y la respiración incluso cuando hay exceso de glucosa, un fenómeno que es más notorio durante el crecimiento en medio EMM (Malecki et al., 2020; Zuin et al., 2008). Según nuestros datos, las células de *S. pombe* que carecen de *rip1Δ* y *qcr2Δ* consumieron aproximadamente 10 veces menos cantidad de oxígeno que las células control, mientras que en los mutantes *nde1Δ* y *atp11Δ* esta reducción fue menos severa (aprox. 2,5 veces) (**Figura 31**, panel B). Estos resultados sugieren que los genes delecionados en los complejos I y V no detienen por completo su función, posiblemente debido a cierta redundancia funcional con

otras subunidades de los complejos (**Figura 31**, panel B). De hecho, esta actividad respiratoria residual podría ser suficiente para iniciar la autofagia, pero insuficiente para sustentar el crecimiento celular, ya que las células *nde1Δ* y *atp11Δ* no pueden proliferar en placas de medio sólido con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (**Figura 31**, panel C). Por tanto, en *S. pombe*, la inducción de la autofagia en respuesta a la limitación de glucosa depende en gran medida de una ETC mitocondrial completamente funcional.

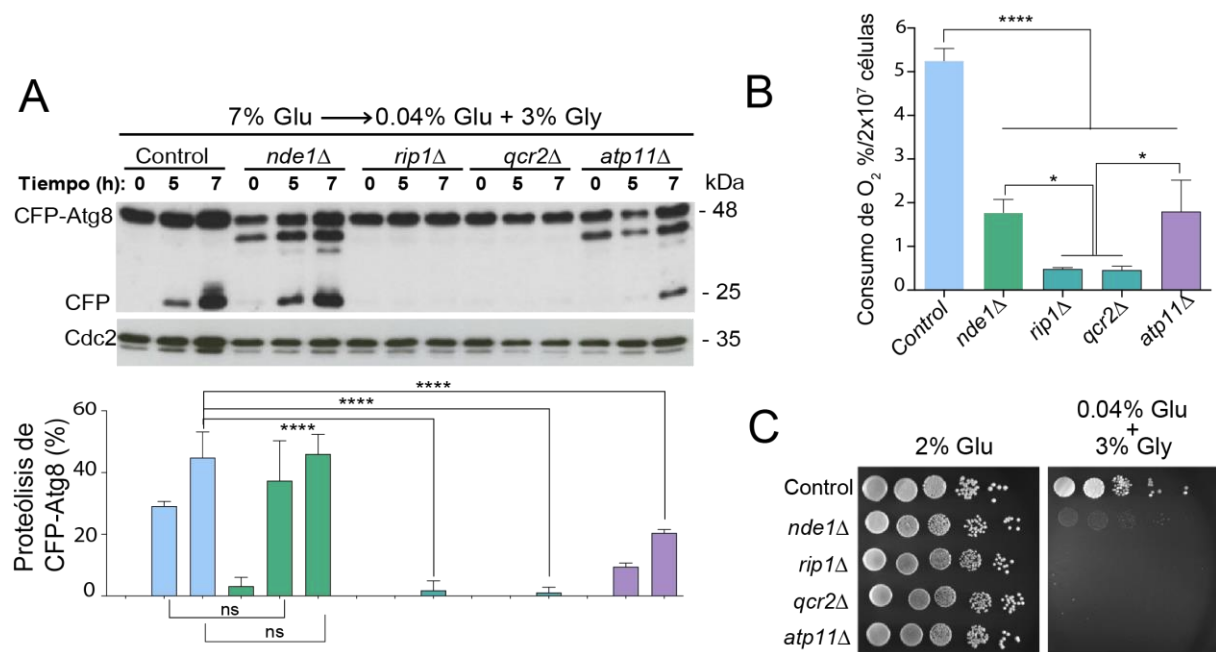


Figura 31. Análisis de la capacidad de inducir la autofagia, respiratoria y proliferativa de mutantes nulos para distintos componentes de la ETC mitocondrial de *S. pombe*. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AJ30), *nde1Δ* (AJ163), *rip1Δ* (AJ26), *qcr2Δ* (AJ25) y *atp11Δ* (AJ166) en medio EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. (A) Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% glucosa más 3% glicerol (0,04% Glu más 3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos de proteólisis de GFP-Atg8 se muestran como media \pm SD y corresponden a réplicas biológicas. ns, no significativo, ****, $p < 0,0001$, calculado mediante *one-way* ANOVA. (B) El consumo de oxígeno de las cepas indicadas se determinó a partir de cultivos logarítmicos a una A_{600} baja (10–30 % de la A_{600} máxima). Los datos se muestran como (media \pm SD) y corresponden a triplicados biológicos. ****, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$, calculado por *one-way* ANOVA. (C) Diluciones seriadas de las cepas indicadas de *S. pombe* se inocularon en placas sólidas de YES al 2% de glucosa (2% Glu) y YES al 0.04% glucosa más 3% glicerol (0,04% Glu más 3% Gly). Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días y se fotografiaron. Se muestra un experimento representativo.

4. La ruta de señalización AMPc-PKA regula negativamente la inducción de la autofagia en *S. pombe*.

Como se ha comentado en la Introducción, la señalización mediada por la vía AMPc-PKA ha sido ampliamente descartada como moduladora de la autofagia en *S. pombe* en base a: (1) *S. pombe* es incapaz de inducir la autofagia en respuesta a un ayuno completo de glucosa (Corral-Ramos et al., 2021; Mukaiyama et al., 2010; Xu & Du, 2022); (2) no se observaron defectos en la inducción de la autofagia en respuesta al ayuno de nitrógeno tras un tratamiento con altas dosis de AMPc y en cepas carentes de la subunidad reguladora Cgs1 (Kohda et al., 2007; Mukaiyama et al., 2009).

Sin embargo, considerando que en *S. pombe* la percepción de glucosa y la adaptación al metabolismo respiratorio están predominantemente reguladas por la vía AMPc-PKA (Adnan et al., 2017), decidimos reevaluar y profundizar en el posible papel que esta vía de señalización pueda tener en la regulación de la autofagia, especialmente en contextos de escasez de glucosa.

En *S. pombe* se ha descrito que mutantes nulos para distintos componentes centrales de la vía AMPc-PKA, como *pka1Δ* (subunidad catalítica) o *git3Δ* (receptor transmembrana) muestran una mayor tasa respiratoria y, por tanto, un mayor consumo de oxígeno que la estirpe control (Roux et al., 2009; Zuin, Carmona, et al., 2010). Esta observación nos llevó a postular que tal preacondicionamiento al metabolismo respiratorio podría ser suficiente para inducir la autofagia cuando se priva completamente de glucosa (EMM 3% Glicerol). Por ello, las cepas de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *git3Δ* (AJ306), *gpa2Δ* (AJ361), *cyr1Δ* (AJ308) y *pka1Δ* (AJ332) se cultivaron hasta mitad de la fase exponencial en EMM con 7% de glucosa, y se transfirieron a EMM con 3% glicerol. Tras tomar muestras en intervalos establecidos, las analizamos utilizando microscopía de fluorescencia y Western-blot. Sorprendentemente, los resultados revelaron que todos los mutantes (*git3Δ*, *gpa2Δ*, *cyr1Δ* y *pka1Δ*) pudieron inducir la autofagia, evidenciada por el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS y su posterior proteólisis, en respuesta al ayuno completo de glucosa en presencia de glicerol (Figura 32). Aún más notable fue que en un pequeño subconjunto de estas células mutantes, el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS se observó incluso en condiciones ricas en glucosa (Figura 32, panel A), lo cual coincide con la desrepresión del metabolismo respiratorio típica de estos mutantes.

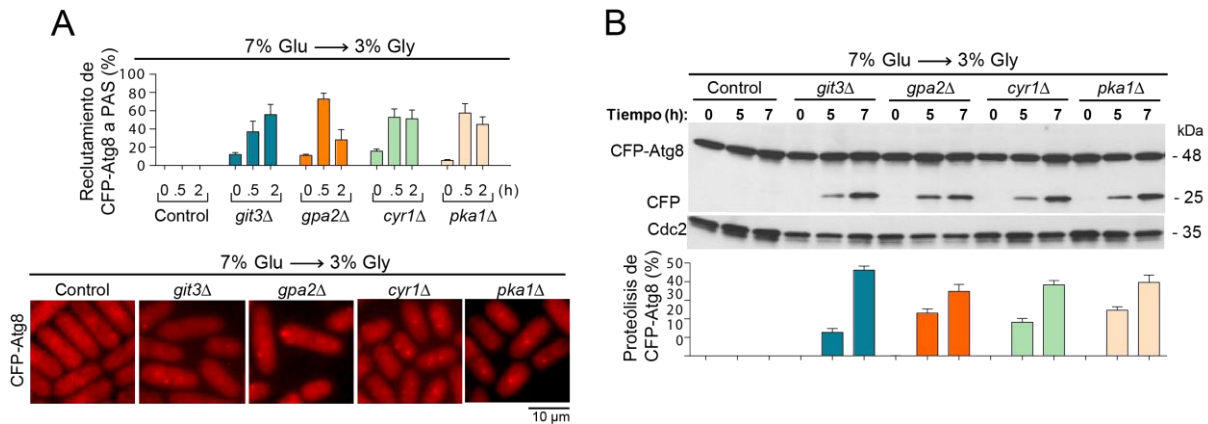


Figura 32. La inactivación de la señalización de la ruta AMPc-PKA promueve la inducción de la autofagia en respuesta a un ayuno completo de glucosa. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *git3Δ* (AJ306), *gpa2Δ* (AJ361), *cyr1Δ* (AJ308) y *pka1Δ* (AJ332) en medio EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. (A) El porcentaje de células donde se observa el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS se estimó en cada momento mediante microscopía de fluorescencia. También, se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de muestras de células que se tomaron a las 0.5 h de incubación. (B) Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos de proteólisis de GFP-Atg8 se muestran como (media \pm SD) y corresponden a réplicas biológicas.

Para investigar cómo varía la inducción de la autofagia a lo largo de las distintas etapas del crecimiento celular, y cómo se correlaciona con la disponibilidad de glucosa, y la influencia del metabolismo respiratorio en el proceso, decidimos analizar las cepas de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *pka1Δ* (AJ332). Nuestro principal interés era evaluar si una desrepresión constante del metabolismo respiratorio (células *pka1Δ*) podría acelerar la cinética de inducción de la autofagia en comparación con la cepa control. Para comprobar esta hipótesis, llevamos a cabo experimentos en dos escenarios distintos: en un medio rico en glucosa y bajo limitación de glucosa. En primer lugar, las cepas control (AI30) y *pka1Δ* (AJ332) se cultivaron en medio rico YES, y se tomaron muestras a diferentes DO_{600nm} . Las muestras se procesaron y se analizaron mediante Western-blot. Observamos que en un medio rico en glucosa, la proteólisis de CFP-Atg8 se aceleró considerablemente en las células *pka1Δ* en comparación con las células control (**Figura 33**, panel A). A continuación, decidimos estudiar la cinética de inducción de la autofagia durante la limitación de glucosa. Consistentemente, el análisis por Western-blot reveló que la cinética de inducción de la autofagia en las células *pka1Δ* también se aceleró en presencia de una disponibilidad limitada de glucosa (**Figura 33**, panel B).

Para obtener una visión más integral de la influencia de la ruta AMPc-PKA en la regulación de la autofagia, extendimos nuestro estudio al ayuno de nitrógeno. Utilizando técnicas de Western-blot, analizamos las muestras de las cepas control (AI30) y *pka1Δ* (AJ332) sometidas a ayuno de nitrógeno. Los datos resultantes fueron concluyentes: la inducción y progresión de la autofagia, en el contexto de un ayuno de nitrógeno, eran prácticamente indistinguibles entre las células control y *pka1Δ* (Figura 33, panel C). Estos resultados subrayan una notable especificidad en el papel de la vía AMPc-PKA en la regulación de la autofagia en *S. pombe*. Mientras que esta vía parece ser instrumental en la respuesta a la escasez de glucosa, no tiene un impacto discernible en la respuesta autofágica al ayuno de nitrógeno.

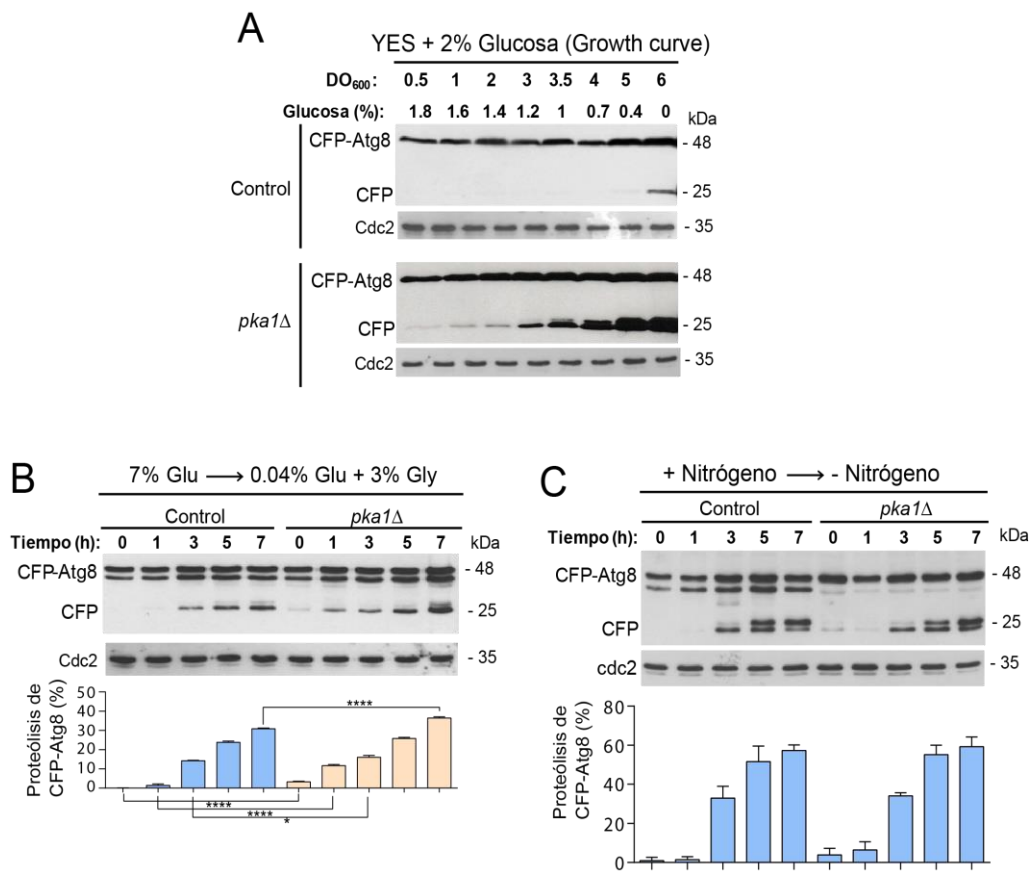


Figura 33. La cinética de inducción de la autofagia es más rápida en el mutante *pka1Δ*. Cultivamos células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *pka1Δ* (AJ332) en: (A) YES 2% Glu; (B) EMM con 7% de glucosa (7% Glu); y (C) EMM con 2% de glucosa; hasta mitad de fase exponencial. (A) Se tomaron muestras del cultivo a distintas densidad ópticas (600 nm). (B y C) Las células se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (B) EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol y (C) EMM2-N₂. Se tomaron muestras a distintos tiempos. Finalmente, las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos se muestran como (media ± SD) y corresponden a triplicados biológicos. ****, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$, calculado por *one-way* ANOVA.

En *S. pombe*, la actividad de Pka1 depende de su fosforilación en la posición T356 mediada por Ksg1 (Tang & McLeod, 2004), la cual es determinante para su localización intracelular, para su interacción con Cgs1, y para su hiperfosforilación en otras posiciones (Gupta et al., 2011a, 2011b). De acuerdo con esto, y dado que Ksg1 es una proteína esencial para *S. pombe*, decidimos analizar si una cepa de *S. pombe* que expresa un alelo termosensible de Ksg1 (*Ksg1-208*) (Niederberger & Schweingruber, 1999) o una versión de Pka1 no fosforilable por Ksg1 (*Pka1^{T356A}*) (Gupta et al., 2011a, 2011b) eran capaces de inducir la autofagia en respuesta al ayuno de glucosa. Para ello, se cultivaron células que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos *ksg1-208* (BV973) y *pka1^{T356A}* (BV1032), en EMM con 7% de glucosa a 28°C y, posteriormente, se transfirieron a medio EMM con 3% de glicerol. Por su parte, la cepa BV973 se incubó a 36.5°C para promover la inactivación del alelo termosensible *ksg1-208*. Finalmente, se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para su análisis mediante Western-blot. Como cabría esperar, y dado que en ambos casos se inactiva Pka1, las células fueron capaces de inducir la autofagia en respuesta al ayuno de glucosa (**Figura 34**, paneles A y B).

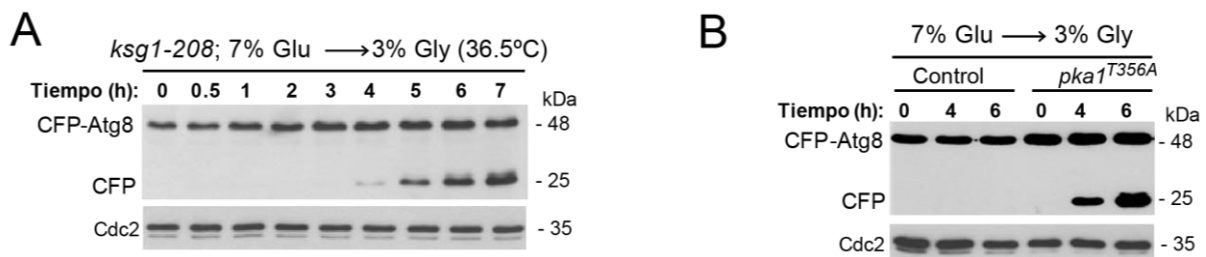


Figura 34. La inactivación de la subunidad catalítica Pka1 de la ruta AMPc-PKA promueve la inducción de la autofagia en respuesta a un ayuno completo de glucosa. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos *ksg1-208* (BV973) y *pka1^{T356A}* (BV1032) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). (A) La incubación de BV973 en EMM 3% Gly se realizó a 36.5°C. Se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos de proteólisis de GFP-Atg8 se muestran como (media ± SD) y corresponden a réplicas biológicas. Los datos de proteólisis de GFP-Atg8 se muestran como media ± SD y corresponden a réplicas biológicas.

Dado que el proceso de autofagia se induce durante el ayuno completo de glucosa en células carentes de Pka1, cabría esperar que se produjesen cambios en la dinámica de activación de Atg1 en comparación con el control. Para analizar este aspecto, se cultivaron células que expresan una fusión genómica de Atg1-HA en los fondos genéticos control (AJ340) y *pka1Δ* (AJ956) en EMM con 7% de glucosa hasta mitad de la fase exponencial. Posteriormente, se recogieron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% glicerol. Tal y como era de esperar, las células *pka1Δ* sometidas a ayuno de glucosa mostraron un notable incremento en la movilidad de la fusión Atg1-HA tras un período de incubación de 3 a 5 horas (**Figura 35**). Estos hallazgos refuerzan la idea de que, bajo condiciones de privación completa de glucosa, la supresión de la señalización por Pka1 juega un papel crucial, aunque aún no completamente elucidado, en la activación efectiva de Atg1, favoreciendo así la inducción de la autofagia.

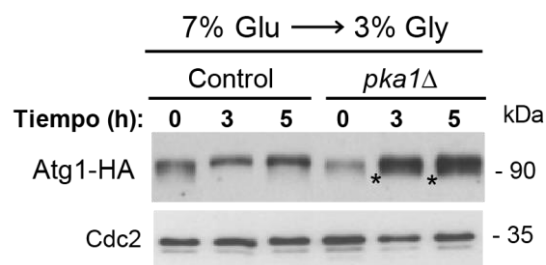


Figura 35. La proteína quinasa Atg1 se activa adecuadamente en respuesta al ayuno completo de glucosa en el mutante *pka1Δ* de *S. pombe*. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión Atg1-HA en los fondos genéticos control (AJ340) y *pka1Δ* (AJ956) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. El cambio de movilidad electroferética de Atg1 se detectó mediante Western-blot de extractos de proteína precipitados con TCA haciendo uso de un anticuerpo anti-HA-HRP. Se usó Anti-Cdc2 como control de carga. Se muestran los resultados de un experimento representativo. «*» muestra la banda de proteína hiperfosforilada y de mayor movilidad.

Tras haber establecido la importancia funcional de la vía AMPc-PKA en la regulación de la autofagia frente a la escasez de glucosa, nos restaba determinar si el papel de esta ruta de señalización está vinculado con la predisposición al metabolismo respiratorio que resulta de su inactivación. Para ello, procedimos a analizar los efectos de la inhibición farmacológica de los complejos de la ETC mitocondrial en la inducción de la autofagia en respuesta al ayuno completo de glucosa en células *pka1Δ*. Las células de la cepa AJ332 (*pka1Δ* CFP-Atg8) se pretrataron durante 1h con distintos agentes: 0.5 μ M de AA, 25,6 μ g/ml de rotenona, 2 mM de TTFA, 10 μ M de oligomicina y 500 μ M de DCCD. Posteriormente, las células se filtraron y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol, continuando con la presencia de los fármacos. Se tomaron muestras en distintos intervalos de tiempo y se analizaron mediante Western-Blot.

Nuestros resultados revelaron que, de manera análoga a lo observado en la cepa control de *S. pombe* ante la limitación de glucosa (**Figuras 28-31**), la inhibición farmacológica de las funciones de los complejos II, III y V de la ETC impidió completamente la proteólisis de CFP-Atg8 en células *pka1Δ* sometidas a ayuno de glucosa (**Figura 36**, panel A y B).

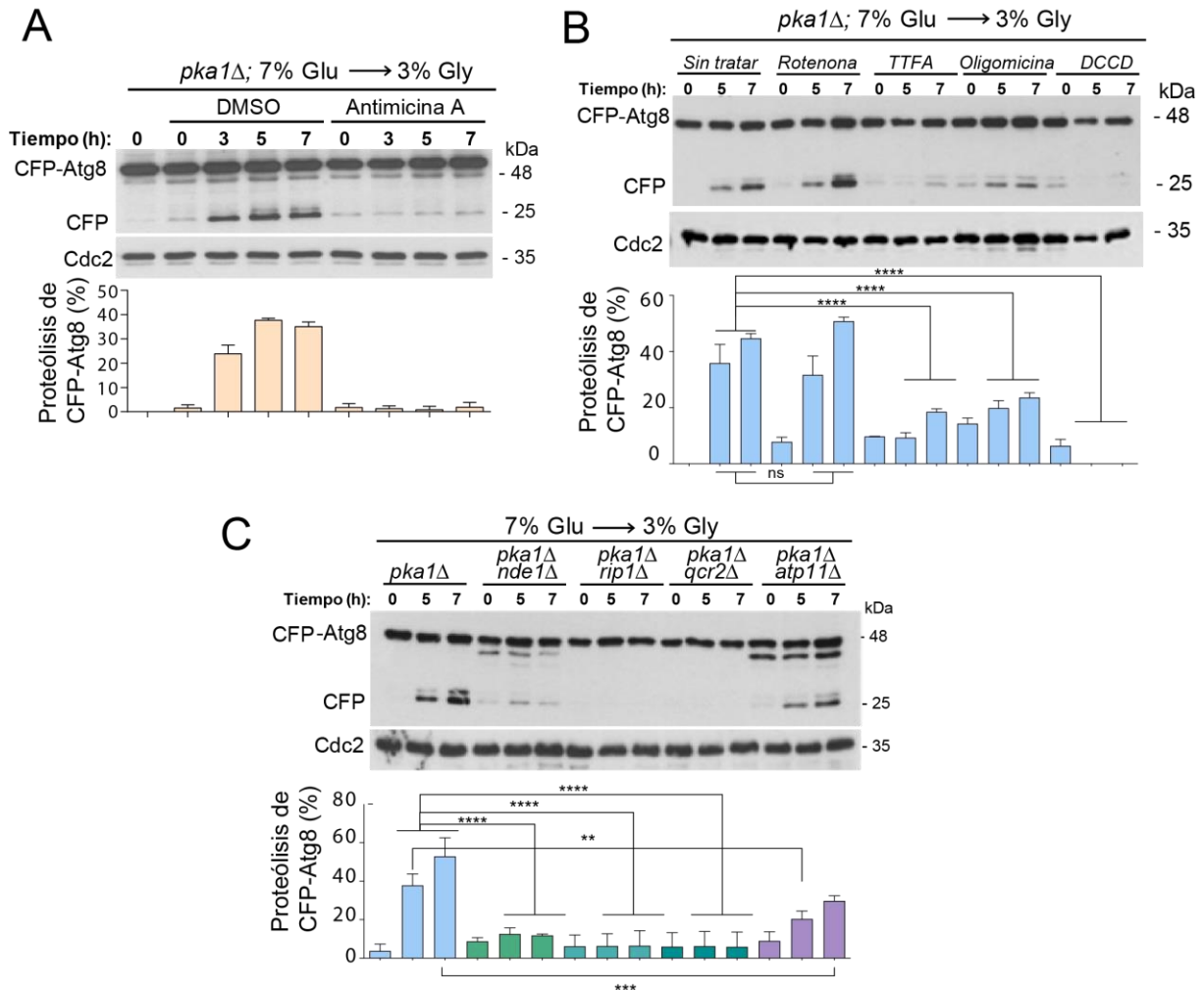


Figura 36. La desrepresión del metabolismo respiratorio dependiente de la inactivación de la señalización de la ruta AMPc-PKA es fundamental para inducir la autofagia tras la inanición de glucosa. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos *pka1Δ* (AJ332), *pka1Δ nde1Δ* (AJ164), *pka1Δ rip1Δ* (AJ709), *pka1Δ qcr2Δ* (AJ713) y *pka1Δ atp11Δ* (AJ167) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. (A y B) La células de la cepa AJ332 fue sometida a un pretratamiento de 1h en presencia de las siguientes dosis de fármacos inhibidores de la ETC mitocondrial (AA 0.5 μ M, rotenona 25,6 μ g/ml, TTF2A 2 mM, oligomicina 10 μ M y DCCD 500 μ M). Posteriormente, las células se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly) en presencia del fármaco. Finalmente, las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos de proteólisis de GFP-Atg8 se muestran como (media \pm SD) y corresponden a triplicados biológicos. ****, $p < 0.0001$; ns, no significativo, calculado por *one-way* ANOVA.

Asimismo, investigamos si la inducción de la autofagia en células *pka1Δ* se veía alterada tras la delección de los genes *nde1⁺* (Complejo I), *rip1⁺*, *qcr2⁺* (Complejo III) y *atp11⁺* (Complejo V). Con este propósito, generamos los dobles mutantes *pka1Δ nde1Δ* (AJ164), *pka1Δ rip1Δ* (AJ709), *pka1Δ qcr2Δ* (AJ713) y *pka1Δ atp11Δ* (AJ167). En consonancia con los datos previamente obtenidos, la eliminación de estos genes, esenciales para las subunidades de los complejos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, inhibió la autofagia en las células *pka1Δ* en ausencia de glucosa (**Figura 36**, panel C). Estos hallazgos respaldan la idea de que la activación del metabolismo respiratorio, consecuencia de la inactivación de la señalización AMPc-PKA, es crucial para inducir la autofagia en condiciones de privación total de glucosa.

Basándonos en los anteriores resultados, postulamos la hipótesis de que una hiperactivación de la señalización a través de la vía AMPc-PKA, por su potencial de reprimir de manera marcada el metabolismo respiratorio, podría inhibir la inducción de la autofagia frente a una limitación de glucosa. Para validar esta suposición, se cultivó la cepa AI05 (*cgs1Δ* CFP-Atg8) en EMM con 7% de glucosa hasta la mitad de la fase exponencial, transfiriéndose a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol. Nuestros resultados mostraron que la activación constitutiva de la ruta AMPc-PKA inhibió la proteólisis de CFP-Atg8 en respuesta a la limitación de glucosa (**Figura 37**).

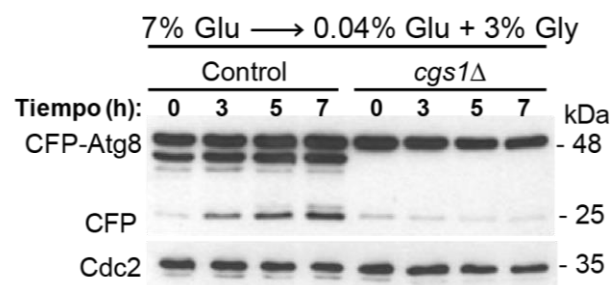


Figura 37. La activación constitutiva de la señalización de la ruta AMPc-PKA bloquea completamente la inducción de la autofagia en respuesta a la limitación de glucosa. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *cgs1Δ* (AI05) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). Se tomaron muestras a distintos tiempos y se procesaron por TCA para análisis posterior mediante Western-blot. Este análisis se realizó haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

4.1 El factor de transcripción Rst2 regula positivamente la autofagia dependiente de la respiración en *S. pombe* en respuesta al déficit de glucosa.

Las evidencias obtenidas en los apartados anteriores sugieren que la vía de señalización AMPc-PKA desempeña un papel crucial en la modulación de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa en *S. pombe*. A continuación, nos planteamos analizar su dependencia del factor de transcripción Rst2, principal diana de esta vía de señalización. En presencia de glucosa, Rst2 es fosforilado por Pka1 en múltiples residuos promoviendo su exclusión nuclear e inactivación (Higuchi et al., 2002). Sin embargo, frente a una limitación de glucosa, la inhibición de Rst2 mediada por Pka1 se revierte, permitiendo su traslocación nuclear y activación para promover la expresión de genes asociados a procesos como la diferenciación sexual, la gluconeogénesis y el metabolismo de fuentes de carbono alternativas (Higuchi et al., 2002; Neely & Hoffman, 2000; Vassiliadis et al., 2019). Para elucidar el papel de Rst2 en la modulación de la autofagia en estas condiciones, las cepas que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *rst2Δ* (AJ176) se cultivaron en medio EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol. Se tomaron muestras a distintos intervalos y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y Western-blot. Los resultados mostraron que la delección de *rst2*⁺ redujo de forma significativa el reclutamiento de CFP-Atg8 a PAS, así como su proteólisis tras una limitación en la disponibilidad de glucosa (**Figura 38**).

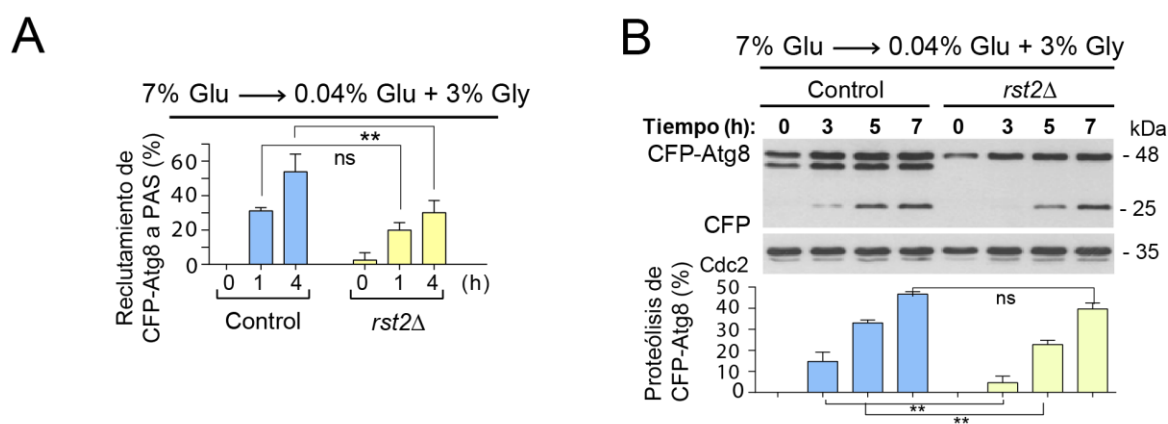


Figura 38. La delección de *rst2*⁺ provoca una reducción significativa en la inducción de la autofagia en respuesta a la limitación de glucosa. Las cepas de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *rst2Δ* (AJ176) se cultivaron en medio EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. (A) El porcentaje de células que reclutan CFP-Atg8 a PAS se estimó en cada momento mediante microscopía de fluorescencia. (B) Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos se muestran como (media ± SD) y corresponden a triplicados biológicos. **, $p < 0.01$; ns, no significativo, calculado por *one-way* ANOVA.

Basándonos en estas observaciones, y considerando la relevancia de Rst2 en el cambio diaúxico, anticipamos que la eliminación del factor de transcripción Rst2 debería inhibir la inducción de autofagia en una cepa de *S. pombe* con un metabolismo respiratorio constitutivo. Esta premisa nos condujo a generar el doble mutante *pka1Δ rst2Δ* (AJ335). Las células de la cepa AJ335 se sometieron a un ayuno de glucosa, tras lo que se tomaron muestras que se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y Western-blot. Como se muestra en la **Figura 39**, el flujo autofágico se inhibió por completo en el doble mutante *pka1Δ rst2Δ* en comparación con el mutante sencillo *pka1Δ*. Este comportamiento refuerza la idea de que el rol predominante de la vía AMPc-PKA en la represión de la autofagia se encuentra vinculado estrechamente a su capacidad para reprimir la actividad de Rst2.

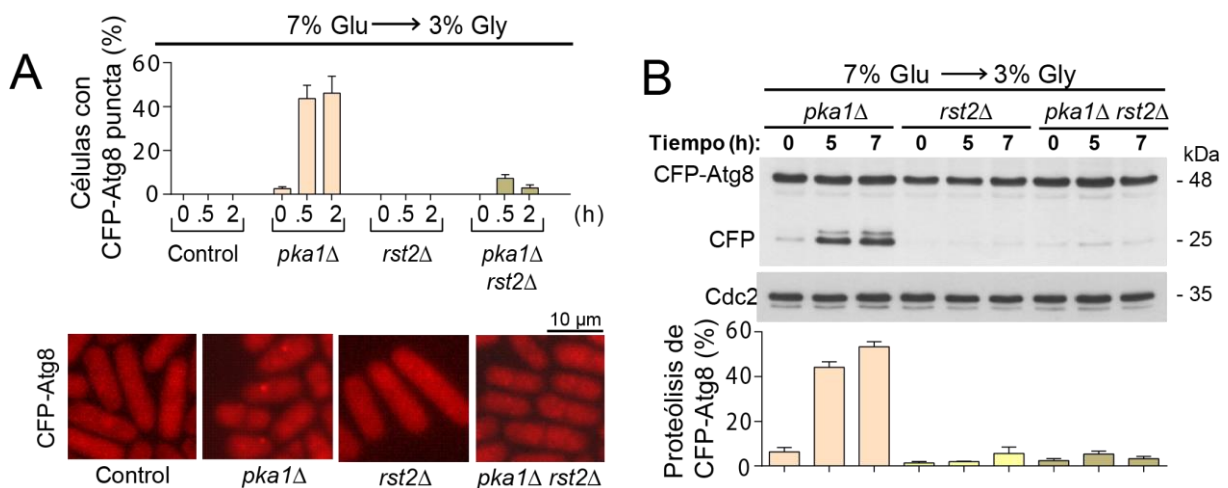


Figura 39. La delección simultanea de *rst2*⁺ y *pka1*⁺ provoca un bloqueo completo del flujo autofágico inducido en respuesta a la inanición de glucosa. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *pka1Δ* (AJ332), *rst2Δ* (AJ176) y *pka1Δrst2Δ* (AJ334) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. (A) El porcentaje de células que reclutan CFP-Atg8 a PAS se estimó en cada momento mediante microscopía de fluorescencia. A continuación, se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de muestras de células que se tomaron a las 0.5 h de incubación. Los datos se muestran como media ± SD y corresponden a triplicados biológicos. (B) Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

De acuerdo con este resultado, cabría esperar que una cepa de *S. pombe* que exprese una versión de Rst2 que carezca de los sitios de fosforilación por Pka1 (Rst2.M3), y que por tanto tienen un metabolismo respiratorio constitutivo, muestre un flujo autofágico similar al de las células *pka1Δ* tras la inanición de glucosa. Para comprobar esta hipótesis, se cultivaron células que expresan las proteínas de fusión CFP-Atg8 y Rst2-HA en los fondos genéticos

control (AJ21), *pka1Δ* (AJ23) y *rst2.M3* (AJ287), en medio EMM con 7% de glucosa. Seguidamente, se transfirieron a EMM con 3% de glicerol y se extrajeron muestras en diferentes momentos para posterior análisis mediante Western-blot. En línea con nuestra hipótesis, y del mismo modo que el mutante *pka1Δ*, las células que expresan la versión de Rst2 que carece de los sitios de fosforilación dependientes de Pka (Rst2.M3) fueron capaces de inducir la proteólisis de CFP-Atg8 en respuesta al ayuno completo de glucosa (**Figura 40**, panel A).

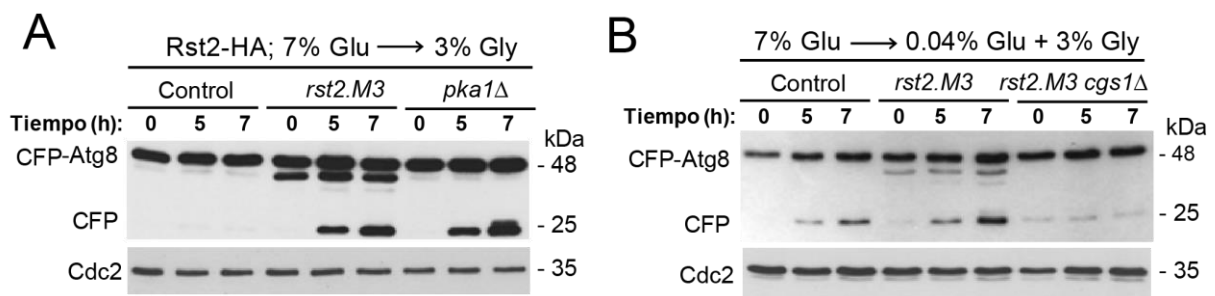


Figura 40. La ruta AMPc-PKA regula negativamente la inducción de la autofagia inducida en respuesta a un déficit de glucosa tanto de manera dependiente como independiente de Rst2. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan las proteínas de fusión CFP-Atg8 y Rst2-HA en los fondos genéticos control (AJ21), *pka1Δ* (AJ23) y *rst2.M3* (AJ287) y *rst2.M3 cgs1Δ* (AJ953) en EMM con 7% glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (A) EMM con 3% de glicerol (3% Gly); (B) EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

Por otro lado, decidimos analizar si la actividad de Pka1 como modulador de la autofagia era totalmente dependiente del factor de transcripción Rst2. Para ello construimos una cepa que combinaba la expresión de Rst2.M3 con la activación constitutiva de la vía de señalización de AMPc-PKA (*cgs1Δ*). Concretamente, se cultivaron células que expresaban las fusiones genómicas CFP-Atg8 y Rst2-HA en los fondos genéticos control (AJ21), *rst2.M3* (AJ287) y *rst2.M3 cgs1Δ* (AJ953) en EMM con 7% glucosa, y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol. Sorprendentemente, la activación constitutiva de la vía de señalización de AMPc-PKA fue capaz de suprimir la inducción de la autofagia observada en las células Rst2.M3 (**Figura 40**, panel B). Este resultado sugiere que, en *S. pombe*, la ruta AMPc-PKA puede regular negativamente la autofagia inducida en respuesta al déficit de glucosa tanto de manera dependiente como independiente de Rst2.

4.2 La inhibición de la señalización de la ruta AMPc-PKA contribuye a aumentar la longevidad celular en *S. pombe* al promover la inducción de la autofagia.

La incubación previa de células de *S. pombe* en un medio con concentraciones bajas de glucosa (0.08%) prolonga significativamente su longevidad cronológica (CLS) tras ser sometidas a inanición de glucosa en comparación con células que fueron inmediatamente privadas de esta fuente de carbono (Masuda et al., 2016). En vista de que la vía AMPc-PKA es un importante regulador del CLS de *S. pombe* (Roux et al., 2006; Zuin, Castellano-Esteve, et al., 2010), decidimos analizar si ese aumento del CLS en estas condiciones está ligado a una inducción de la autofagia.

Para abordar esta cuestión, comparamos si el aumento de la longevidad en células *pka1Δ* es similar al de las células control previamente adaptadas a la escasez de glucosa. Además, analizamos si el CLS de las células *pka1Δ* experimenta una mejora tras una preadaptación a la escasez de glucosa. Con este objetivo, cultivamos células que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *pka1Δ* (AJ332) en un medio EMM con un 7% de glucosa. Después, se procedió a recoger las células mediante filtración, redistribuyéndolas en dos medios distintos: (i) EMM con 7% de sorbitol (ayuno completo con sorbitol, fuente de carbono no metabolizable por *S. pombe*) por un periodo de 7 días; y (ii) EMM con 0.08% de glucosa más un 7% de sorbitol (condición limitante de glucosa) durante 6 horas, y transferencia a EMM con 7% de sorbitol. A lo largo del experimento, se extrajeron muestras en intervalos definidos, que se cultivaron en placas de medio rico para posteriormente calcular el porcentaje de unidades formadoras de colonia (%UFC). Esta métrica nos proporciona información valiosa sobre el porcentaje de células que logran entrar en un efectivo estado de quiescencia y que, posteriormente, pueden reanudar el crecimiento en presencia de glucosa. De acuerdo con nuestra hipótesis, el CLS de las células *pka1Δ* ante la privación de glucosa fue similar al de las células control preincubadas con glucosa al 0.08%. Además, el CLS de las células *pka1Δ* mejoró aún más con la preadaptación en un medio con una disponibilidad limitada de glucosa (**Figura 41**).

En estudios previos en *Saccharomyces cerevisiae*, se ha evidenciado que la autofagia desempeña un papel crucial en la prolongación de su vida útil cuando se cultiva en concentraciones reducidas de glucosa (Alvers et al., 2009). A partir de esta observación, y alineados con el enfoque central de esta sección, nos propusimos determinar si esta inducción de la autofagia podría explicar, al menos en parte, el aumento observado en la esperanza de vida de *S. pombe* bajo condiciones similares. Para ello, replicamos la metodología anteriormente descrita, pero en esta instancia utilizando las cepas control (AI30) y la cepa mutante *atg1Δ* (AJ311). Los resultados mostraron que en comparación con el control, el CLS

se redujo considerablemente en las células de *S. pombe* carentes de la quinasa Atg1, tanto tras un ayuno completo de glucosa como tras una preincubación en un medio con una disponibilidad limitada de glucosa (**Figura 41**). Este resultado corrobora la importancia de la autofagia en la extensión del CLS de *S. pombe* en ambientes con baja concentración glucídica.

Del mismo modo, se analizó si la eliminación simultánea de *atg1*⁺ reducía significativamente la longevidad de las células *pka1Δ* en respuesta a la inanición de glucosa en ambas condiciones. Para validar nuestra hipótesis, repetimos el experimento anterior, haciendo uso en esa ocasión de las cepas *pka1Δ* (AI30) y *pka1Δ atg1Δ* (AJ83) de *S. pombe*. Los resultados del experimento muestran que en *S. pombe*, el aumento del CLS tras la inactivación de la señalización dependiente de la vía AMPc-PKA depende, al menos en parte, de la inducción de la autofagia (**Figura 41**).

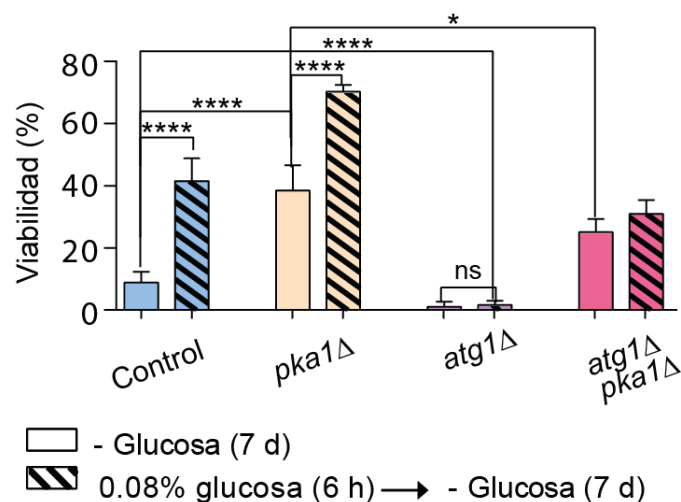


Figura 41. La inducción de la autofagia lograda tras el déficit de glucosa o el apagado de la señalización de la ruta AMPc-PKA promueve el CLS en *S. pombe*. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *pka1Δ* (AJ332) en EMM con 7% de glucosa hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (i) EMM con 7% de sorbitol; o (ii) se preincubaron en EMM con 0.08% de glucosa más 7% sorbitol durante 6h y luego se transfirieron a EMM con 7% de sorbitol. Los cultivos se incubaron durante 7 días en EMM sin glucosa. La viabilidad celular en cada muestra se midió contando las unidades formadoras de colonias (UFC; 3 días a 30°C), y se expresa como la relación entre el número de colonias formadas y el número total de células sembradas. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes (media ± SD). ****, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$; ns, no significativo, calculado mediante *one-way* ANOVA.

5. La AMPK no está implicada en la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en *S. pombe*.

La vía de señalización mediada por la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) desempeña un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética celular, adaptando el metabolismo celular a los cambios ambientales en función de los niveles disponibles de ATP (Adnan et al., 2017; Galdieri et al., 2010; Gancedo, 1998; Hardie, 2007). En *S. cerevisiae*, la AMPK Snf1, junto con Mec1/ATR, Atg1 y Atg13, constituye un módulo funcional crucial ubicado en la superficie mitocondrial esencial para establecer un metabolismo respiratorio óptimo (Yi et al., 2017); el cual a su vez es necesario para la adecuada activación de Atg1 (Gross & Graef, 2020; Yi et al., 2017). Por su parte, en *S. pombe* la función de la AMPK Ssp2 en la regulación de la autofagia no ha sido explícitamente delineada. No obstante, se ha postulado una potencial intervención dada su conocida función como inhibidor de la vía de señalización de TORC1 (Alao et al., 2023). Frente a este escenario, nos propusimos determinar si, bajo estas condiciones de escasez glucídica, la señalización mediada por AMPK en *S. pombe* tiene algún impacto en la activación de la autofagia.

En primer lugar, construimos cepas que carecían de *ssp2*⁺ (ortólogo de Snf1/AMPK) (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012) y *rad3*⁺ (ortólogo de Mec1) (Lopez-Girona et al., 2001). Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *ssp2Δ* (AJ1004) y *rad3Δ* (AJ478) en medio EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a medio EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol. Se obtuvieron muestras a diferentes tiempos y se analizaron mediante Western-blot. De forma inesperada, los datos obtenidos revelaron que la ausencia de Ssp2 o de Rad3 no influyó en la inducción de la autofagia ante la limitación de glucosa (**Figura 42**, panel A). Estas observaciones indican que los mecanismos que rigen la autofagia en respuesta a esta señal particular han seguido rutas evolutivas distintas en estas dos especies de levadura.

De acuerdo con estos resultados, la eliminación simultánea de *ssp2*⁺ y *pka1*⁺ no debería afectar a la inducción de la autofagia tras un ayuno completo de glucosa. Para validar esta hipótesis, cultivos de células de las cepas *pka1Δ* (AJ332) y *pka1Δ ssp2Δ* (AJ1006) se cultivaron en medio EMM con 7% de glucosa hasta la mitad de la fase exponencial. Posteriormente, las células se transfirieron a un medio EMM con 3% glicerol, se obtuvieron muestras a diferentes tiempos y se analizaron mediante Western-blot. Tal y como hipotetizamos, no se observó ningún defecto en la inducción de la autofagia en el doble mutante *pka1Δ ssp2Δ* respecto a las células *pka1Δ* ayunadas de glucosa (**Figura 42**, panel B). En resumen, estos datos refuerzan la idea de que la AMPK no juega un papel crucial en la modulación de la autofagia ante la carencia de glucosa en *S. pombe*.

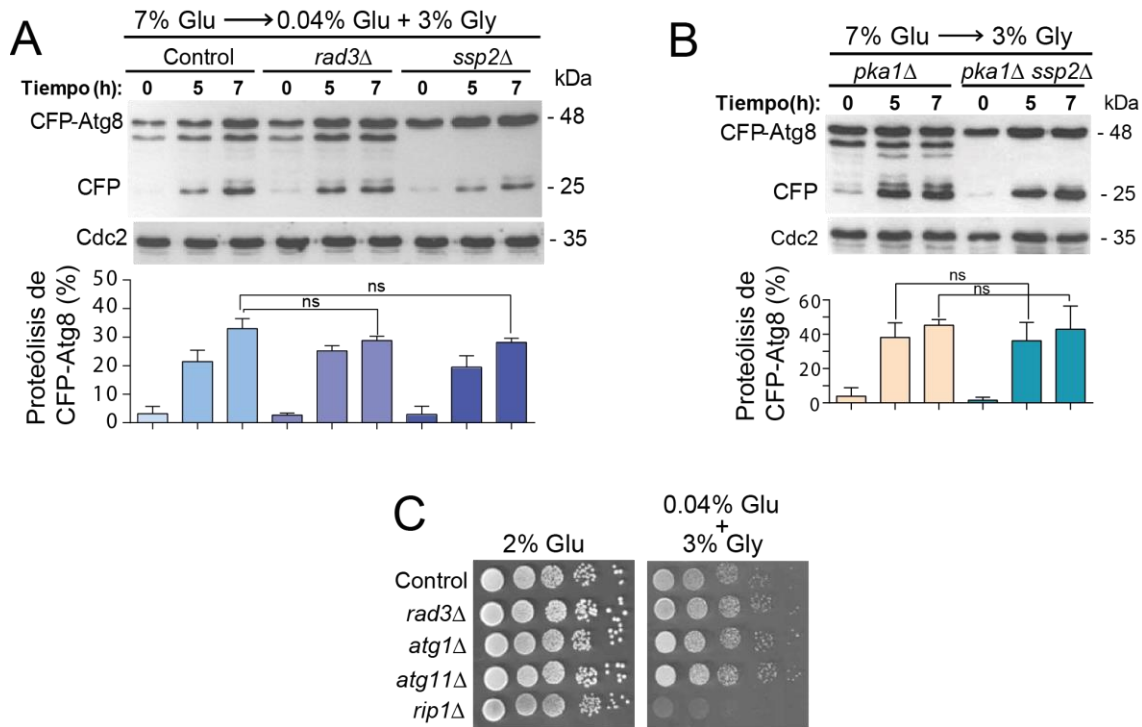


Figura 42. En *S. pombe*, ni la AMPK Ssp2, ni Rad3 están implicados en la regulación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa. (A y B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *ssp2Δ* (AJ1004), *rad3Δ* (AJ478), *pka1Δ* (AJ332) y *pka1Δ ssp2Δ* (AJ1006), en medio EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (A) EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly); (B) EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos de proteólisis de GFP-Atg8 se muestran como (media \pm SD) y corresponden a réplicas biológicas. ns, no significativo, calculado mediante *one-way* ANOVA. (C) Diluciones seriadas de las cepas AI30 (control), AJ478 (*rad3Δ*), AJ311 (*atg1Δ*), AJ312 (*atg11Δ*) y AJ26 (*rip1Δ*), en placas sólidas de YES 2 % Glu y YES 0.04% Glu más 3% Gly. Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días y se fotografiaron. Se muestra un experimento representativo.

Por otro lado, decidimos analizar si en *S. pombe*, la autofagia inducida en respuesta a la escasez de glucosa está implicada en la regulación de la función mitocondrial. Para ello, realizamos un ensayo de crecimiento en gota, en el que se hicieron diluciones seriadas de las cepas control (AI30), *rad3Δ* (AJ478), *atg1Δ* (AJ311), *atg11Δ* (AJ312) y *rip1Δ* (AJ26) que se sembraron en placas de medio sólido YES con 2% de glucosa o YES con 0.04% de glucosa más 3% glicerol (crecimiento respiratorio). Nuestros resultados mostraron que, contrariamente a las células de *S. pombe* carentes de Ssp2 que son defectuosas en la respiración y no pueden asimilar el glicerol (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012), los mutantes *rad3Δ*, *atg1Δ* y *atg11Δ* crecieron normalmente con esta fuente de carbono (**Figura 42**, panel C), lo que indica que la autofagia quizá no tenga un papel preponderante en la modulación de la función mitocondrial.

5.1 La represión génica mediada por Scr1 modula la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa.

La vía de señalización mediada por la AMPK juega un papel crucial en la regulación de la represión catabólica (CCR) a través de la modulación de la localización del represor transcripcional Scr1. Tras un déficit de glucosa, Ssp2 fosforila a Scr1 promoviendo su inactivación y exclusión del núcleo. Paralelamente, factores de transcripción como Rst2 son translocados al núcleo, lo que promueve la activación de genes esenciales para el cambio diaúxico (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012). Es importante destacar que, en la cepa mutante *ssp2Δ*, Scr1 permanece en el núcleo, restringiendo la activación de estos genes incluso después de que la glucosa se haya agotado (Matsuzawa, Fujita, et al., 2012). Por su parte, la delección de *scr1⁺* provoca una desrepresión constitutiva del 1.5% del genoma de *S. pombe*, observándose un incremento en la expresión de genes como *fbp1⁺*, *gld1⁺* y *ght5⁺*, en presencia de glucosa (Vassiliadis et al., 2019). Es por esto que decidimos evaluar si la delección del represor transcripcional Scr1 era suficiente para promover la inducción de la autofagia en condiciones de limitación de glucosa. Como cabía esperar, las células de la cepa *scr1Δ* lograron inducir la autofagia de manera destacada después de un ayuno completo de glucosa, en contraste con la cepa control (**Figura 43**, panel A).

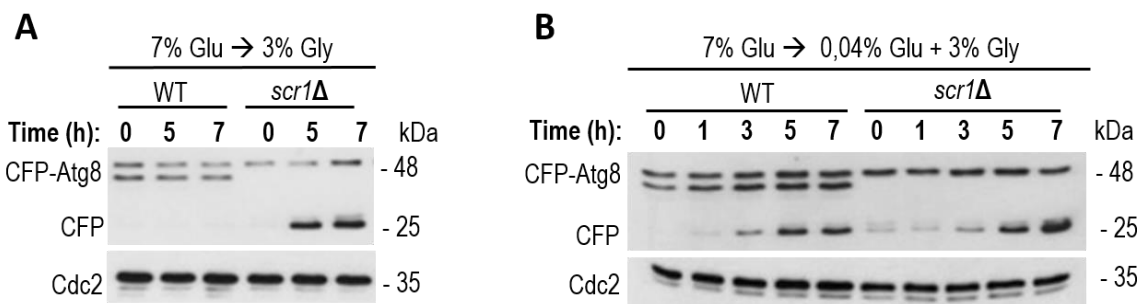


Figura 43. En *S. pombe* la delección del represor transcripcional Scr1 promueve la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa. Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30) y *scr1Δ* (AJ1178) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (A) EMM con 3% de glicerol (3% Gly); (B) EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). Se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestra un experimento significativo del resultado. Se muestra un experimento significativo del resultado.

Adicionalmente, la eliminación del gen *scr1⁺* aceleró notablemente la cinética de proteólisis de CFP-Atg8 (**Figura 43**, panel B), un comportamiento semejante al observado en el mutante *pka1Δ* bajo condiciones de escasez de glucosa (**Figura 33**, panel B). Estos hallazgos evidencian la crucial influencia de Scr1 y, consecuentemente, de la CCR de *S. pombe* en la modulación de la inducción autofágica frente a la limitación de glucosa.

6. La ruta de señalización de MAPK de respuesta a estrés SAPK regula positivamente la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en *Schizosaccharomyces pombe*.

La vía de señalización SAPK y su elemento central la MAPK Sty1 desempeñan un papel fundamental en *S. pombe* al modular el ciclo celular y la respuesta adaptativa general a las señales ambientales, incluidos los cambios en la disponibilidad de nutrientes como la glucosa (Pérez & Cansado, 2010). Ante un estímulo estresante, la MAPK Sty1 localizada en el citoplasma es activada y translocada al núcleo donde, entre otras funciones, fosforila al factor de transcripción Atf1 para inducir la expresión de un conjunto de genes de respuesta a estrés, CESR (Chen et al., 2003; Lawrence et al., 2007). Entre estos genes encontramos a *fbp1⁺* (fructosa-1,6-bisfosfatasa, Fbp1) o *ctt1⁺* (catalasa), cuyos respectivos productos proteicos son necesarios para la asimilación de fuentes de carbono no fermentables y la atenuación del estrés oxidativo endógeno inducido ante el déficit de glucosa (Chen et al., 2003; Neely & Hoffman, 2000).

En *S. pombe* se ha descrito que la restricción calórica, la entrada en fase estacionaria, y la pérdida de función de la ruta AMPc-PKA promueven la activación de la MAPK Sty1 consiguiendo una extensión del CLS (Zuin, Carmona, et al., 2010; Zuin, Castellano-Esteve, et al., 2010). Además, en glucosa, las células *pka1Δ* de exhiben una activación parcial de Atf1, que promueve el desplazamiento de nucleosomas del promotor de *fbp1⁺* (Sánchez-Mir et al., 2020). En estas condiciones, Scr1 permanece unido al promotor compitiendo con Rst2 para su unión a UAS2 (Hirota et al., 2006). No obstante, resultados recientes demuestran que, en glucosa, las células carentes de *scr1Δ* presentan una desrepresión significativa de *fbp1⁺* respecto al control, lo que sugiere la posible intervención de Rst2 y/o Atf1 en estas condiciones (Sánchez-Mir et al., 2020). En conjunto, estas evidencias sugieren la existencia de sofisticados mecanismos de competición por la unión a la región reguladora de la expresión de los genes reprimidos en la CCR, donde dominan los factores de transcripción como Rst2 y Atf1, frente a los represores de la transcripción (Scr1 y complejo Tup/Ssn6).

En base a estos antecedentes, nos planteamos como objetivo explorar el posible papel de la vía SAPK durante la inducción de la autofagia en respuesta a al déficit de glucosa. Para ello, células que expresan una fusión genómica de CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *sty1Δ* (AJ84) y *atf1Δ* (AJ194) se cultivaron en EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a medio EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol. Tras tomar las correspondientes muestras, realizamos un análisis mediante Western-blot. Los resultados muestran que la eliminación de *sty1⁺* o *atf1⁺* provocó una reducción parcial, pero significativa, de la proteólisis de CFP-Atg8 en comparación con las células control en respuesta a una limitación de glucosa (**Figura 44**, panel A). Estos datos sugieren un papel crucial de la señalización a través de la vía SAPK en la modulación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa. De manera inesperada, y a diferencia de la autofagia inducida por el ayuno de nitrógeno, esta respuesta depende del factor de transcripción Atf1 (Corral-Ramos et al., 2021).

A continuación, exploramos la relevancia funcional de la vía SAPK en la inducción del flujo autofágico en células *pka1Δ* durante el ayuno de glucosa. Como cabía esperar, la ausencia simultánea de Sty1 o Atf1 en células *pka1Δ* provocó una supresión completa del flujo autofágico tras un ayuno completo de glucosa (**Figura 44**, panel B).

En conclusión, en las levaduras de fisión, la regulación de la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa está ejercido, en parte, a nivel transcripcional por las vías de señalización AMPc-PKA y SAPK a través de Rst2 y Atf1, respectivamente (**Figura 44**, panel C). Esta coordinación y superposición de vías resalta la complejidad y adaptabilidad de la célula para responder a cambios ambientales, en particular a la disponibilidad de glucosa.

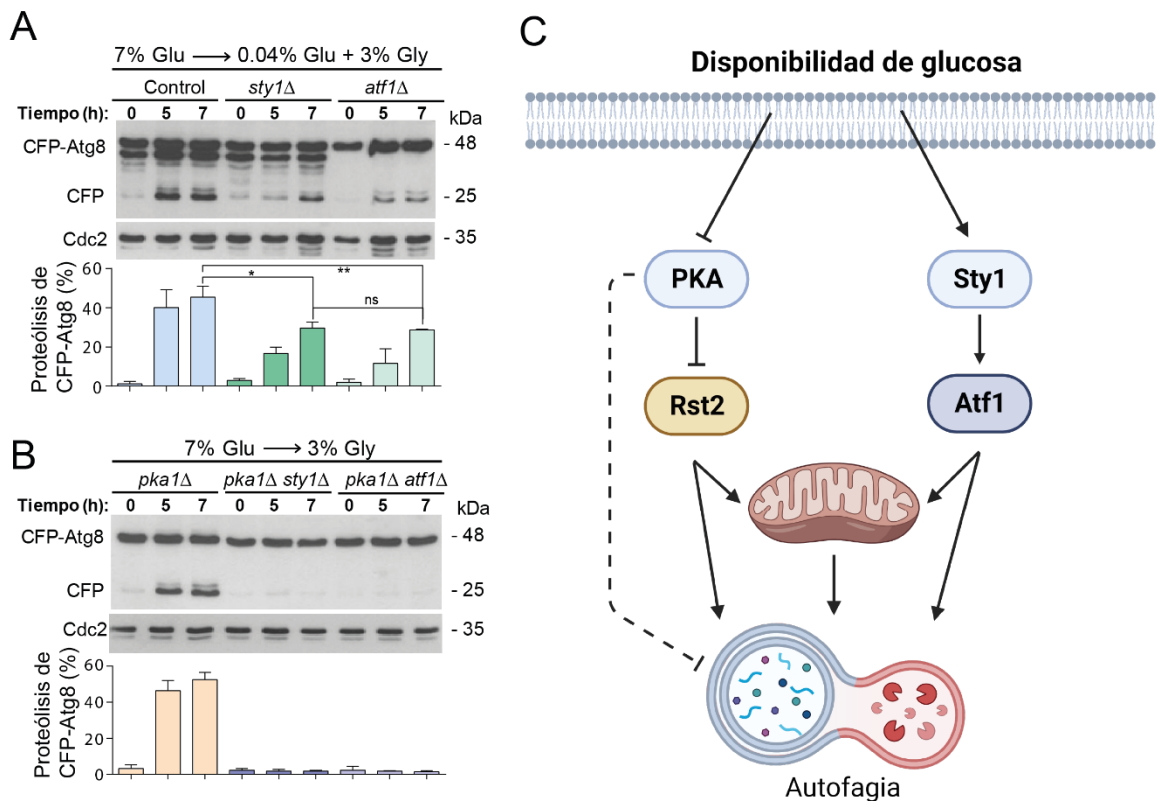


Figura 44. La ruta SAPK regula positivamente la inducción de la autofagia inducida en respuesta a un déficit de glucosa de manera dependiente de Atf1. (A) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *sty1Δ* (AJ84) y *atf1Δ* (AJ194) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly); (B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos *pka1Δ* (AJ332), *pka1Δ sty1Δ* (AJ981) y *pka1Δ atf1Δ* (AJ208) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los resultados se muestran como expresión relativa (media ± SD) de tres repeticiones biológicas. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ calculado mediante *one-way* ANOVA. (C) Modelo de la regulación de la inducción de autofagia en respuesta al agotamiento de la glucosa en *S. pombe*. La regulación transcripcional de la autofagia ante un déficit de glucosa está mediado por las vías de señalización AMPc-PKA y SAPK a través de Rst2 y Atf1, respectivamente. En el modelo también se recoge, el papel adicional que tiene la PKA en la modulación postranscripcional de la autofagia que es independiente de Rst2.

7. Las vías de señalización nutricional SAPK y AMPc-PKA modulan transcripcionalmente la inducción de la autofagia tras el déficit de glucosa.

Una vez establecido que la modulación transcripcional de la inducción de la autofagia depende principalmente de las vías de señalización AMPc-PKA-Rst2 y Sty1-Atf1, nos propusimos elucidar los genes específicos que, en respuesta a la escasez de glucosa, son regulados por estas dos ramas transcripcionales. A fin de lograr este propósito, recurrimos al análisis de perfiles de expresión génica mediante micromatrices de ADN. Este método ha sido validado en la literatura científica por su capacidad para ofrecer una visión detallada y exhaustiva de las dinámicas transcripcionales en distintos contextos celulares, siendo particularmente útil en estudios de procesos complejos asociados a la CCR (Anderson & Weindruch, 2010; Sun et al., 2022; Vassiliadis et al., 2019).

Concretamente, nos centramos en analizar aquellos genes cuya expresión resultase dependiente tanto de Atf1 como de Rst2 en células *pka1Δ*. Para ello, las cepas AI30 (control, CFP-Atg8), AJ336 (*pka1Δ CFP-Atg8*), AJ335 (*pka1Δ rst2Δ CFP-Atg8*) y AJ208 (*pka1Δ atf1Δ CFP-Atg8*) se cultivaron en EMM con 7% de glucosa hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial. A continuación, se tomaron muestras para extracción de ARN, el cual posteriormente fue convertido a ADNc y se analizó mediante micromatrices de ADN (DNA *microarrays*). Nuestros resultados mostraron que tal y como se describe en (J. Liu, Y. Jia, et al., 2015), en comparación con las células control, la ausencia de *pka1+* desencadenó alteraciones sustanciales en la expresión génica, afectando alrededor del 21% del genoma total de *S. pombe*. Específicamente, esto representa a 1106 de 5130 genes ($p < 0.05$; FDR < 0.05 ; valor de $\text{Log}_2\text{FC} \geq 3$). Del conjunto de genes afectados, 512 se encontraban sobreexpresados, mientras que 594 mostraron una expresión reducida (**Figura 45**).

Dentro del conjunto de genes sobreexpresados en el mutante *pka1Δ*, se identificó que los niveles de expresión de 336 genes (equivalente al 65% de los 512 genes inducidos) se redujeron de manera notable en ausencia de *rst2+* (**Figura 45**). Para validar los datos arrojados por las micromatrices, se recurrió a la identificación de genes cuyo patrón de expresión, según la literatura, se incrementa en ausencia de la función de Pka1 y que depende de la actividad transcripcional de Rst2. Un claro ejemplo son los genes *fbp1+* y *ste11+* (un factor de transcripción) (Hirota et al., 2003; Kunitomo et al., 2000).

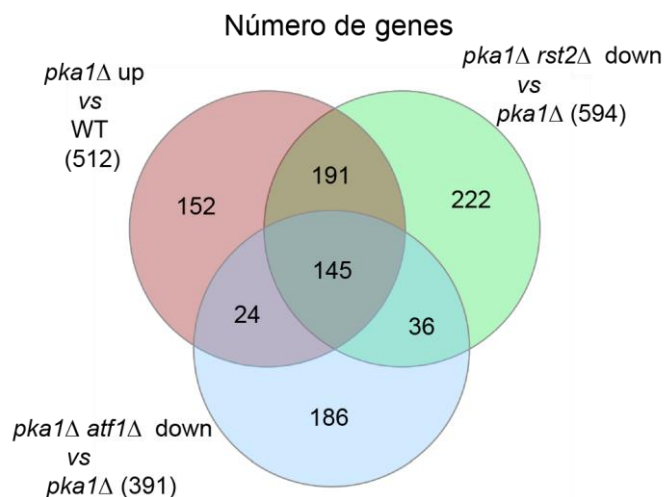


Figura 45. Genes cuya expresión depende en gran medida tanto de Atf1 como de Rst2 en células *pka1Δ*. Diagramas de Venn que indican la superposición en el número de genes regulados positivamente que están expresados diferencialmente en células *pka1Δ* y cuya expresión es dependiente de Rst2, Atf1 o ambos factores de transcripción.

De manera similar, la eliminación simultánea de *rst2⁺* y *pka1⁺* agudizó más la represión del 50% de los genes cuya expresión estaba reprimida en las células *pka1Δ* (304 de 594 genes) (**Figura 45**). En resumen, estos datos confirman que la regulación de la transcripción por la vía AMPc-PKA en *S. pombe* depende en gran medida de la función Rst2.

En la levadura de fisión *S. pombe*, Atf1 desempeña un papel crucial en la adaptación a cambios ambientales abruptos. Esta proteína regula la expresión de una amplia variedad de genes codificantes y no codificantes (nc) que son inducidos en condiciones de déficit de glucosa. Notablemente, estudios recientes han resaltado el papel modulador de redes específicas de lncRNA (“*long non-coding RNA*”) en sentido/antisentido durante las fases tempranas de escasez de glucosa. Estos lncRNA influyen en la expresión de genes dependientes de Atf1, facilitando así una transición hacia el crecimiento no (Oda et al., 2015). Al comparar el perfil de expresión génica de las células *pka1Δ* con el de las células *pka1Δ atf1Δ*, observamos que aproximadamente un tercio (33%) de los genes sobreexpresados en el mutante *pka1Δ* (169 de 512 genes) mostraron una disminución significativa en el doble mutante *pka1Δ atf1Δ* (**Figura 45**). Sorprendentemente, la mayoría de estos genes que dependen de Atf1 (86% o 145 de 169 genes) se encuentran también dentro del conjunto de los 336 genes cuya expresión es dependiente de Rst2 en el mutante *pka1Δ* (**Figura 45**). Estos hallazgos sugieren que tanto Rst2 como Atf1 contribuyen de manera sinérgica a potenciar la expresión de un conjunto significativo de genes en ausencia de la actividad de la vía AMPc-PKA durante condiciones de déficit de glucosa.

A continuación, realizamos una categorización funcional de los 145 genes cuya expresión es codependiente de Atf1 y Rst2, utilizando un análisis de enriquecimiento basado en la ontología de genes (GO, *Gene Ontology*). Las categorías más destacadas comprendieron: genes relacionados con la regulación del metabolismo del glicerol (GO:0006071; 25.1 veces), genes implicados en la regulación positiva de la cascada MAPK de respuesta de feromonas (GO:0062038; 22.1 veces), y aquellos vinculados a la respuesta celular a ROS (GO: 0034614; 11,7 veces) (**Figura 46**). Además, otras categorías relevantes incluyeron genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (GO: 0005975; 6,2 veces) y genes involucrados en la regulación de la conjugación (GO: 0031139; 5.1 veces) (**Figura 46**).

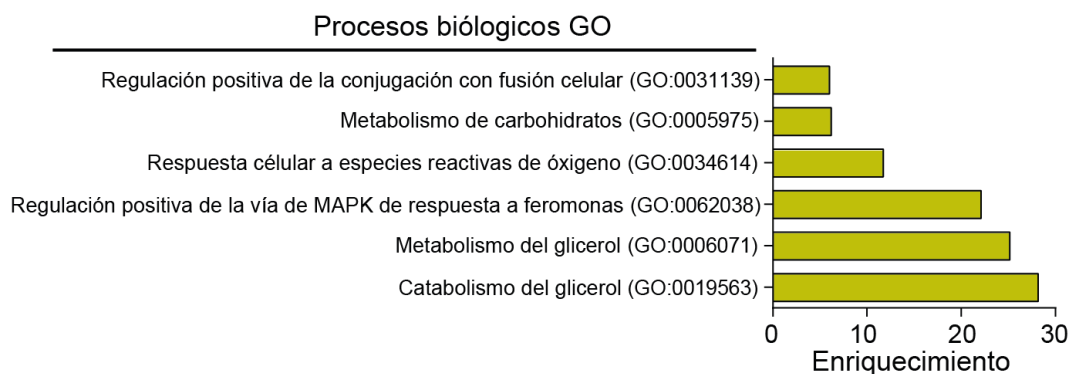


Figura 46. Principales procesos biológicos dependientes de los factores de transcripción Rst2 y Atf1 en células *pka1Δ*. Análisis de enriquecimiento de GO (procesos biológicos) de las categorías relevantes identificadas dentro de los 145 genes regulados al alza que se encuentran en las células *pka1Δ* cuya expresión depende de los factores de transcripción Rst2 y Atf1.

Entre los genes identificados mediante GO, los relacionados con el metabolismo del glicerol capturaron particularmente nuestra atención, incluyendo a *gld1⁺*, *dak1⁺*, *dak2⁺*, *gpd1⁺* y *gut2⁺* (**Figura 47**). Como mencionamos anteriormente, en *S. pombe*, Gld1 desempeña un papel fundamental en la asimilación del glicerol, catalizando su oxidación a dihidroxiacetona (DHA). Posteriormente, el DHA es fosforilado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por las quinasas Dak1 y Dak2, que actúan de manera redundante, y finalmente, es isomerizado a gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) para ser incorporado en la ruta glicolítica (Flores et al., 2000; Matsuzawa, Hara, et al., 2012; Matsuzawa et al., 2010). Por su parte, Gut2 y Gpd1 participan en la lanzadera G3P de NADH mitocondrial, convirtiendo el DHAP en G3P y viceversa (**Figura 47**) (Flores et al., 2000).

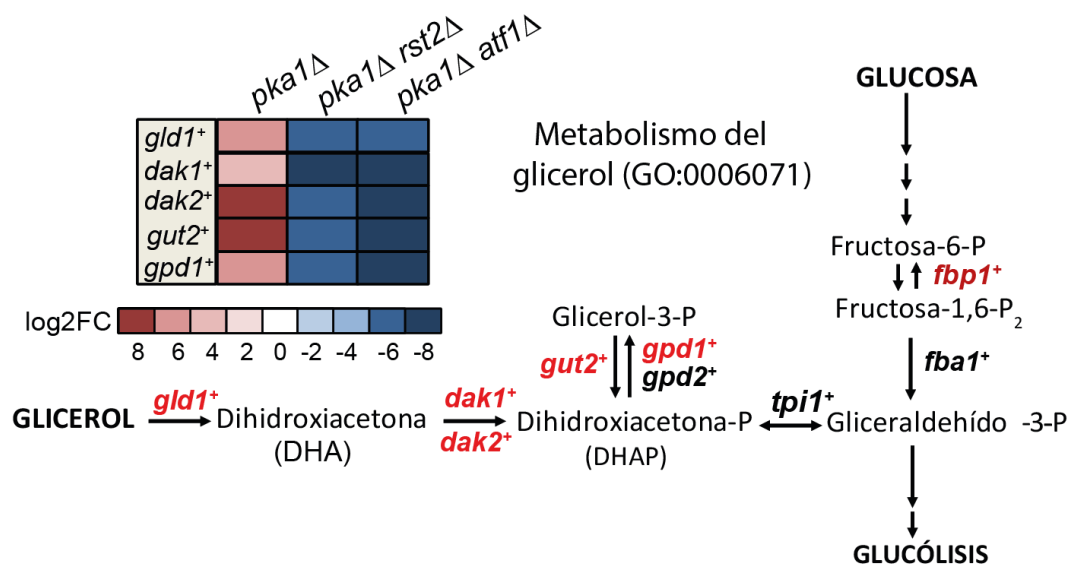


Figura 47. La regulación de los genes implicados en el metabolismo del glicerol depende en gran medida de los factores de transcripción Rst2 y Atf1 en las células *pka1Δ* de *S. pombe*. Mapa térmico comparativo de Log2FC en las cepas AJ332 (*pka1Δ*), AJ335 (*pka1Δ rst2Δ*) y AJ208 (*pka1Δ atf1Δ*); para los genes identificados implicados en el metabolismo del glicerol (GO: 0006071). También se muestra un mapa metabólico de los genes del metabolismo del glicerol en *S. pombe*. Los genes identificados en los experimentos de *microarrays* están marcados en rojo.

Tal y como vimos, en *S. pombe*, la expresión de *gld1+* es inhibida por Scr1 a elevadas concentraciones de glucosa, induciéndose tras el déficit de glucosa. Por su parte, la expresión de *dak1+* y *dak2+* en estas condiciones se encuentra regulada por el complejo Tup11/12 y es independiente de Scr1 (Matsuzawa et al., 2010). Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos validar los resultados del *microarray* mediante un análisis RtgPCR enfocado en estos genes, cruciales para el metabolismo del glicerol. Estos experimentos reafirmaron que la ausencia de *pka1+* conduce a un incremento significativo en los niveles de ARNm de estos genes en comparación con las células control. En particular, se observó un marcado incremento en la expresión de *gld1+*, *dak1+* y *dak2+*, mientras que los genes *gut2+* y *gpd1+* mostraron cambios menos pronunciados (**Figura 48**). La delección simultánea de *rst2+* o *atf1+* en células *pka1Δ* redujo significativamente los niveles de expresión de ARNm de estos genes (**Figura 48**), lo que confirma que la desrepresión génica en ausencia de Pka1 depende de ambos factores de transcripción.

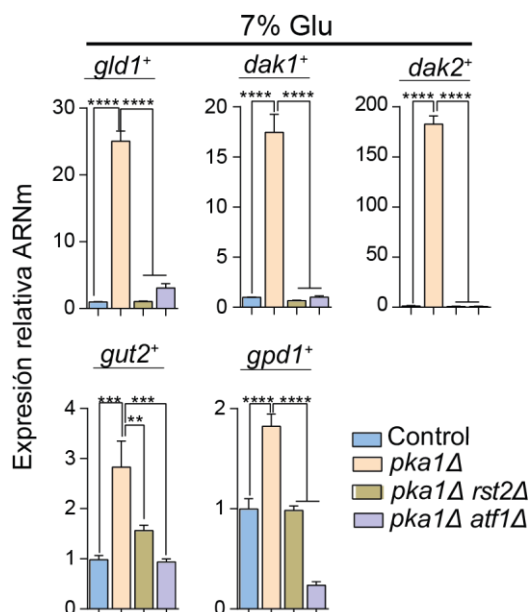


Figura 48. La expresión génica basal de los principales genes implicados en el metabolismo del glicerol aumenta en las células *pka1Δ*. Los niveles de ARNm de los genes: *gld1+*, *dak1+*, *dak2+*, *gut2+* y *gpd1+*; se midieron mediante qPCR a partir de ARN total extraído de muestras de células correspondientes a las cepas AJ30 (control), AJ332 (*pka1Δ*), AJ335 (*pka1Δ rst2Δ*) y AJ208 (*pka1Δ atf1Δ*); de *S. pombe* que expresan una fusión genómica CFP-Atg8, y que crecían exponencialmente en EMM con 7% de glucosa (7% Glu). Los resultados se muestran como expresión relativa (media \pm SD) de tres repeticiones biológicas. ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, calculado mediante one-way ANOVA.

A continuación, nos propusimos corroborar si las variaciones observadas a nivel de expresión génica también se reflejaban en los niveles de proteína. Para ello, se cultivaron células que expresaban la proteína de fusión Gld1-HA en los fondos genéticos control (AJ910), *pka1Δ* (AJ944), *pka1Δ rst2Δ* (AJ1017) y *pka1Δ atf1Δ* (AJ1012) en EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a EMM con 3% glicerol. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para su posterior análisis mediante Western-blot. Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles de Gld1-HA en las células *pka1Δ*, tanto en presencia como en ausencia glucosa, en comparación con el control, y que dependía en gran medida de Rst2 y/o Atf1 (**Figura 49**, panel A). Una vez verificados los datos obtenidos en el *microarray*, en los que se observa un aumento en la expresión de genes implicados en el metabolismo del glicerol, hipotetizamos que los mutantes carentes de componentes esenciales de la ruta AMPc-PKA pudieran exhibir una capacidad de crecimiento en un medio donde el glicerol constituyera la única fuente. Para valorar esta cuestión, realizamos un ensayo de crecimiento en gota, donde se hicieron diluciones seriadas de las cepas control (AJ30), *git3Δ* (AJ306), *gpa2Δ* (AJ361), *cyr1Δ* (AJ308), *pka1Δ* (AJ332), *cgs1Δ* (AJ005) y *rst2Δ* (AJ176) en placas sólidas de YES al 2% de glucosa o YES al 3% glicerol. En contraste con la cepa control, los mutantes *gpa2Δ*, *cyr1Δ* y *pka1Δ*, y en menor medida *git3Δ*, fueron capaces de proliferar en un medio que contenía glicerol como única fuente de carbono (**Figura 49**, panel B).

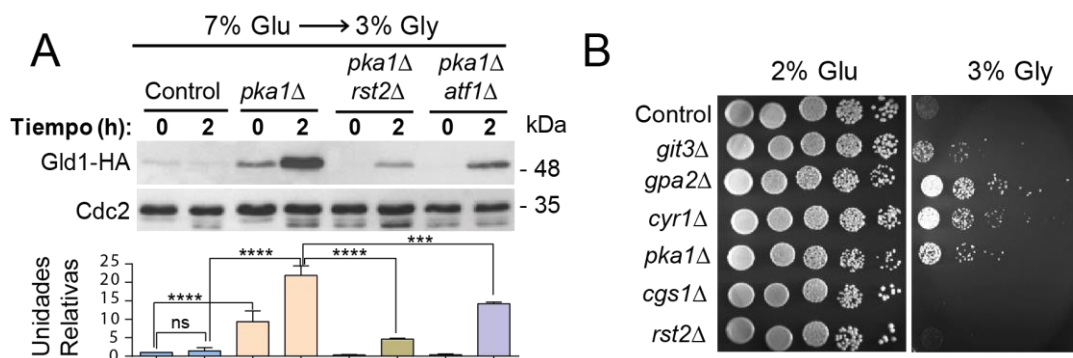


Figura 49. La expresión constitutiva de los genes del metabolismo del glicerol, dependiente de los factores de transcripción Rst2 y Atf1, permite el crecimiento de mutantes nulos para componentes la ruta AMPc-PKA en medios donde el glicerol es la única fuente de carbono disponible. (A) Los niveles de expresión de una fusión genómica Gld1-HA se determinaron en células de *S. pombe* de las cepas AJ910 (control), AJ944 (*pka1Δ*), AJ1017 (*pka1Δ rst2Δ*) y AJ1012 (*pka1Δ atf1Δ*). Estas células se cultivaron en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de la fase exponencial de crecimiento, y posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-HA-HRP (detección de la fusión Gld1-HA) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los resultados se muestran como expresión relativa (media ± SD) de tres repeticiones biológicas. ****, $p < 0.0001$; ns, no significativo, calculado mediante ANOVA unidireccional. (B) Diluciones seriadas de las cepas de los genotipos indicados se inocularon en placas sólidas de medio YES al 2% de glucosa (2% Glu) y YES al 3% glicerol (3% Gly). Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días y se fotografiaron. Se muestra un experimento representativo del resultado.

Dado el marcado descenso en la expresión de los genes *gld1+*, *dak1+* y *dak2+* tras la delección de *atf1+* o *rst2+* en las células *pka1Δ*, nos planteamos si la mera supresión de estos factores de transcripción ocasionaba una reducción en su expresión en condiciones de limitación de glucosa. Para ello, se cultivaron células que expresaban la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AJ30), *rst2Δ* (AJ176) y *atf1Δ* (AJ208) en EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol. Se tomaron muestras para analizar mediante qPCR los niveles de ARNm de los genes *gld1+*, *dak1+*, *dak2+*, *gut2+* y *gpd1+*. En el panel A de la Figura 50 se puede observar como la delección de *atf1+* o *rst2+* suprimía de manera considerable la expresión de los genes *gld1+*, *dak1+* y *dak2+* con relación al control. Notablemente, la ausencia de *atf1+*, pero no de *Rst2*, reprimió de manera significativa la expresión de *gut2+* y *gpd1+* (Figura 50, panel A). Paralelamente, comprobamos los niveles de la proteína de fusión Gld1-HA en estas mismas condiciones experimentales observándose una marcada disminución de sus niveles en relación con el control (Figura 50, panel B).

Asimismo, en estas mismas condiciones, decidimos comprobar si esta reducción de la expresión se traducían efectivamente en una reducción de los niveles de Gld1-HA. La validación de esta hipótesis requirió del cultivo de cepas control (AJ910), *rst2Δ* (AJ942) y *atf1Δ* (AJ941) que expresaban la fusión genómica Gld1-HA en EMM con 7% de glucosa. Una vez alcanzada la fase exponencial, las células se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol, se tomaron muestras y se procesaron para su análisis mediante Western-blot. De acuerdo con nuestro planteamiento, los resultados mostraron una fuerte reducción de los niveles de Gld1-HA en comparación a las células control (**Figura 50**, panel B).

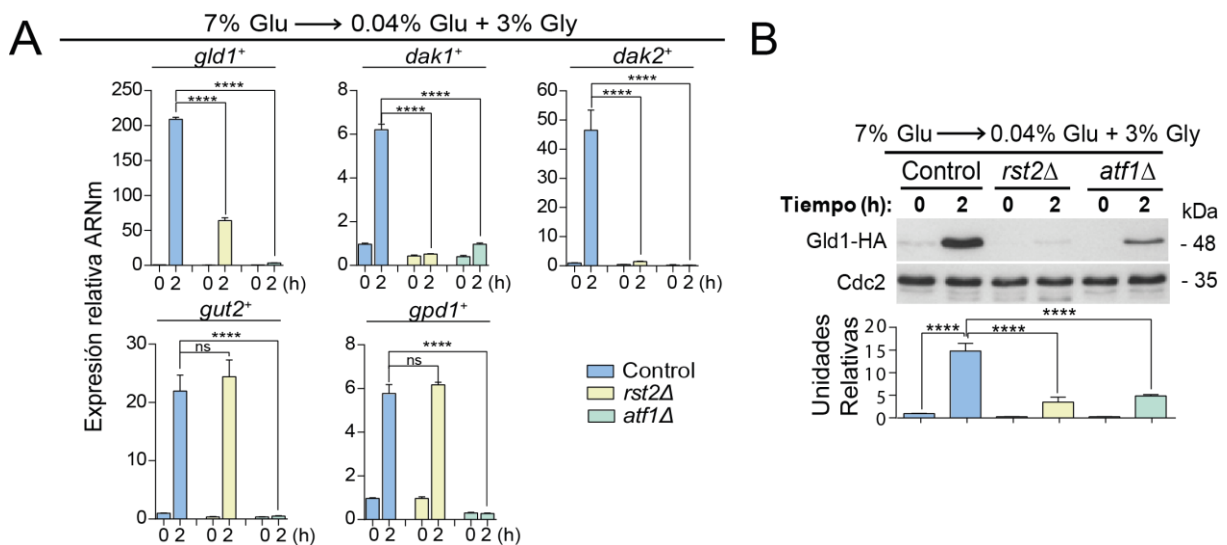


Figura 50. En *S. pombe* la expresión de Gld1 depende fuertemente de los factores de transcripción Rst2 y Atf1 tras la limitación de glucosa. (A) Los niveles de ARNm de los genes: *gld1+*, *dak1+*, *dak2+*, *gut2+* y *gpd1+*; se midieron mediante qPCR a partir de ARN total extraído de muestras de células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AJ30), *rst2Δ* (AJ176) y *atf1Δ* (AJ208), que crecían exponencialmente en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). Los resultados se muestran como expresión relativa (media \pm SD) de tres repeticiones biológicas. ****, $p < 0.0001$; ns, no significativo, calculado mediante *one-way* ANOVA. (B) Los niveles de expresión de la proteína de fusión Gld1-HA se determinaron en células de las cepas AJ910 (control), AJ942 (*rst2Δ*) y AJ941 (*atf1Δ*) creciendo exponencialmente en EMM con 7% de glucosa (7% Glu). Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-HA-HRP (detección de la fusión Gld1-HA) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los resultados se muestran como expresión relativa (media \pm SD) de tres repeticiones biológicas. ****, $p < 0.0001$, calculado mediante ANOVA unidireccional.

Una vez demostrada la relevancia funcional de las vías SAPK-Sty1-Atf1 y AMPc-PKA-Rst2 en el control de la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo del glicerol, nos planteamos estudiar su influencia en la inducción de la autofagia ante la escasez de glucosa, considerando su intrínseca relación con el metabolismo respiratorio. Para ello, células que expresaban la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *gld1Δ* (AJ879) y *dak1Δ dak2Δ* (AJ959) se cultivaron en EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol, obteniéndose muestras que se sometieron a análisis mediante Western-blot. El mismo experimento se realizó con las cepas *pka1Δ* (AJ332), *gld1Δ pka1Δ*, (AJ882) y *dak1Δ dak2Δ pka1Δ* (AJ965), aunque en este caso se transfirieron EMM con 3% glicerol. Los datos obtenidos revelaron que tanto la eliminación de *gld1+* como la depleción conjunta de *dak1+* y *dak2+* retardaban la inducción de la autofagia durante la limitación de glucosa en comparación con las células control. Además, se observó una atenuación significativa de este proceso en las células *pka1Δ* privadas de glucosa (**Figura 51**).

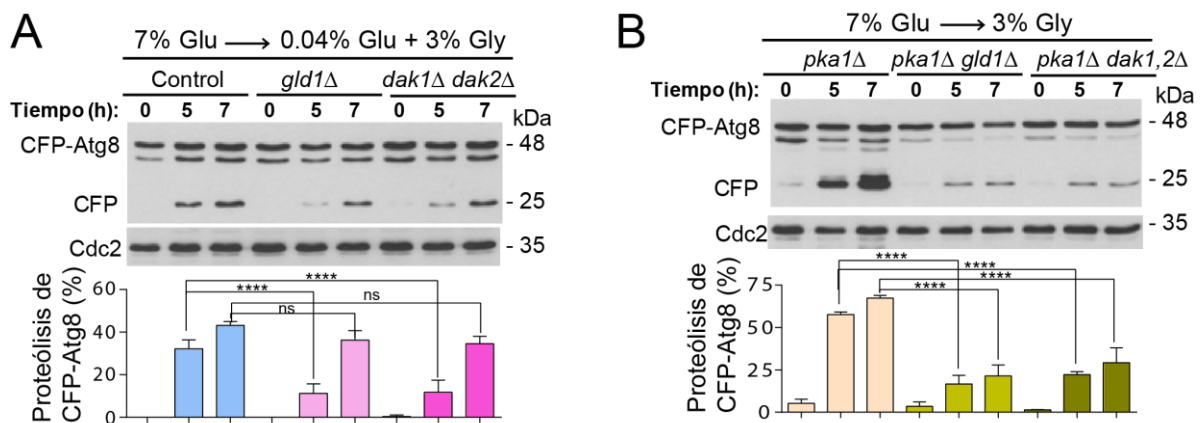


Figura 51. La expresión de los genes implicados en la asimilación del glicerol (*gld1+*, *dak1+* y *dak2+*) es crítica para la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa. Se cultivarán células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *gld1Δ* (AJ879), *dak1Δ dak2Δ* (AJ959), *pka1Δ* (AJ332), *pka1Δ gld1Δ* (AJ882) y *pka1Δ dak1Δ dak2Δ* (AJ965), en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a: (A) EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly); (B) EMM con 3% de glicerol (3% Gly). (A y B) Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Los resultados se muestran como expresión relativa (media ± SD) de tres repeticiones biológicas. ****, $p < 0.0001$; ns, no significativo, calculado mediante ANOVA unidireccional.

A tenor de estos resultados, decidimos analizar si la delección de otros genes como *gut2⁺*, *gpd1⁺*, así como de productos génicos enriquecidos en la GO, como es el caso del gen gluconeogénico *fbp1⁺*, tenía un impacto funcional significativo en la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa. Sin embargo, la delección de *gut2⁺*, *gpd1⁺* o *fbp1⁺* no alteró sustancialmente la actividad autofágica durante la limitación de glucosa (**Figura 52**, panel A), ni durante el ayuno completo de glucosa en las células *pka1Δ* (**Figura 52**, panel B).

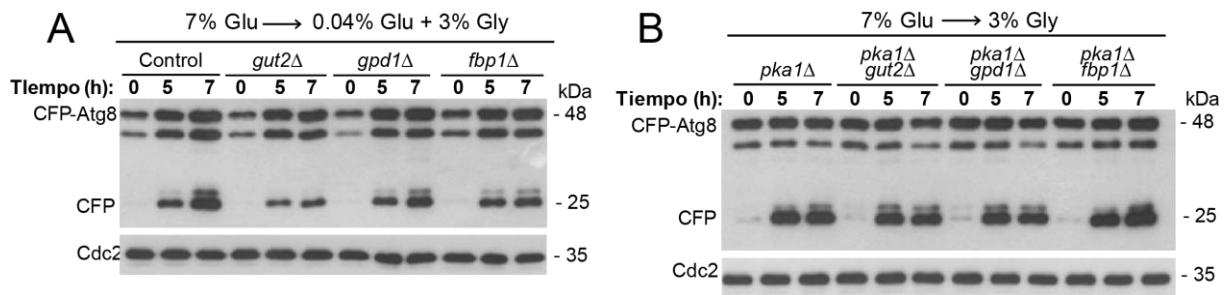


Figura 52. La delección de *gut2⁺*, *gpd1⁺* y *fbp1⁺* no afecta a la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa. (A) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AI30), *gut2Δ* (AJ864), *gpd1Δ* (AJ869), y *fbp1Δ* (AJ827) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). (B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en los fondos genéticos *pka1Δ* (AJ332), *pka1Δ gut2Δ* (AJ865), *pka1Δ gpd1Δ* (AJ870) y *pka1Δ fbp1Δ* (AJ828) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Se muestra un experimento representativo del resultado.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la expresión de los genes *gld1⁺*, *dak1⁺* y *dak2⁺* es importante para favorecer la inducción de la autofagia en contextos de limitación de glucosa, destacando el papel central que desempeña el metabolismo del glicerol. De hecho, como cabría esperar, en las células *pka1Δ* no se detectó activación de la autofagia cuando se sustituyó el glicerol por sorbitol tras un periodo de inanición completa de glucosa (**Figura 53**). Este resultado sugiere que la autofagia, para poder activarse, requiere que el metabolismo de fuentes de carbono alternativas sea plenamente funcional para poder garantizar una adecuada adaptación a la escasez de glucosa. De esta manera, se obtiene la energía suficiente para iniciar un proceso tan exigente energéticamente como el ensamblaje del autofagosoma (Ashe et al., 2000; Lang et al., 2014). A su vez, esta evidencia concuerda con nuestros resultados previos donde observamos que la capacidad de metabolizar el

glicerol aceleraba el flujo autofágico en respuesta a una limitación de glucosa, en comparación con el sorbitol (**Figura 25**, panel B).

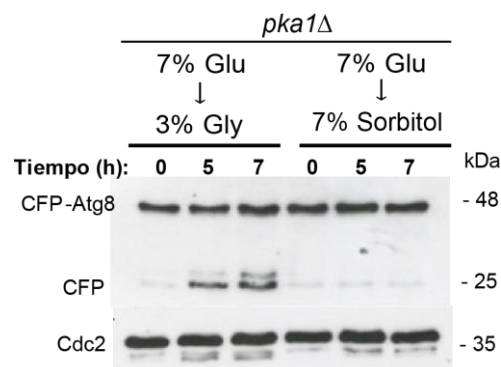


Figura 53. Las células *pka1Δ* son incapaces de inducir la autofagia tras un ayuno completo de glucosa en presencia de una fuente de carbono no respirable. Se cultivaron células *S. pombe* que expresan la proteína de fusión CFP-Atg8 en el fondo genético *pka1Δ* (AJ332) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly) o EMM con 7% de Sorbitol. Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (detección de la fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que ante un déficit de glucosa, se inhibe la ruta AMPc-PKA y se activa la señalización de Sty1, lo que conduce a la expresión de genes asociados con la asimilación del glicerol a través de los factores de transcripción Rst2 y Atf1. Esta intrincada regulación juega un papel crucial en la inducción de la autofagia dependiente de la respiración de fuentes de carbono alternativas.

8. Sty1 modula positivamente la actividad transcripcional de Rst2 y la inducción de autofagia en respuesta al déficit de glucosa.

Como se ha comentado anteriormente, las vías SAPK y AMPc-PKA desempeñan un papel crucial durante la adaptación celular frente a un déficit de glucosa. Aunque existe interacción cruzada en la señalización entre ambas rutas, hasta ahora, solo se ha documentado que el factor de transcripción Atf1 puede modular la señalización de la vía AMPc-PKA al influir en la estructura de la cromatina del gen *cgs2⁺* (Davidson et al., 2004; Santo et al., 1996). No se ha descrito que Pka1 regula a Atf1 (Santo et al., 1996; Takeda et al., 1995) ni que Sty1 influya en la actividad de Rst2 (Santo et al., 1996).

Como mencionamos anteriormente, Rst2, cuando se activa en respuesta a un déficit de glucosa, experimenta un cambio en su movilidad electroforética dependiente de fosforilación (Higuchi et al., 2002; Jiang et al., 2021). Sin embargo, la quinasa responsable de dicha fosforilación aún no ha sido identificada. Dado el papel esencial de Sty1 en la inducción de la autofagia, nuestro siguiente objetivo consistió en estudiar si el patrón de movilidad electroforética de Rst2 variaba de manera dependiente de Sty1. Para ello, en primer lugar, estudiamos la dinámica de fosforilación de Rst2 en nuestras condiciones experimentales. Para ello, generamos una cepa (AJ734) que expresaba la proteína de fusión Rst2-3HA en ausencia de la serina proteasa vacuolar Isp6, con el objetivo de minimizar la degradación de Rst2 (Higuchi et al., 2002). Esta cepa fue cultivada en EMM con 7% de glucosa, y posteriormente, se transfirió a: (i) EMM con 0.04% de glucosa más 3% glicerol; y a (ii) EMM con 3% glicerol. Como cabía esperar, se detectó un notable cambio en la movilidad electroforética de Rst2, la cual disminuyó tras la limitación o el ayuno de glucosa. Además, en estas condiciones, se observó un notable aumento en los niveles de proteína (**Figura 54**, paneles A y B).

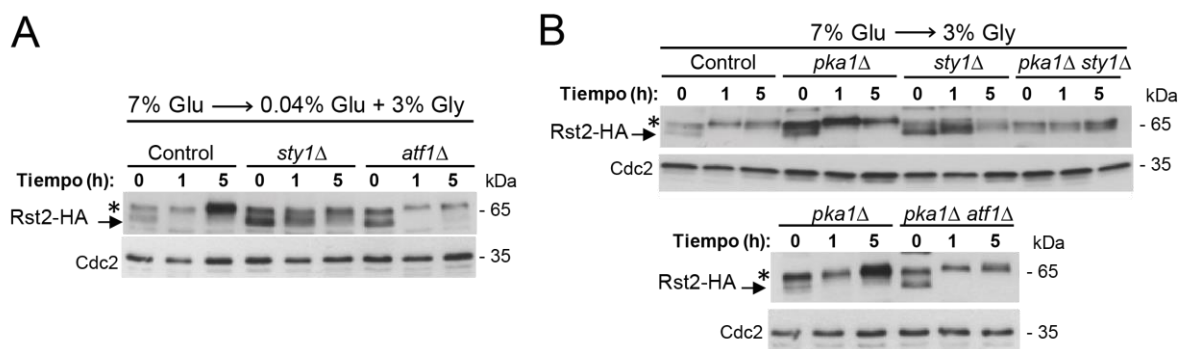


Figura 54. La MAPK Sty1 modula la activación de Rst2 tras el déficit de glucosa. (A) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión Rst2-3HA y, además, carecen de la proteasa vacuolar Isp6, en los fondos genéticos control (AJ734), *sty1Δ* (AJ751), *atf1Δ* (AJ767) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). (B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan la proteína de fusión Rst2-3HA y, además, carecen de la proteasa vacuolar Isp6 en los fondos genéticos control (AJ734), *pka1Δ* (AJ737), *pka1Δ sty1Δ* (AJ755), *pka1Δ atf1Δ* (AJ741) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. (A y B) Finalmente, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-HA-HRP (detección de la fusión Rst2-3HA) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Se muestran los resultados de un experimento representativo. «*» muestra la banda de proteína hiperfosforilada y de menor movilidad.

A continuación, decidimos analizar si existía algún defecto en ausencia de Pka1 y/o de la MAPK Sty1. Para ello, se construyeron cepas que expresaban la proteína de fusión Rst2-3HA y carecían de la Isp6 en los fondos genéticos *sty1Δ* (AJ751), *atf1Δ* (AJ767), *pka1Δ*

(AJ737), *pka1Δ sty1Δ* (AJ755) y *pka1Δ atf1Δ* (AJ741). Tal y como se había descrito (Higuchi et al., 2002; Jiang et al., 2021), la ausencia de Pka1 no alteró la movilidad de Rst2-HA durante la inanición de glucosa, observándose, no obstante, un aumento en su nivel de expresión (**Figura 55**, panel B), que sugiere que Rst2 podría favorecer su propia expresión. Es importante destacar que solo la ausencia de Sty1, y no de Atf1, provocó una notable alteración en el cambio de movilidad de Rst2-HA en respuesta a la limitación de glucosa en comparación con el control, tanto en el mutante sencillo como en el doble mutante con *pka1Δ* (**Figura 54**, paneles A y B). Este resultado sugiere que Rst2 podría ser diana de Sty1. Por ello, decidimos analizar la secuencia de aminoácidos de Rst2 en busca de posibles sitios de fosforilación por MAPK. Identificamos 10 sitios potenciales (T39, S245, S292, S354, S358, S398, S405, S410, S422 y S438) (**Figura 55**). Cabe destacar que los sitios S245 y S292, con la secuencia de consenso -PXS/TP-, han sido confirmados como fosforilados *in vivo* en estudios previos de fosfoproteómica (Kettenbach et al., 2015; Swaffer et al., 2016; Tay et al., 2019), por lo que decidimos estudiar su relevancia funcional y dependencia de Sty1. De los dos sitios identificados, nos centramos en el aminoácido S292.

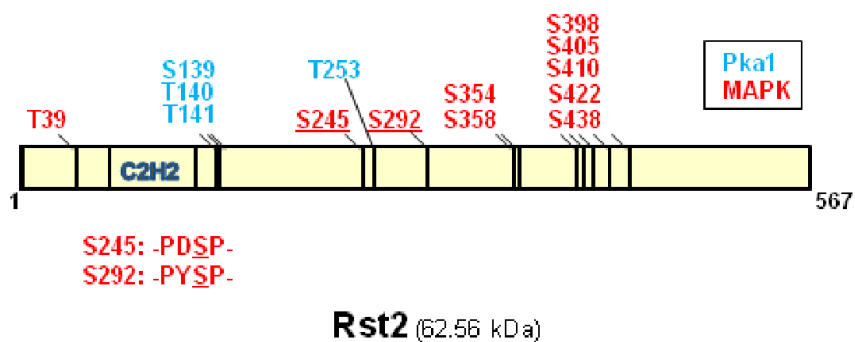


Figura 55. Estructura básica de Rst2. Los sitios de fosforilación dependientes de Pka1 conocidos aparecen coloreados en azul claro. Los sitios putativos S/T fosforilables por MAPK están coloreados en rojo. C2H2: dominio tipo dedo de zinc.

En primer lugar, obtuvimos un fosfoanticuerpo policlonal de conejo que reconoce la fosforilación de Rst2 en S292 *in vivo*. Como se ilustra en la Figura 56, la especificidad del anticuerpo quedó demostrada al observar la ausencia de fosforilación en los mutantes *rst2Δ* (panel A) y *rst2^{S292A}* (panel B). Además, el nivel de fosforilación de Rst2 en S292 resultó ser mínimo durante en presencia de glucosa, experimentando un notable aumento en condiciones de escasez (**Figura 56**, panel B y D). Para verificar si la señal detectada correspondía específicamente a fosforilación en ese residuo, tratamos los extractos proteicos con fosfatasa en presencia y ausencia de ortovanadato. El análisis posterior mediante Western-blot reveló que la señal desaparecía después del tratamiento con fosfatasa, únicamente en ausencia del inhibidor (**Figura 56**, panel C).

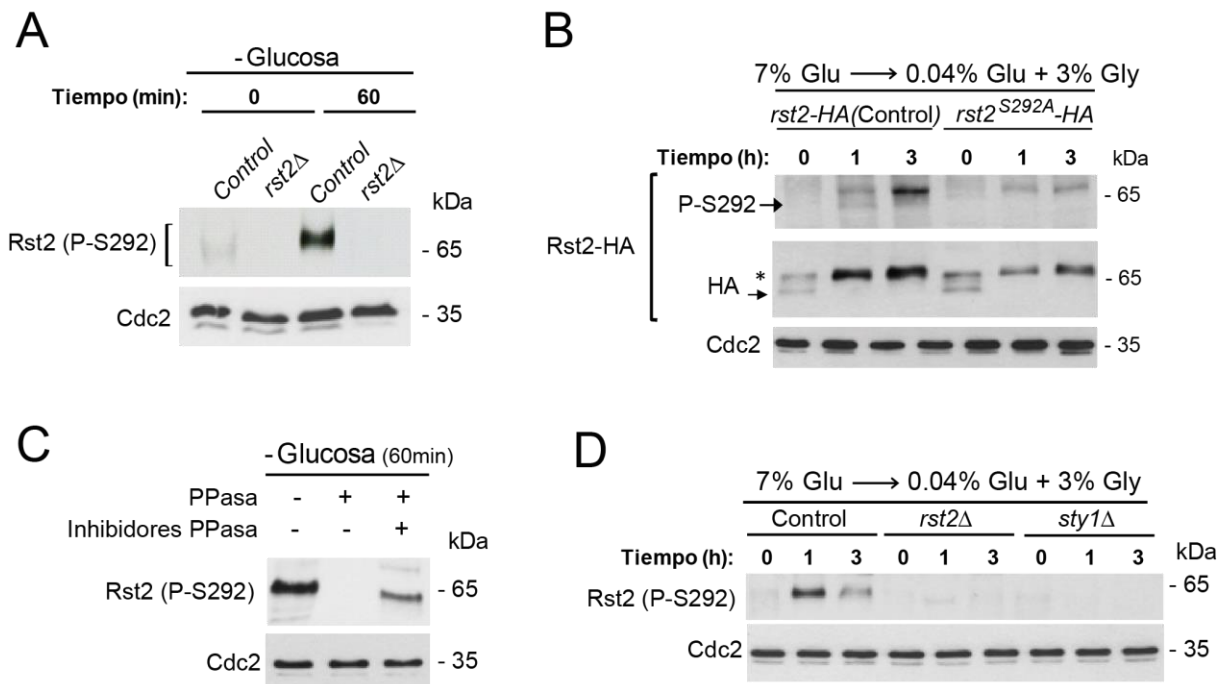


Figura 56. La fosforilación de Rst2 en S292 es efectuada específicamente por la MAPK Sty1. (A) Las células de las cepas MM1 (control) y AJ118 (*rst2Δ*) de *S. pombe* se cultivaron en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial, seguidamente transferimos las células a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). (B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan las proteínas de fusión genómica Rst2-HA y CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AJ31) y *rst2^{S292A}* (AJ34) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial. Seguidamente transferimos las células a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). (C) Se cultivaron las células de la cepa MM1 (control) de *S. pombe* en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial, seguidamente se transfirieron las células a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). (D) Se cultivaron las células de las cepas MM1 (control), AJ118 (*rst2Δ*) y AJ216 (*sty1Δ*) de *S. pombe* en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de fase exponencial, seguidamente transferimos las células a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). (A, B, C y D) Se tomaron muestras a los tiempos indicados. Los niveles de Rst2-HA (B) y la fosforilación (A, B, C y D) *in vivo* en S292 se detectaron en extractos de proteínas desnaturalizadas con urea de las cepas indicadas. (C). La muestras se procesaron por un método de extracción nativo y se realizó el ensayo fosfatasa, tratando las muestras con fosfatasa lambda en presencia o ausencia de un inhibidor específico de PPasa. Posteriormente a la inmunotransferencia, se hizo uso de anticuerpos anti-HA (Rst2-HA) y anticuerpos anti-fosfo-S292; además, se usó anti-Cdc2 (como control de carga). Se muestran los resultados de un experimento representativo. «*» indica la banda de proteína hiperfosforilada y de menor movilidad.

Debido a la inestabilidad de la fusión Rst2-HA durante la purificación en condiciones nativas, no pudimos explorar directamente su asociación *in vivo* con Sty1. Para estudiar su relación funcional, nos propusimos analizar si la fosforilación de Rst2 en S292 tras la limitación de glucosa dependía de Sty. Para ello, se cultivaron células control (MM1), *rst2Δ* (AJ118) y *sty1Δ* (AJ216) en EMM con 7% de glucosa y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol, tomándose muestras a distintos intervalos de tiempo y analizándose mediante Western-blot. La ausencia de señal en las células *sty1Δ* (**Figura 56**, panel D), sugiere que Sty1 fosforila este residuo de Rst2 *in vivo*. No obstante, cabe destacar que el cambio de movilidad de Rst2 tras la limitación de glucosa no se vio afectado en el mutante fosfonulo S292A (**Figura 56**, panel B), lo que sugiere que Sty1 podría fosforilar a Rst2 en residuos adicionales de serina y/o treonina.

A continuación, dada la implicación de Rst2 en la modulación de la expresión de los genes implicados en la asimilación del glicerol (*gld1+*, *dak1+* y *dak2+*), decidimos analizar si la ausencia de la fosforilación en S292 presentaba algún impacto en la expresión de estos genes. Para ello, cultivamos células control (AJ31), *pka1Δ* (AJ43), *pka1Δ rst2Δ* (AJ335) y *pka1Δ rst2.S292A* (AJ717) en EMM con 7% de glucosa, y tomamos muestras que fueron procesadas para medir los niveles de expresión mediante qPCR. Nuestros resultados mostraron que, de forma similar a las células *pka1Δ rst2Δ*, los niveles de expresión de ARNm de los genes *gld1+*, *dak1+* y *dak2+* se redujeron de forma muy significativa en las células *pka1Δ* que expresan el alelo mutante fosfonulo *rst2^{S292A}* (**Figura 57**). Estos resultados sugieren que la fosforilación de S292, mediada por Sty1, es esencial para garantizar una adecuada actividad transcripcional de Rst2.

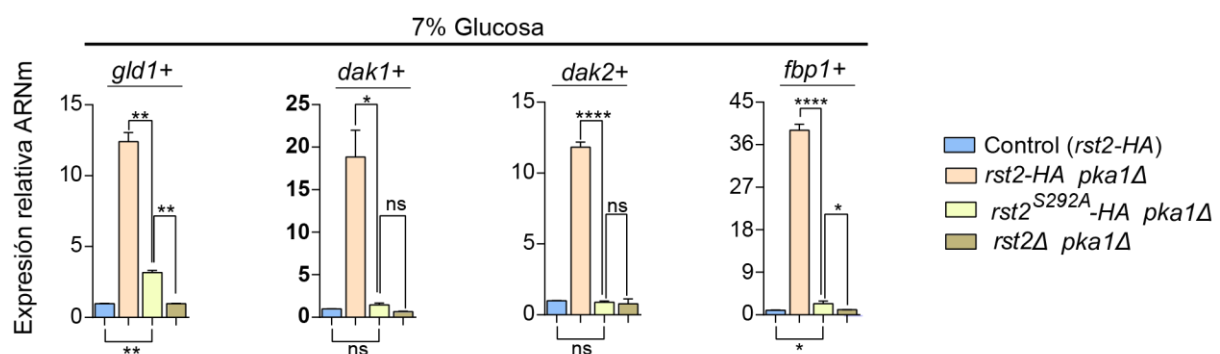


Figura 57. La fosforilación de Rst2 dependiente de Sty1 en S292 es necesaria para la expresión de los genes implicados en el metabolismo del glicerol. Los niveles de ARNm de los genes: *gld1+*, *dak1+*, *dak2+*, y *fbp1+*; se midieron mediante qPCR a partir de ARN total extraído de muestras de células de las cepas AJ31 (control), AJ43 (*pka1Δ*) y AJ34 (*pka1Δ rst2.S292A*) de *S. pombe* que expresan las proteínas de fusión Rst2-3HA y CFP-Atg8; así como la cepa AJ335 (*pka1Δ rst2Δ*) de *S. pombe* que expresa la fusión genómica CFP-Atg8; que crecían exponencialmente en EMM con 7% de glucosa (7% Glu). Los resultados se muestran como expresión relativa (media \pm SD) de tres repeticiones biológicas. ****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; ns, no significativo, calculado mediante *one-way ANOVA*

Dada su relevancia en la actividad transcripcional de Rst2, cabría esperar que los mutantes carentes de fosforilación en S292 (*rst2.S292A*) exhiban defectos en su capacidad proliferativa mediante respiración. Para analizar esta hipótesis, realizamos un ensayo de crecimiento en gota en placas sólidas de YES con 2% de glucosa o YES con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol, en las que se sembraron diluciones seriadas de las cepas *rst2Δ* (AJ176), *rst2-3HA* (control, AJ31) y *rst2.S292A* (AJ34). Sorprendentemente, las células que expresaban el alelo fosfomutante Rst2^{S292A} no mostraron defectos en su capacidad proliferativa en condiciones respiratorias (**Figura 58**).

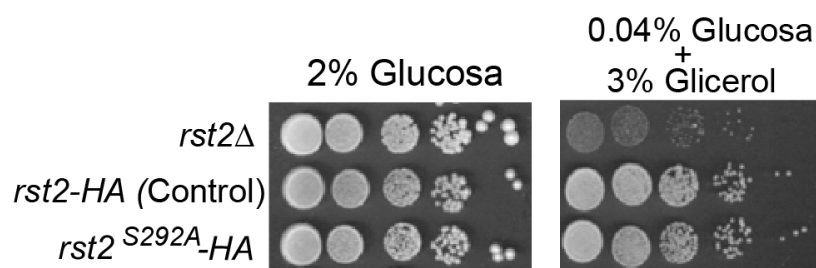


Figura 58. La fosforilación dependiente de Sty1 en S292 de Rst2 no afecta a la capacidad de crecer en condiciones respiratorias. Diluciones seriadas de las cepas AJ176 (*rst2Δ*), AJ31 (control) y AJ34 (*rst2.S292A*) de *S. pombe* se inocularon en placas sólidas de medio YES 2% Glucosa o Yes 0.04% Glucosa más 3% Glicerol. Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días y se fotografiaron. Se muestra un experimento representativo del resultado.

Finalmente, decidimos analizar la relevancia funcional de esta modificación en la regulación de la autofagia. Para ello, cultivamos células que expresan las proteínas de fusión Rst2-HA y CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AJ31), *rst2.S292A* (AJ34), *pka1Δ* (AJ43) y *pka1Δ rst2.S292A* (AJ717) en EMM con 7% de glucosa, y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (AJ31 y AJ34) o a EMM con 3% glicerol (AJ43 y AJ717). Sorprendentemente, detectamos una notable reducción del proceso autofágico en las células que expresaban la variante mutante Rst2S292A en comparación con las células control bajo condiciones de escasez de glucosa (**Figura 59**, panel A). Este fenotipo se intensificó aún más en las células *pka1Δ* sometidas a ayuno de glucosa (**Figura 59**, panel B).

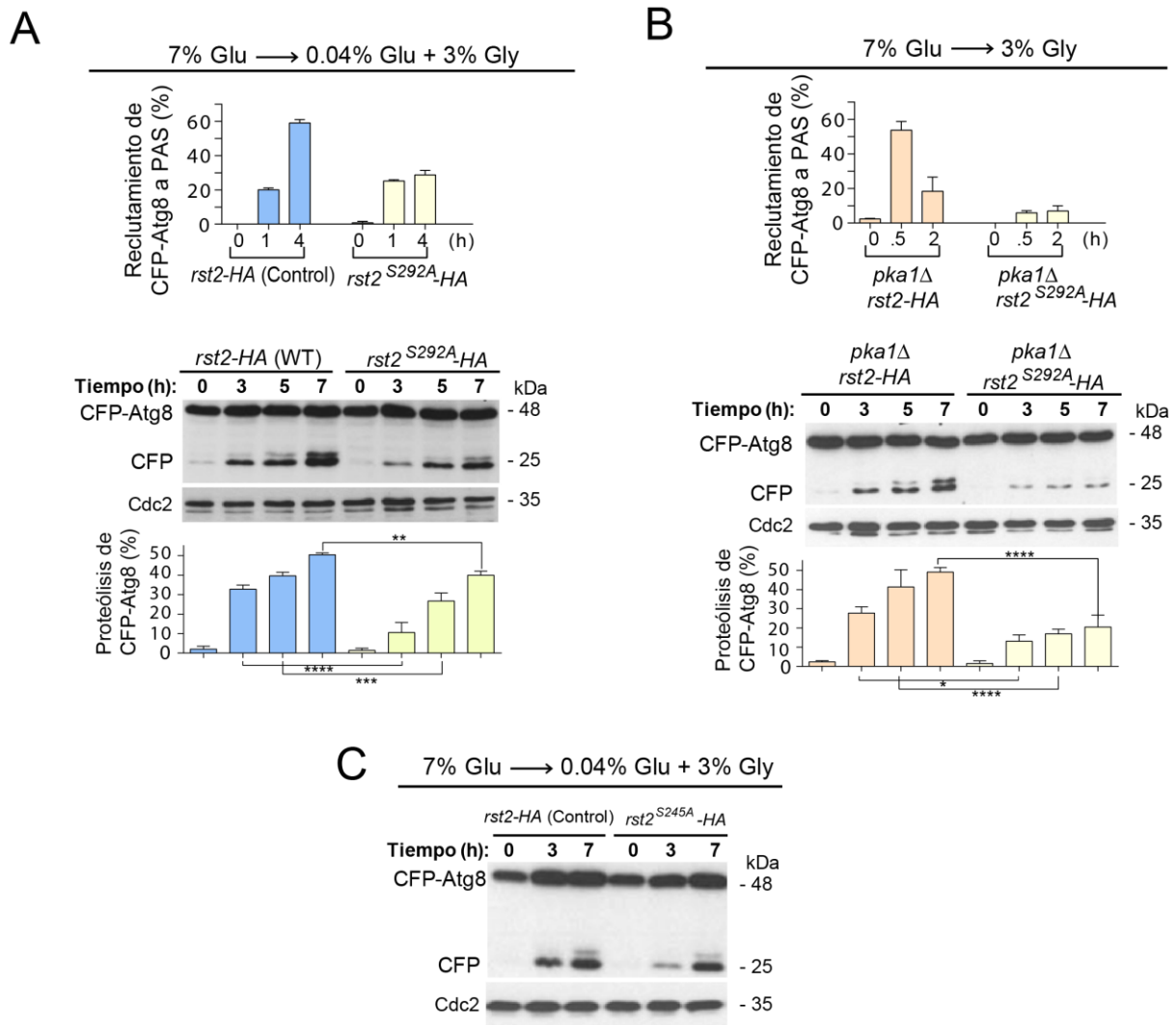


Figura 59. La fosforilación dependiente de Sty1 en S292 de Rst2 reduce la activación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa. (A y C) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan las proteínas de fusión Rst2-HA y CFP-Atg8 en los fondos genéticos control (AJ31), *rst2*^{S292A} (AJ34) y *rst2*^{S245A} (AJ32) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu) hasta mitad de la fase exponencial. Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 0.04% de glucosa más 3% de glicerol (0.04% Glu más 3% Gly). (B) Se cultivaron células de *S. pombe* que expresan las proteínas de fusión Rst2-HA y CFP-Atg8 en los fondos genéticos *pka1*Δ (AJ43) y *pka1*Δ *rst2*^{S292A} (AJ727) en EMM con 7% de glucosa (7% Glu). Posteriormente, se recuperaron por filtración y se transfirieron a EMM con 3% de glicerol (3% Gly). (A y B) Por un lado, se tomaron muestras a los tiempos indicados y se determinó el porcentaje de células que reclutaron CFP-Atg8 a PAS mediante microscopía de fluorescencia (número de células > 300; tres réplicas biológicas) y se representa como (media ± SD). (A, B y C) otro lado, las muestras se procesaron por TCA y se analizaron mediante el inmunoensayo Western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-GFP (fusión CFP-Atg8 y proteólisis) y se normalizaron con anti-Cdc2 (control de carga interno). Los datos de proteólisis de CFP-Atg8 en los tiempos indicados se muestran como (media ± SD) y corresponden a triplicados biológicos. ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$, calculado mediante *one-way* ANOVA.

El hecho de que la movilidad electroforética de Rst2^{S292A} no se vea afectada tras la escasez de glucosa (**Figura 56**, panel B) sugiere que Sty1 podría estar fosforilando a Rst2 en otros residuos. Por esta razón, decidimos investigar la posible influencia de la fosforilación dependiente de MAPK en el residuo S245 sobre el flujo autofágico. Sorprendentemente, los resultados mostraron que las células no presentan ningún defecto en la inducción de la autofagia en respuesta a una limitación de glucosa (**Figura 59**, panel C). En resumen, nuestros resultados sugieren que, aunque es probable que Sty1 esté fosforilando a Rst2 en otros residuos, la fosforilación *in vivo* de Rst2 en S292 por Sty1 desempeña un papel esencial en la inducción de la autofagia dependiente de la respiración durante la escasez de glucosa.

Discusión

1. La adaptación a la escasez de glucosa en *S. pombe*.

Los organismos vivos están continuamente sujetos a variaciones ambientales, y la privación de nutrientes representa una de las perturbaciones más críticas para su desarrollo y homeostasis. Para afrontar estas alteraciones, es esencial que estos organismos dispongan de sistemas para detectar con precisión la disponibilidad de recursos nutricionales y, en respuesta, adecuen sus procesos fisiológicos. Notablemente, una de las respuestas fisiológicas más prominentes en este contexto es la activación de la autofagia. Durante la última década, la investigación en autofagia ha progresado enormemente, especialmente en la identificación y caracterización de los factores y mecanismos que intervienen en su regulación (Sheng & Qin, 2019). Una mejor comprensión de estos mecanismos es esencial para elucidar la fisiopatología de diversas enfermedades metabólicas, inmunológicas, degenerativas y relacionadas con el envejecimiento, lo que posibilita el diseño de intervenciones terapéuticas innovadoras. A pesar de la conservación evolutiva de estos mecanismos moleculares, aún existen vacíos en el conocimiento sobre la regulación de la autofagia. En este contexto, la levadura de fisión *S. pombe* emerge como un modelo de investigación relevante, ya que su estudio nos permitirá comprender mejor los mecanismos moleculares que orquestan la autofagia en células de mamíferos.

1.1 La reprogramación metabólica y la autofagia: una aproximación hacia la terapia del cáncer desde la investigación en levaduras.

Desde levaduras a células de mamíferos se ha señalado frecuentemente el carácter dinámico del metabolismo celular, una característica esencial para mantener la viabilidad celular frente a diversos estímulos intrínsecos y extrínsecos, mediante el reajuste de la demanda energética (Medina, 2020). Numerosos estudios han resaltado la significativa función del metabolismo mitocondrial en la proliferación de células cancerosas, dado que estas mitocondrias proveen los precursores cruciales para la síntesis de macromoléculas, ATP y NADPH. Adicionalmente, la desregulación metabólica y bioenergética, específicamente la disfunción mitocondrial, ha sido identificada como una característica distintiva de las células cancerosas (Hanahan & Weinberg, 2011). Esta anomalía mitocondrial potencia el crecimiento tumoral y confiere a las células cancerosas una mayor resistencia frente a procesos de muerte celular programada (Weinberg & Chandel, 2015). De hecho, se ha señalado que las células cancerosas corrigen este defecto en el metabolismo mitocondrial con el establecimiento de la glucólisis aeróbica o efecto Warburg para así mantener la proliferación celular. No obstante, tras comprender mejor el carácter heterogénico del cáncer, se ha observado que en diversos tipos de cáncer no existe necesariamente una correlación entre el efecto Warburg y defectos en el metabolismo respiratorio (DeBerardinis et al., 2008; Ward & Thompson, 2012),

postulándose que los fibroblastos asociados serían los encargados de llevar a cabo el efecto Warburg, produciendo el lactato que posteriormente será incorporado y metabolizado por las células cancerosas vía mitocondria (Yoshida, 2015). Paralelamente, la disfunción mitocondrial se ha relacionado directamente con mutaciones en el ADN mitocondrial, la generación de ROS, la inestabilidad genética (Medina, 2020) y alteraciones en el funcionamiento de enzimas mitocondriales (Abate et al., 2020; Ferreira et al., 2012). Ante estas circunstancias, se ha descrito la activación la autofagia/mitofagia como un mecanismo garante de la función mitocondrial (DeBerardinis et al., 2008), que contribuye a restaurar la homeostasis celular, paso esencial para la proliferación de células cancerosas, la invasión y la metástasis (Yoshida, 2015). Es por este motivo que se ha sugerido como estrategia terapéutica la inhibición de la autofagia/mitofagia para promover la inducción de la apoptosis en células cancerosas, y mejorar la sensibilidad al tratamiento anticancerígeno (Zhou et al., 2015).

Por su parte, en levaduras, se han descrito roles adicionales de la autofagia en la reprogramación del metabolismo ante la escasez de glucosa como: la formación del complejo Snf1-Mec1-Atg1 que mantiene la respiración mitocondrial (Yi et al., 2017), y el papel de la autofagia como proveedor de aminoácidos necesarios para el funcionamiento de la mitocondria (May et al., 2020). Curiosamente, en *S. pombe*, hasta la fecha, no se había descrito ninguna evidencia clara de la autofagia como moduladora de la reprogramación metabólica, debido, principalmente, al desconocimiento existente de su interacción con el metabolismo respiratorio.

1.2 Desvelando la conexión entre el metabolismo mitocondrial y la inducción de autofagia en *S. pombe*: una relación nueva y prometedora.

En esta Tesis Doctoral, hemos profundizado en los mecanismos reguladores que modulan la inducción de la autofagia ante el déficit de glucosa en la levadura de fisión *S. pombe*. Inicialmente, en consonancia con la literatura previa, corroboramos que las células de *S. pombe* no logran inducir la autofagia en condiciones de ayuno de glucosa (**Figuras 22-24**) (Corral-Ramos et al., 2021; Kohda et al., 2007). Cabe destacar que, aunque se ha descrito que *S. cerevisiae* induce una fuerte respuesta autofágica ante la ausencia de glucosa, ciertos estudios han propuesto que la privación de glucosa, contrariamente, inhibe la autofagia en esta especie (Adachi et al., 2017).

Mediante el estudio de este proceso en *S. pombe*, hemos evidenciado que, en presencia de concentraciones de glucosa que favorecen el crecimiento respiratorio (Takeda et al., 2015), se manifiesta una marcada inducción de la autofagia (**Figuras 22 y 23**).

En estas condiciones de escasez de glucosa, el metabolismo respiratorio provoca un aumento de la producción mitocondrial de ROS como moléculas de señalización, las cuales se han descrito como capaces de desencadenar cambios transcripcionales en el núcleo (Teoría de la mitohormesis) que promueven una serie de eventos citoprotectores, que constituyen la llamada respuesta retrógrada (Machado et al., 2021; Ristow & Zarse, 2010; Tapia, 2006). Por su parte, la respuesta retrograda al ser un mecanismo garante de la calidad mitocondrial presenta vínculos reguladores con la autofagia (Jazwinski, 2013). De hecho, en *S. cerevisiae*, bajo condiciones de limitación nutricional y energética, se ha observado la inducción de la pexofagia (degradación selectiva de peroxisomas) y la mitofagia de forma controlada, evitando así la pérdida de orgánulos que son necesarios para producir energía (β -oxidación en los peroxisomas; y la respiración en mitocondrias) (Lang et al., 2014; Twig et al., 2008). Respecto a *S. pombe*, previamente se había descrito que la autofagia inducida en respuesta a una limitación en la disponibilidad de glucosa estaba asociada con la mitofagia (Corral-Ramos et al., 2021), siendo su propósito principal eliminar las mitocondrias dañadas por el intenso estrés oxidativo proveniente del metabolismo respiratorio (Corral-Ramos et al., 2021; Takeda et al., 2010). Por tanto, se descartaba una relación funcional entre la autofagia y el metabolismo respiratorio. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral, hemos refutado dicha hipótesis, ya que tanto la inhibición farmacológica como la supresión genética de componentes de varios complejos de la ETC mitocondrial resultaron en una notable disminución del flujo autofágico en *S. pombe* en respuesta a la limitación de glucosa (**Figuras 28-31**). Estos hallazgos indican que, en *S. pombe*, la inducción de la autofagia ante una limitación de glucosa está condicionada a una adaptación adecuada al metabolismo respiratorio y la necesidad de una cadena transportadora de electrones mitocondrial plenamente operativa. Además, en contraste con *S. cerevisiae* donde Atg1 y Atg11 son necesarios para mantener la respiración mitocondrial durante la limitación de glucosa (Yi et al., 2017), en *S. pombe*, ni Atg1 ni Atg11 parecen desempeñar un papel en la regulación de la función mitocondrial (**Figura 42**, panel C).

1.3 Modulación de la autofagia por las rutas de señalización nutricional en *S. pombe*: Nuevas perspectivas en la adaptación celular frente a la escasez de glucosa.

La adaptación celular frente a la escasez de glucosa depende intrincadamente de una compleja red de vías de señalización molecular que orquestan la reprogramación metabólica y la autofagia, entre las que destacan TOR, AMPK, AMPc-PKA y SAPK (Ver **Apartado 3.2**) (Abate et al., 2020; Alao et al., 2023; Deng et al., 2021). En el caso de la ruta AMPK, esta ha sido ampliamente descrita como modulador de la autofagia en eucariotas al ser un regulador de TOR (Alao et al., 2023). Por su parte, el papel de AMPc-PKA en la modulación de la autofagia es bien conocido en *S. cerevisiae* (Budovskaya et al., 2004; Stephan et al., 2009), aunque su papel en eucariotas superiores permanece más ambiguo (Cherra et al., 2010; Torres-Quiroz et al., 2015; Zhao et al., 2019) y ha sido ampliamente descartada como regulador en *S. pombe* (Corral-Ramos et al., 2021; Mukaiyama et al., 2010). De hecho, hasta la fecha, en *S. pombe* solo se ha descrito la implicación de la ruta TOR y la MAPK Sty1 en la inducción de la autofagia (Corral-Ramos et al., 2021).

1.3.1 La ruta AMPc-PKA como reguladora de la autofagia inducida en respuesta a la escasez de glucosa en *S. pombe*.

Teniendo en cuenta que la señalización del cambio diaúxico y el metabolismo respiratorio está principalmente orquestado en *S. pombe* por la vía de señalización AMPc-PKA (Adnan et al., 2017), decidimos estudiar su papel en la inducción de la autofagia.

A diferencia de lo observado en *S. cerevisiae* (Stephan et al., 2009), la inactivación completa de la señalización de AMPc-PKA en *S. pombe* no es letal. Sorprendentemente, y en contraposición a las células control, las células *pka1Δ* fueron capaces de inducir una fuerte respuesta autofágica cuando se transfirieron a un medio cuya única fuente de carbono disponible era el glicerol, una fuente de carbono no fermentable (ayuno de glucosa) (**Figura 32**). De hecho, la delección de la subunidad catalítica *pka1⁺* provocó una leve inducción basal de la autofagia en presencia de glucosa (**Figura 32**). Por el contrario, la activación constitutiva de Pka1 bloqueó la inducción de la autofagia en respuesta a una limitación de glucosa (**Figura 37**). La ruta AMPc-PKA regula la autofagia tanto a nivel transcripcional como postraduccional. A nivel transcripcional, depende del factor de transcripción Rst2; pues su delección redujo de forma muy significativa el flujo autofágico respecto a las células control en respuesta a la limitación de glucosa (**Figura 38**), y la delección simultánea junto con *pka1⁺* (*rst2Δ pka1Δ*) lo bloqueó completamente en condiciones de ayuno (**Figura 39**).

Esta actividad transcripcional de Rst2 se inhibe en las células en crecimiento de glucosa a través de un mecanismo de fosforilación dependiente de Pka1 y se vuelve completamente operativa a medida que la actividad de Pka1 disminuye durante la limitación o la inanición de glucosa (Jiang et al., 2021; Kunitomo et al., 2000; Vassiliadis et al., 2019). Sorprendentemente, el intenso flujo autofágico de las células ayunadas de glucosa que expresan una versión Rst2 insensible a la regulación negativa ejercida por la señalización de AMPc-PKA (Rst2.M3) se redujo notablemente en las células que presentan una actividad constitutiva de Pka1 (**Figura 40**, panel B). Este dato respalda que en *S. pombe*, la señalización de la vía AMPc-PKA también regula negativamente la autofagia de forma postraduccional y de manera independiente de Rst2. Aunque actualmente se desconoce, este mecanismo podría implicar la fosforilación inhibitoria dependiente de Pka1 de Atg1 y/o Atg13, como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Budovskaya et al., 2005; Budovskaya et al., 2004; Schmelzle et al., 2004).

1.3.2 La AMPK no está implicada en la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en *S. pombe*.

Sorprendentemente, aunque la respiración mitocondrial también es necesaria para la inducción de la autofagia en *S. cerevisiae* en respuesta a la limitación de glucosa (Yi et al., 2017), nuestros datos respaldan que los mecanismos específicos que vinculan la respiración mitocondrial con la autofagia probablemente hayan divergido en ambas especies de levadura. De hecho, en *S. pombe* el flujo autofágico no se vio comprometido tras la limitación de glucosa en mutantes afectados en la vía de respuesta al daño en el ADN, Mec1/ATR (mutante *rad3Δ*), o en células que carecen de AMPK Ssp2 (**Figura 42**). Es más, el efecto nulo de la eliminación de *ssp2*⁺ en el flujo autofágico fue algo inesperado, considerando su papel como regulador negativo de la función del complejo TORC1 (Davie et al., 2015).

Este hallazgo plantea la cuestión de cómo se induce la autofagia independientemente de la señalización de Ssp2-TORC1. Una posibilidad es la interacción entre los complejos TORC1 y TORC2 en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (Cohen et al., 2014; Corral-Ramos et al., 2021; Ikai et al., 2011). En primer lugar, Ssp2 regula positivamente la actividad de TORC2, mientras que TORC1 está parcialmente regulado por el complejo TORC2 (Cohen et al., 2014; Corral-Ramos et al., 2021). La inhibición de la señalización TORC2 tras la escasez de glucosa provoca una atenuación del efecto supresor de Gad8, promoviendo la activación Gsk3 y Gsk31 que puede compensar la pérdida de expresión de Ssp2 al inhibir la actividad de TORC1 a través del complejo Tsc1 y Tsc2 (Ma et al., 2016; Rallis et al., 2017). Por lo tanto, en estas condiciones de escasez de glucosa se podría

promover la inducción de la autofagia incluso aunque haya una activación reducida de TORC1 debido a la ausencia de Ssp2 (Ma et al., 2016; Miao et al., 2020; Rallis et al., 2017).

1.3.2.1 Scr1, diana de la AMPK, está implicado en la regulación de la autofagia inducida en respuesta a la escasez de glucosa en *S. pombe*.

Tal y como habíamos comentado, en *S. cerevisiae* la CCR reprime la inducción de la autofagia en presencia de glucosa (Adachi et al., 2017). En línea con esto, nuestros resultados indican que el principal represor transcripcional de la CCR, el factor Scr1, tiene un papel en la modulación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa (**Figura 43**). Esta relación parece deberse a que las células de *S. pombe* carentes de *scr1*⁺ se encuentran predisuestas al crecimiento respiratorio (Matsuzawa et al., 2010; Vassiliadis et al., 2019). Esta observación, encaja en un contexto donde la inducción de la expresión génica mediada por los factores de transcripción Rst2 y Atf1 prevalece sobre la represión ejercida por Scr1. Esto coincide con lo descrito anteriormente en células *pka1Δ*, en las que, en presencia de glucosa, y por tanto, con la presencia de Scr1 en el núcleo, se da una expresión constitutiva de genes como *fbp1*⁺ (Hoffman & Winston, 1991; Sánchez-Mir et al., 2020) o *gld1*⁺ (**Figuras 48 y 49**).

1.3.3 Nuevos roles de la vía de señalización SAPK como regulador de la autofagia en *S. pombe*: Sty1 modula transcripcionalmente la inducción de la autofagia ante la escasez de glucosa a través de Atf1.

Por otro lado, las respuestas celulares a los cambios ambientales en *S. pombe* están mediadas por la vía SAPK y su efector central la MAPK Sty1 (Lawrence et al., 2007; López-Avilés et al., 2005; Pérez & Cansado, 2010; Prieto-Ruiz et al., 2020; Sanso et al., 2008). En situaciones de escasez de glucosa o inanición, Sty1 se activa y promueve la fosforilación de Atf1, lo que desencadena un aumento en la expresión de genes pertenecientes a diferentes categorías funcionales, entre los que se encuentran los genes CESR (Chen et al., 2003). Además, la vía SAPK se activa constitutivamente en mutantes que carecen de actividad Pka1, lo que se atribuye a un estrés oxidativo metabólico endógeno, consecuencia directa de la adaptación al metabolismo respiratorio (Zuin, Castellano-Esteve, et al., 2010; Zuin et al., 2008).

Recientemente, se ha descrito que Sty1 juega un papel en la inducción de la autofagia en respuesta al ayuno de nitrógeno a mediante la regulación transcripcional positiva de diversos genes *atg*, como *atg1*⁺, *atg4*⁺, *atg6*⁺, *atg9*⁺ y *atg22*⁺, y de manera independiente a Atf1 (Corral-Ramos et al., 2021). A diferencia del ayuno de nitrógeno, los datos presentados en esta Tesis Doctoral confirman que la señalización de la ruta SAPK, a través de Atf1, regula positivamente la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa (**Figura 44**). Por lo tanto, la modulación de la señalización transcripcional efectuada tanto por Pka1-Rst2 como

Sty1-Atf1, es esencial, al menos en parte, para desencadenar la autofagia en respuesta al déficit de glucosa (**Figura 44**).

1.3.4 Interacción cruzada de las vías Pka1-Rst2 y Sty1-Atf1: modulación transcripcional de la inducción de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa.

Basándonos en los resultados obtenidos, procedimos a la identificación de los posibles genes involucrados en la inducción de la autofagia dependiente de la respiración, y que estuviesen regulados conjuntamente por ambas vías de señalización: Pka1-Rst2 y Sty1-Atf1. Mediante análisis de *microarrays* de ADN, demostramos que la expresión de un gran número de genes en las células carentes de Pka1 es estrictamente codependiente de las funciones Rst2 y Atf1 (**Figura 45**). Específicamente, dentro de este conjunto de genes, encontramos a los relacionados con el metabolismo del glicerol y que resultan cruciales para su asimilación: *gld1⁺*, *dak1⁺* y *dak2⁺* (**Figura 46 y 49**) (Matsuzawa et al., 2010). Nuestros resultados indican que todos ellos son necesarios para una inducción adecuada de la autofagia en situaciones de escasez de glucosa (**Figura 51**). De hecho, la eliminación de estos genes provocó una reducción del flujo autofágico que resultó ser similar a la observada tras la eliminación de *rst2⁺* o *atf1⁺* (**Figuras 38 y 44**).

La expresión de estos genes se encuentra inhibida en presencia de glucosa (CCR) por acción combinada de Scr1 y el complejo Tup/Ssn6 (Matsuzawa et al., 2010). Curiosamente, tanto Rst2 como Scr1 se unen al motivo de ADN 5'-CCCCTC-3', y además se ha descrito que Rst2 reemplaza a Scr1 en el promotor *fbp1⁺* durante períodos de escasez de glucosa, propiciando la activación de su expresión (Hirota et al., 2006). Asimismo, estudios centrados en la regulación por CCR en *S. pombe* plantean que la mayoría de los genes reprimidos por Scr1 podrían activar su expresión de forma dependiente de Rst2 tras el déficit de glucosa, especialmente en ausencia de la función de Scr1 (Vassiliadis et al., 2019). En concordancia, nuestros datos revelan que los niveles de ARNm de *gld1⁺* experimentan una marcada inducción, que depende tanto de Rst2 como de Atf1, en células control sometidas a limitación de glucosa (**Figura 50**) o en células *pka1Δ* creciendo en glucosa (**Figura 48**). Estos hallazgos sugieren que ambos factores, Rst2 y Atf1, pueden competir con Scr1 por la unión al promotor de *gld1⁺*, y que esta unión es favorecida cuando Scr1 está ausente o es excluido del núcleo debido al déficit de glucosa. El control positivo de la expresión de *gld1⁺* por parte de Rst2 y Atf1 es dominante sobre la actividad represora de Scr1 para la inducción de la autofagia, ya que la delección de *ssp2⁺*, que previene la inhibición de Scr1, no redujo el flujo autofágico en las células *pka1Δ* privadas de glucosa en presencia de glicerol (**Figura 42**). Adicionalmente, la inducción de la expresión de los genes *dak1⁺* y *dak2⁺*, que es independiente de Scr1

(Matsuzawa et al., 2010), sigue dependiendo de Rst2 y Atf1 (**Figura 48 y 50**), lo que proporciona una dimensión adicional al entramado regulatorio transcripcional de la autofagia bajo condiciones de ausencia de glucosa. Estos hallazgos, en conjunto con las observaciones previamente detalladas, subrayan el papel clave y la notable plasticidad funcional de esta vía de señalización en *S. pombe* para regular la autofagia en respuesta al agotamiento de nutrientes.

1.3.5 Un nuevo mecanismo de la vía SAPK en *S. pombe*: Modulación de la activación del factor de transcripción Rst2 en respuesta a la escasez de glucosa.

Otro hallazgo importante de esta Tesis Doctoral es que la MAPK Sty1 fosforila a Rst2 en el aminoácido S292 regulando positivamente su actividad y su función en la modulación de la autofagia en respuesta al agotamiento de la glucosa (**Figuras 54 y 56**).

Por un lado, en ausencia de *sty1*⁺, pero no de *atf1*⁺, no se observó la fosforilación de la proteína de fusión Rst2-HA tras la limitación de glucosa, y tampoco en las células *pka1Δ sty1Δ* tras el ayuno de glucosa (**Figura 54**). La fosforilación de Rst2 por Sty1 podría mejorar su afinidad de unión y su reclutamiento a las secuencias reguladoras presentes en sus genes dianas (**Figura 57**). Dado que no observamos ausencia de fosforilación en el mutante Rst2.S292A en nuestras condiciones experimentales, no se descarta que otros sitios de MAPK puedan estar siendo modificados por Sty1 (**Figura 55**). Por otro lado, es intrigante que, aunque esta fosforilación específica en Rst2 no es esencial para el crecimiento respiratorio de *S. pombe* (**Figura 58**), sí lo es para la inducción autofágica en respuesta al déficit de glucosa (**Figura 59**). En resumen, estas evidencias demuestran cómo la vía SAPK de *S. pombe* interactúa con la señalización Pka1-Rst2 a través de la fosforilación directa del factor de transcripción Rst2 para regular positivamente la inducción transcripcional de la autofagia tras la limitación de la glucosa.

1.3.6 Un mecanismo innovador en la regulación de la autofagia en respuesta a la escasez de glucosa.

Todos los hallazgos clave descritos en este trabajo se recopilan en el modelo presentado en la **Figura 60**.

Las células de *S. pombe* crecen esencialmente a través de un metabolismo fermentativo cuando hay altas concentraciones de glucosa disponibles, aunque también se requiere de la respiración mitocondrial para mantener una proliferación celular óptima (Malecki et al., 2016; Malecki et al., 2020). Este estado metabólico da como resultado la regulación positiva de las vías de señalización TOR y AMPc-PKA, que bloquean el inicio de la autofagia al inhibir la actividad de la quinasa Atg1 y al factor de transcripción Rst2, respectivamente. Es más, Atg1 o algún otro componente de la maquinaria de iniciación de la autofagia, también podría ser regulado negativamente por Pka1. Por otro lado, en estas condiciones, el represor transcripcional implicado en la CCR, Scr1, bloquea constitutivamente la inducción transcripcional de genes para la asimilación de fuentes de carbono alternativas (glicerol) (Figura 60).

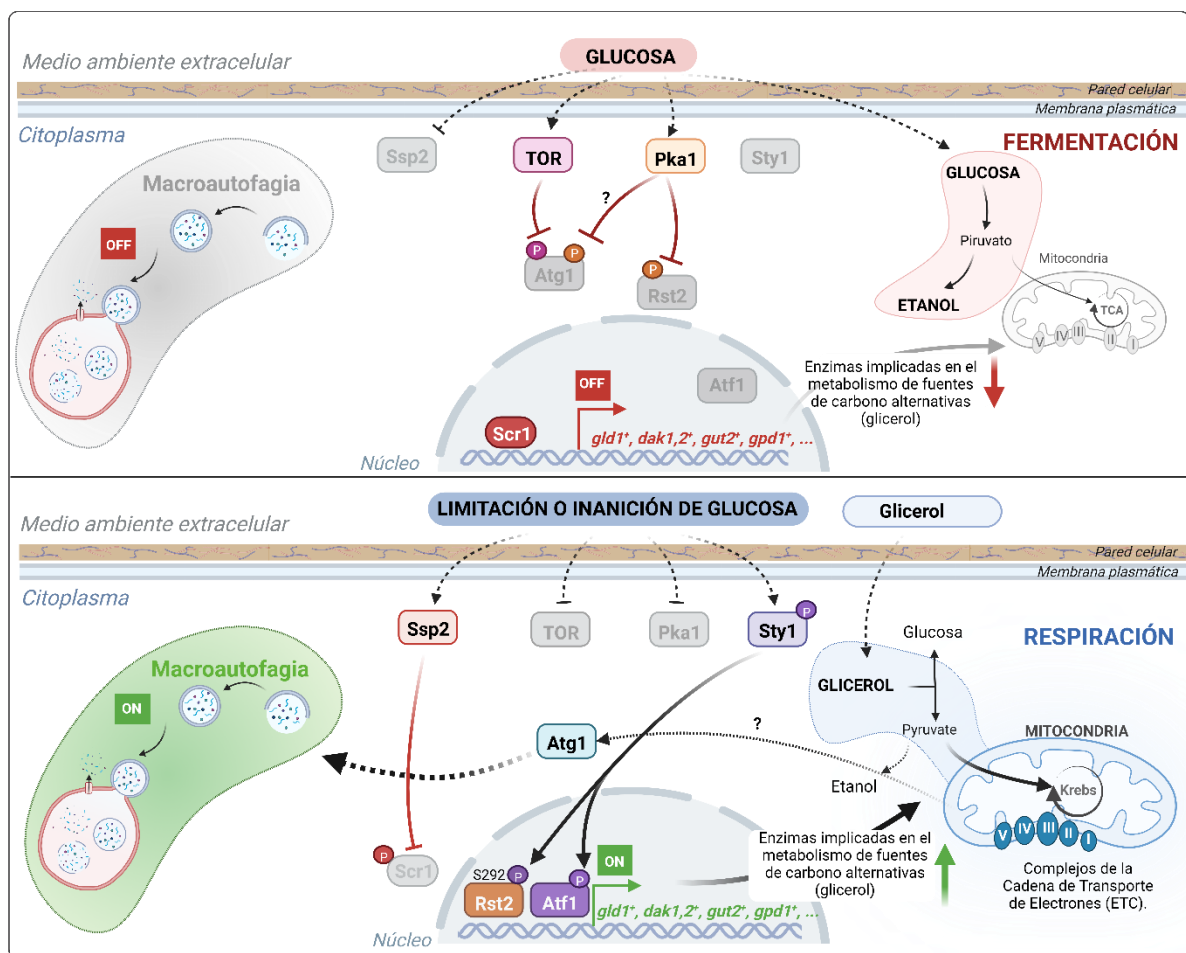


Figura 60. Modelo de regulación de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en *S. pombe*. Modelo que representa las vías de señalización y los mecanismos que regulan la inducción de la autofagia en *S. pombe* durante la transición del metabolismo fermentativo al respiratorio.

Tras la limitación o la inanición de glucosa, la inactivación de la vía AMPc-PKA provoca la translocación nuclear de Rst2. Este estímulo también activa la MAPK Sty1, lo que resulta en la fosforilación y activación de Atf1, y la fosforilación de Rst2 en S292. Adicionalmente, la AMPK Ssp2 promueve la exportación nuclear e inactivación de Scr1. En este contexto fisiológico, se induce la activación transcripcional específica de los genes implicados en la asimilación del glicerol (*gld1⁺*, *dak1⁺*, *dak2⁺*), y en el establecimiento del metabolismo respiratorio. Paralelamente, la falta de inhibición dependiente de TOR y Pka1 converge con los complejos de la ETC mediante mecanismos postranscripcionales aún no esclarecidos, para promover la activación completa de la quinasa Atg1 y la subsiguiente inducción de autofagia.

Finalmente, aunque el «dogma central» de la autofagia postula que esta respuesta degradativa sirve principalmente como fuente de nutrientes y combustibles durante el déficit nutricional, nuestros hallazgos van más allá. Señalan la implicación directa de la señalización nutricional en la regulación de la autofagia para hacer frente a la crisis energética. Esta simbiosis entre la activación del metabolismo mitocondrial y la autofagia resulta crucial para mantener la supervivencia y proliferación celular. En definitiva, nuestros datos revelan la existencia de un control ambiental altamente sofisticado y multifacético que regula esta respuesta adaptativa crucial para la supervivencia celular de *S. pombe*. Estos descubrimientos sentarán las bases para futuras investigaciones sobre la interacción entre la señalización nutricional, la autofagia y la reprogramación metabólica en *S. pombe*.

Conclusiones

Conclusiones específicas.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- El déficit de glucosa es un estímulo proautofágico en *S. pombe*, en el rango de concentraciones de glucosa en las que se promueve la transición eficaz del metabolismo fermentativo al crecimiento respiratorio.
- La inducción de la autofagia en respuesta a una limitación en la disponibilidad de glucosa requiere de una cadena de transporte de electrones mitocondrial plenamente funcional en *S. pombe*.
- La inactivación de la vía de señalización AMPc-PKA promueve la inducción de la autofagia en respuesta a un ayuno completo de glucosa al inducir una pre-adaptación al metabolismo respiratorio.
- En *S. pombe*, la ruta de señalización AMPc-PKA regula negativamente la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa de forma dependiente e independiente del factor de transcripción Rst2.
- El mecanismo que modula la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa ha evolucionado de forma diferente en *S. cerevisiae* y *S. pombe*.
- El componente de la vía de señalización de daño en ADN, Rad3, no está implicado en la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa en *S. pombe*.
- En *S. pombe*, la AMPK Ssp2 no está involucrada en la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa.
- La ruta de señalización de MAPK de respuesta estrés (SAPK) regula positivamente la inducción de la autofagia en respuesta al déficit de glucosa a través del factor de transcripción Atf1.
- En *S. pombe*, la expresión de los genes *gld1⁺*, *dak1⁺* y *dak2⁺*, implicados en la asimilación del glicerol, es esencial para una adecuada adaptación al metabolismo respiratorio y, consecuentemente, para la inducción de la autofagia.
- El represor transcripcional Scr1, implicado en la represión catabólica por fuente de carbono (CCR), regula negativamente la autofagia al reprimir la expresión de genes necesarios para un adecuado metabolismo respiratorio.
- La fosforilación *in vivo* de Rst2 en S292 por Sty1 potencia notablemente la actividad transcripcional de Rst2 en respuesta al déficit de glucosa, ejerciendo un impacto positivo en la inducción de la autofagia.

Conclusiones generales.

En base a estos resultados y conclusiones específicas, proponemos las siguientes conclusiones generales:

- 1- En *S. pombe*, la autofagia se induce en respuesta al déficit de glucosa cuando ocurre una adaptación eficaz al metabolismo respiratorio. Sin embargo, esto no sucede cuando las células son sometidas a un ayuno completo de glucosa.
- 2- La inducción de autofagia en respuesta al déficit de glucosa en *S. pombe* se regula a nivel transcripcional por las vías de señalización PKA-Rst2 y Sty1-Atf1. Además, en estas condiciones, la MAPK Sty1 contribuye positivamente a este proceso mediante la fosforilación y activación del factor de transcripción Rst2.
- 3- El metabolismo del glicerol, y en particular los genes implicados en su asimilación *gld1⁺*, *dak1⁺* y *dak2*, juegan un papel crucial en la adaptación al déficit de glucosa contribuyendo a la activación del proceso autofágico en *S. pombe*.

Referencias

- Abate, M., Festa, A., Falco, M., Lombardi, A., Luce, A., Grimaldi, A., . . . Misso, G. (2020). Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Semin Cell Dev Biol*, 98, 139-153. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.022>
- Abdelrahman, K. S., Hassan, H. A., Abdel-Aziz, S. A., Marzouk, A. A., Narumi, A., Konno, H., & Abdel-Aziz, M. (2021). JNK signaling as a target for anticancer therapy. *Pharmacological Reports*, 73, 405-434. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00238-y>
- Acevo-Rodríguez, P. S., Maldonado, G., Castro-Obregón, S., & Hernández, G. (2020). Autophagy regulation by the translation machinery and its implications in cancer. *Frontiers in oncology*, 10, 322. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00322>
- Adachi, A., Koizumi, M., & Ohsumi, Y. (2017). Autophagy induction under carbon starvation conditions is negatively regulated by carbon catabolite repression. *Journal of Biological Chemistry*, 292(48), 19905-19918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817510>
- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., & Lu, G. (2017). Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *International journal of molecular sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010048>
- Agus, H. H., Yilmaz, S., & Sengoz, C. O. (2019). Crosstalk between autophagy and apoptosis induced by camphor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Turkish Journal of Biology*, 43(6), 382-390. <https://doi.org/10.3906/biy-1908-11>
- Ahne, F., Merlos-Lange, A. M., Lang, B. F., & Wolf, K. (1984). The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* : 5. Characterization of mitochondrial deletion mutants. *Current genetics*, 8(7), 517-524. <https://doi.org/10.1007/bf00410438>
- Akram, M., Ali Shah, S. M., Munir, N., Daniyal, M., Tahir, I. M., Mahmood, Z., . . . Zainab, R. (2019). Hexose monophosphate shunt, the role of its metabolites and associated disorders: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 14473-14482. <https://doi.org/10.1002/jcp.28228>
- Alam, S., Gu, Y., Reichert, P., Bahler, J., & Oliferenko, S. (2022). Optimization of energy production and central carbon metabolism in a non-respiring eukaryote. *bioRxiv*, 2022.2012. 2029.522219. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.04.046>
- Alao, J.-P., Legon, L., Dabrowska, A., Tricolici, A.-M., Kumar, J., & Rallis, C. (2023). Interplays of AMPK and TOR in Autophagy Regulation in Yeast. *Cells*, 12(4), 519. <https://doi.org/10.3390/cells12040519>
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). The incredible ULKs. *Cell Communication and Signaling*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-7>
- Allen, C., Buttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., . . . Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *Journal of Cell Biology*, 174(1), 89-100. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604072>
- Alsaadi, R. M., Losier, T. T., Tian, W., Jackson, A., Guo, Z., Rubinsztein, D. C., & Russell, R. C. (2019). ULK1-mediated phosphorylation of ATG16L1 promotes xenophagy, but destabilizes the ATG16L1 Crohn's mutant. *EMBO reports*, 20(7), e46885. <https://doi.org/10.15252/embr.201846885>
- Alvarez, B., & Moreno, S. (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *Journal of cell science*, 119(Pt 21), 4475-4485. <https://doi.org/10.1242/jcs.03241>
- Alvers, A. L., Wood, M. S., Hu, D., Kaywell, A. C., Dunn, W. A., Jr., & Aris, J. P. (2009). Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin. *Autophagy*, 5(6), 847-849. <https://doi.org/10.4161/auto.8824>
- Anderson, R. M., & Weindruch, R. (2010). Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(3), 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.005>
- Anding, A. L., & Baehrecke, E. H. (2017). Cleaning house: selective autophagy of organelles. *Developmental cell*, 41(1), 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.016>
- Aoyama, K., Aiba, H., & Mizuno, T. (2001). Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(10), 2347-2352. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2347>
- Aoyama, K., Mitsubayashi, Y., Aiba, H., & Mizuno, T. (2000). Spy1, a histidine-containing phosphotransfer signaling protein, regulates the fission yeast cell cycle through the Mcs4 response regulator. *Journal of bacteriology*, 182(17), 4868-4874. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4868-4874.2000>
- Araki, Y., Ku, W. C., Akioka, M., May, A. I., Hayashi, Y., Arisaka, F., . . . Ohsumi, Y. (2013). Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *Journal of Cell Biology*, 203(2), 299-313. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304123>

- Asada, R., & Hirota, K. (2022). Multi-Layered Regulations on the Chromatin Architectures: Establishing the Tight and Specific Responses of Fission Yeast *fbp1* Gene Transcription. *Biomolecules*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/biom12111642>
- Asada, R., Senmatsu, S., Montpetit, B., & Hirota, K. (2020). Topoisomerase activity is linked to altered nucleosome positioning and transcriptional regulation in the fission yeast *fbp1* gene. *PLoS One*, 15(11), e0242348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242348>
- Asada, R., Takemata, N., Hoffman, C. S., Ohta, K., & Hirota, K. (2015). Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. *Molecular and Cellular Biology*, 35(5), 847-855. <https://doi.org/10.1128/MCB.00924-14>
- Ashe, M. P., De Long, S. K., & Sachs, A. B. (2000). Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Molecular biology of the cell*, 11(3), 833-848. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.833>
- Aspuria, P.-J., & Tamanoi, F. (2008). The Tsc/Rheb signaling pathway controls basic amino acid uptake via the Cat1 permease in fission yeast. *Molecular Genetics & Genomics*, 279, 441-450. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0320-y>
- Averill-Bates, D. A. (2023). The antioxidant glutathione. *Vitamins and Hormones*, 121, 109-141. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>
- Baba, M., Osumi, M., & Ohsumi, Y. (1995). Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell structure and function*, 20(6), 465-471. <https://doi.org/10.1247/csf.20.465>
- Backer, J. M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*, 410(1), 1-17. <https://doi.org/10.1042/BJ20071427>
- Backer, J. M. (2016). The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. *Biochemical Journal*, 473(15), 2251-2271. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160170>
- Backues, S. K., Orban, D. P., Bernard, A., Singh, K., Cao, Y., & Klionsky, D. J. (2015). Atg23 and Atg27 act at the early stages of Atg9 trafficking in *S. cerevisiae*. *Traffic*, 16(2), 172-190. <https://doi.org/10.1111/tra.12240>
- Bähler, J., Wu, J.-Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., Mckenzie III, A., Steever, A. B., . . . Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 14(10), 943-951. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<943::AID-YEA292>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<943::AID-YEA292>3.0.CO;2-Y)
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., Van Maris, A. J. A., Kötter, P., Luttik, M. A. H., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 15-37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x>
- Balderhaar, H. J., Arlt, H., Ostrowicz, C., Brocker, C., Sundermann, F., Brandt, R., . . . Ungermann, C. (2010). The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *Journal of cell science*, 123(Pt 23), 4085-4094. <https://doi.org/10.1242/jcs.071977>
- Barba-Aliaga, M., & Alepuz, P. (2022). Role of eIF5A in Mitochondrial Function. *International journal of molecular sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031284>
- Barth, H., Meiling-Wesse, K., Epple, U. D., & Thumm, M. (2001). Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS letters*, 508(1), 23-28. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03016-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03016-2)
- Barz, S., Kriegenburg, F., Henning, A., Bhattacharya, A., Mancilla, H., Sanchez-Martin, P., & Kraft, C. (2020). Atg1 kinase regulates autophagosome-vacuole fusion by controlling SNARE bundling. *EMBO reports*, 21(12), e51869. <https://doi.org/10.15252/embr.202051869>
- Bas, L., Papinski, D., Licheva, M., Torggler, R., Rohringer, S., Schuschnig, M., & Kraft, C. (2018). Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion. *Journal of Cell Biology*, 217(10), 3656-3669. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804028>
- Beach, D., Nurse, P., & Egel, R. (1982). Molecular rearrangement of mating-type genes in fission yeast. *Nature*, 296(5858), 682-683. <https://doi.org/10.1038/296682a0>
- Birgisdottir, A. B., Mouilleron, S., Bhujabal, Z., Wirth, M., Sjøttem, E., Evjen, G., . . . Johansen, T. (2019). Members of the autophagy class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I interact with GABARAP and GABARAPL1 via LIR motifs. *Autophagy*, 15(8), 1333-1355. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1581009>
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W. W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., & Sabatini, D. M. (2015). An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis. *Cell*, 162(3), 540-551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>

- Borst, P. (2020). The malate-aspartate shuttle (Borst cycle): How it started and developed into a major metabolic pathway. *IUBMB Life*, 72(11), 2241-2259. <https://doi.org/10.1002/iub.2367>
- Boutry, M., & Douglas, M. G. (1983). Complementation of a *Schizosaccharomyces pombe* mutant lacking the beta subunit of the mitochondrial ATPase by the ATP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 258(24), 15214-15219.
- Bouzier-Sore, A.-K., & Bolaños, J. P. (2015). Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: relevance for neurodegeneration and aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 89. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00089>
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192(1), 73-105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Budovskaya, Y. V., Hama, H., DeWald, D. B., & Herman, P. K. (2002). The C terminus of the Vps34p phosphoinositide 3-kinase is necessary and sufficient for the interaction with the Vps15p protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 287-294. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109263200>
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2005). An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13933-13938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501046102>
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Reggiori, F., Klionsky, D. J., & Herman, P. K. (2004). The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20663-20671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400272200>
- Bulder, C. J. (1964a). Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 30, 1-9. <https://doi.org/10.1007/bf02046695>
- Bulder, C. J. (1964b). Lethality of the petite mutation in petite negative yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 30, 442-454. <https://doi.org/10.1007/bf02046758>
- Byrne, S. M., & Hoffman, C. S. (1993). Six git genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science*, 105 (Pt 4)(0 4), 1095-1100. <https://doi.org/10.1242/jcs.105.4.1095>
- Camarasa, C., Grivet, J. P., & Dequin, S. (2003). Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, 149(Pt 9), 2669-2678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0>
- Canaves, J. M., & Taylor, S. S. (2002). Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *Journal of molecular evolution*, 54, 17-29. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0013-1>
- Canovas, B., & Nebreda, A. R. (2021). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 22(5), 346-366. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>
- Cebollero, E., & Reggiori, F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1793(9), 1413-1421. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.008>
- Cebollero, E., van der Vaart, A., Zhao, M., Rieter, E., Klionsky, D. J., Helms, J. B., & Reggiori, F. (2012). Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Current Biology*, 22(17), 1545-1553. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.029>
- Chan, T. F., Bertram, P. G., Ai, W., & Zheng, X. F. (2001). Regulation of APG14 expression by the GATA-type transcription factor Gln3p. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6463-6467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008162200>
- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., . . . Bahler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular Biology of the Cell*, 14(1), 214-229. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0499>
- Chen, R. E., & Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.*, 1773(8), 1311-1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.003>

- Cherra, S. J., 3rd, Kulich, S. M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B. W., & Chu, C. T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *Journal of Cell Biology*, 190(4), 533-539. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002108>
- Chew, L. H., Setiaputra, D., Klionsky, D. J., & Yip, C. K. (2013). Structural characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* autophagy regulatory complex Atg17-Atg31-Atg29. *Autophagy*, 9(10), 1467-1474. <https://doi.org/10.4161/auto.25687>
- Chiron, S., Suleau, A., & Bonnefoy, N. (2005). Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast. *Genetics*, 169(4), 1891-1901. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.037473>
- Chumpen Ramirez, S., Gómez-Sánchez, R., Verlhac, P., Hardenberg, R., Margheritis, E., Cosentino, K., . . . Ungermann, C. (2023). Atg9 interactions via its transmembrane domains are required for phagophore expansion during autophagy. *Autophagy*, 19(5), 1459-1478. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2136340>
- Chung, K. W., & Chung, H. Y. (2019). The effects of calorie restriction on autophagy: role on aging intervention. *Nutrients*, 11(12), 2923. <https://doi.org/10.3390/nu11122923>
- Cohen, A., Kupiec, M., & Weisman, R. (2014). Glucose activates TORC2-Gad8 protein via positive regulation of the cAMP/cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway and negative regulation of the Pmk1 protein-mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 289(31), 21727-21737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573824>
- Compagno, C., Dashko, S., & Piškur, J. (2014). Introduction to carbon metabolism in yeast. *Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism*, 1-19. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3_1
- Corkins, M. E., Wilson, S., Cocuron, J. C., Alonso, A. P., & Bird, A. J. (2017). The gluconate shunt is an alternative route for directing glucose into the pentose phosphate pathway in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 292(33), 13823-13832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798488>
- Corral-Ramos, C., Barrios, R., Ayte, J., & Hidalgo, E. (2021). TOR and MAP kinase pathways synergistically regulate autophagy in response to nutrient depletion in fission yeast. *Autophagy*, 18(2), 375-390. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1935522>
- Cortés, J. C. G., Ramos, M., Osumi, M., Pérez, P., & Ribas, J. C. (2016). Fission yeast septation. *Communicative & Integrative Biology*, 9(4), e1189045. <https://doi.org/10.1080/19420889.2016.1189045>
- Cytrynska, M., Wojda, I., Frajnt, M., & Jakubowicz, T. (1999). PKA from *Saccharomyces cerevisiae* can be activated by cyclic AMP and cyclic GMP. *Can J Microbiol*, 45(1), 31-37. <https://doi.org/10.1139/w98-214>
- Darsow, T., Rieder, S. E., & Emr, S. D. (1997). A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *Journal of Cell Biology*, 138(3), 517-529. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.3.517>
- Davidson, M. K., Shandilya, H. K., Hirota, K., Ohta, K., & Wahls, W. P. (2004). Atf1-Pcr1-M26 complex links stress-activated MAPK and cAMP-dependent protein kinase pathways via chromatin remodeling of *cgs2+*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50857-50863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409079200>
- Davie, E., Forte, G. M., & Petersen, J. (2015). Nitrogen regulates AMPK to control TORC1 signaling. *Current Biology*, 25(4), 445-454. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.034>
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44(2), 149-156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
- de Jong-Gubbels, P., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1996). Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol. *Microbiology*, 142, 1399-1407. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-6-1399>
- de Kok, S., Kozak, B. U., Pronk, J. T., & van Maris, A. J. (2012). Energy coupling in *Saccharomyces cerevisiae*: selected opportunities for metabolic engineering. *FEMS Yeast Research*, 12(4), 387-397. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00799.x>
- Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular signalling*, 16(10), 1113-1121. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.04.006>
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7(1), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
- Deckert, J., & Struhl, K. (2001). Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Molecular and Cellular Biology*, 21(8), 2726-2735. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.8.2726-2735.2001>

- Degols, G., Shiozaki, K., & Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2870-2877. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2870>
- Demirbas, D., Ceyhan, O., Wyman, A. R., Ivey, F. D., Allain, C., Wang, L., . . . Hoffman, C. (2011). Use of a *Schizosaccharomyces pombe* PKA-repressible reporter to study cGMP metabolising phosphodiesterases. *Cellular signalling*, 23(3), 594-601. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.11.013>
- Deng, Z., Li, X., Blanca Ramirez, M., Purtell, K., Choi, I., Lu, J. H., . . . Yue, Z. (2021). Selective autophagy of AKAP11 activates cAMP/PKA to fuel mitochondrial metabolism and tumor cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.2020215118>
- DeVoti, J., Seydoux, G., Beach, D., & McLeod, M. (1991). Interaction between *ran1+* protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *EMBO Journal*, 10(12), 3759-3768. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04945.x>
- Di Bartolomeo, F., Malina, C., Campbell, K., Mormino, M., Fuchs, J., Vorontsov, E., . . . Nielsen, J. (2020). Absolute yeast mitochondrial proteome quantification reveals trade-off between biosynthesis and energy generation during diauxic shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(13), 7524-7535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918216117>
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., & Crespo, J. L. (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*, 4(7), 851-865. <https://doi.org/10.4161/auto.6555>
- Dice, J. F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 3(4), 295-299. <https://doi.org/10.4161/auto.4144>
- Dice, J. F., Chiang, H. L., Spencer, E. P., & Backer, J. M. (1986). Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A. Identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 261(15), 6853-6859. <https://doi.org/10.4161/auto.4144>
- Dokládál, L., Stumpe, M., Hu, Z., Jaquenoud, M., Dengjel, J., & De Virgilio, C. (2021). Phosphoproteomic responses of TORC1 target kinases reveal discrete and convergent mechanisms that orchestrate the quiescence program in yeast. *Cell Reports*, 37(13). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110149>
- Easlon, E., Tsang, F., Skinner, C., Wang, C., & Lin, S. J. (2008). The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast. *Genes & Development*, 22(7), 931-944. <https://doi.org/10.1101/gad.1648308>
- Emami, P., & Ueno, M. (2021). 3,3'-Diindolylmethane induces apoptosis and autophagy in fission yeast. *PLoS One*, 16(12), e0255758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255758>
- Epifanova, O. I., & Tersikh, V. V. (1969). On the resting periods in the cell life cycle. *Cell Proliferation*, 2(1), 75-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1969.tb00339.x>
- Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E. L., & Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *Journal of bacteriology*, 183(20), 5942-5955. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5942-5955.2001>
- Esclatine, A., Chaumorcel, M., & Codogno, P. (2009). Macroautophagy signaling and regulation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 335, 33-70. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_2
- Esteban-Martínez, L., Sierra-Filardi, E., McGreal, R. S., Salazar-Roa, M., Mariño, G., Seco, E., . . . Boya, P. (2017). Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO Journal*, 36(12), 1688-1706. <https://doi.org/10.15252/emj.201695916>
- Falson, P., Maffey, L., Conrath, K., & Boutry, M. (1991). Alpha subunit of mitochondrial F1-ATPase from the fission yeast. Deduced sequence of the wild type and identification of a mutation that alters apparent negative cooperativity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(1), 287-293. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52433-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52433-9)
- Farooq, A., & Zhou, M.-M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling*, 16(7), 769-779. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.12.008>
- Feng, W., Wu, T., Dan, X., Chen, Y., Li, L., Chen, S., . . . Yu, L. (2015). Phosphorylation of Atg31 is required for autophagy. *Protein Cell*, 6(4), 288-296. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0138-4>
- Fengsrud, M., Erichsen, E. S., Berg, T. O., Raiborg, C., & Seglen, P. O. (2000). Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *European journal of cell biology*, 79(12), 871-882. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00125>

- Ferreira, L. M., Hebrant, A., & Dumont, J. E. (2012). Metabolic reprogramming of the tumor. *Oncogene*, 31(36), 3999-4011. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.576>
- Flanagan, M. D., Whitehall, S. K., & Morgan, B. A. (2013). An Atg10-like E2 enzyme is essential for cell cycle progression but not autophagy in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*, 12(2), 271-277. <https://doi.org/10.4161/cc.23055>
- Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T., & Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 507-529. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x>
- Forsburg, S. L., & Rhind, N. (2006). Basic methods for fission yeast. *Yeast*, 23(3), 173-183. <https://doi.org/10.1002/yea.1347>
- Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. Ø., & Nielsen, J. (2003). Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome research*, 13(2), 244-253. <https://doi.org/10.1101/gr.234503>
- Forte, G. M., Davie, E., Lie, S., Franz-Wachtel, M., Ovens, A. J., Wang, T., . . . Petersen, J. (2019). Import of extracellular ATP in yeast and man modulates AMPK and TORC1 signalling. *Journal of cell science*, 132(7), jcs223925. <https://doi.org/10.1242/jcs.223925>
- Fracchiolla, D., Sawa-Makarska, J., & Martens, S. (2017). Beyond Atg8 binding: The role of AIM/LIR motifs in autophagy. *Autophagy*, 13(5), 978-979. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1277311>
- Fraile Beneitez, R., Sánchez Mir, L., Hidalgo Hernando, E., & 874-7. (2020). A new adaptation strategy to glucose starvation: modulation of the gluconate shunt and pentose phosphate pathway by the transcriptional repressor Rsv1. *FEBS letters*, 287 : 874-7. <https://doi.org/10.1111/febs.15131>
- Frajnt, M., Cytryńska, M., & Jakubowicz, T. (2003). The effect of cAMP and cGMP on the activity and substrate specificity of protein kinase A from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1111-1118. https://doi.org/10.18388/abp.2003_3635
- Friedel, A. M., Pike, B. L., & Gasser, S. M. (2009). ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.017>
- Fujioka, Y., Alam, J. M., Noshiro, D., Mouri, K., Ando, T., Okada, Y., . . . Noda, N. N. (2020). Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature*, 578(7794), 301-305. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1977-6>
- Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., . . . Noda, N. N. (2014). Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nature structural & Molecular Biology of the Cell*, 21(6), 513-521. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2822>
- Fukuda, T., Ebi, Y., Saigusa, T., Furukawa, K., Yamashita, S. I., Inoue, K., . . . Kanki, T. (2020). Atg43 tethers isolation membranes to mitochondria to promote starvation-induced mitophagy in fission yeast. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.61245>
- Fuller, G. G., & Kim, J. K. (2021). Compartmentalization and metabolic regulation of glycolysis. *Journal of cell science*, 134(20). <https://doi.org/10.1242/jcs.258469>
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., & Vancura, A. (2010). Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS*, 14(6), 629-638. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0069>
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334-361. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.334-361.1998>
- Gao, J., Kurre, R., Rose, J., Walter, S., Frohlich, F., Piehler, J., . . . Ungermann, C. (2020). Function of the SNARE Ykt6 on autophagosomes requires the Dsl1 complex and the Atg1 kinase complex. *EMBO reports*, 21(12), e50733. <https://doi.org/10.15252/embr.202050733>
- Ge, J., Liu, Y., Li, Q., Guo, X., Gu, L., Ma, Z. G., & Zhu, Y. P. (2013). Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK. *Biomedical and Environmental Sciences*, 26(11), 902-911. <https://doi.org/10.3967/bes2013.019>
- Genova, M. L., & Lenaz, G. (2015). The interplay between respiratory supercomplexes and ROS in aging. *Antioxidants and redox signaling*, 23(3), 208-238. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6214>
- Ghanem, N., El-Baba, C., Araji, K., El-Khoury, R., Usta, J., & Darwiche, N. (2021). The pentose phosphate pathway in cancer: regulation and therapeutic opportunities. *Chemotherapy*, 66(5-6), 179-191. <https://doi.org/10.1159/000519784>
- Giandomenico, A. R., Cerniglia, G. E., Biaglow, J. E., Stevens, C. W., & Koch, C. J. (1997). The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 426-434. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00113-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00113-5)

- Giga-Hama, Y., & Kumagai, H. (1999). Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30(3), 235-244. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00776.x>
- Gómez-Sánchez, R., Rose, J., Guimarães, R., Mari, M., Papinski, D., Rieter, E., . . . Ungermann, C. (2018). Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *Journal of Cell Biology*, 217(8), 2743-2763. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710116>
- Gómez, L. A., & Hagen, T. M. (2012). Age-related decline in mitochondrial bioenergetics: does supercomplex destabilization determine lower oxidative capacity and higher superoxide production? *Semin Cell Dev Biol*,
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., . . . Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development*, 12(4), 586-597. <https://doi.org/10.1101/gad.12.4.586>
- Gould, K. L., & Simanis, V. (1997). The control of septum formation in fission yeast. *Genes and Development*, 11(22), 2939-2951. <https://doi.org/10.1101/gad.11.22.2939>
- Graef, M., Friedman, J. R., Graham, C., Babu, M., & Nunnari, J. (2013). ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Molecular Biology of the Cell*, 24(18), 2918-2931. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0381>
- Graef, M., & Nunnari, J. (2011). Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. *EMBO Journal*, 30(11), 2101-2114. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.104>
- Grallert, A., & Hagan, I. M. (2017). Preparation of protein extracts from *Schizosaccharomyces pombe* using trichloroacetic acid precipitation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(2), pdb.prot091579. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot091579>
- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., & Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 187-206. <https://doi.org/10.1128/mubr.68.2.187-206.2004>
- Gross, A. S., & Graef, M. (2020). Mechanisms of Autophagy in Metabolic Stress Response. *Journal of Molecular Biology*, 432(1), 28-52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.09.005>
- Guan, J., Stromhaug, P. E., George, M. D., Habibzadegah-Tari, P., Bevan, A., Dunn, W. A., Jr., & Klionsky, D. J. (2001). Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport, pexophagy, and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Molecular biology of the cell*, 12(12), 3821-3838. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.12.3821>
- Guarino, V. A., Oldham, W. M., Loscalzo, J., & Zhang, Y.-Y. (2019). Reaction rate of pyruvate and hydrogen peroxide: assessing antioxidant capacity of pyruvate under biological conditions. *Scientific reports*, 9(1), 19568. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55951-9>
- Gupta, D. R., Paul, S. K., Oowatari, Y., Matsuo, Y., & Kawamukai, M. (2011a). Complex formation, phosphorylation, and localization of protein kinase A of *Schizosaccharomyces pombe* upon glucose starvation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(8), 1456-1465. <https://doi.org/10.1271/bbb.110125>
- Gupta, D. R., Paul, S. K., Oowatari, Y., Matsuo, Y., & Kawamukai, M. (2011b). Multistep regulation of protein kinase A in its localization, phosphorylation and binding with a regulatory subunit in fission yeast. *Current genetics*, 57(5), 353-365. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0354-2>
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., & Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1264-1300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1264-1300.1998>
- Hagan, I. M., & Hyams, J. S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science*, 89(3), 343-357. <https://doi.org/10.1242/jcs.89.3.343>
- Hall, M. N. (2008). mTOR—what does it do? *Transplantation proceedings*,
- Hanahan, D.-. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanyu, Y., Imai, K. K., Kawasaki, Y., Nakamura, T., Nakaseko, Y., Nagao, K., . . . Hayashi, T. (2009). *Schizosaccharomyces pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor. *Genes to Cells*, 14(5), 539-554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01290.x>
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), 774-785. <https://doi.org/10.1038/nrm2249>

- Hardie, D. G. (2008). AMPK and Raptor: Matching cell growth to energy supply. *Mol Cell*, 30(3), 263-265. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.012>
- Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, A. F., & Schreiber, S. L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 14866-14870. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14866>
- Hartmuth, S., & Petersen, J. (2009). Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *Journal of cell science*, 122(11), 1737-1746. <https://doi.org/10.1242/jcs.049387>
- Hatano, T., Morigasaki, S., Tatebe, H., Ikeda, K., & Shiozaki, K. (2015). Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle*, 14(6), 848-856. <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000215>
- Hayashi, T., Hatanaka, M., Nagao, K., Nakaseko, Y., Kanoh, J., Kokubu, A., . . . Yanagida, M. (2007). Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes to Cells*, 12(12), 1357-1370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01141.x>
- He, L., Zhang, J., Zhao, J., Ma, N., Kim, S. W., Qiao, S., & Ma, X. (2018). Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress. *Advances in Nutrition*, 9(4), 493-504. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy011>
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., & Hedges, S. B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 293(5532), 1129-1133. <https://doi.org/10.1126/science.1061457>
- Heiland, S., Radovanovic, N., Höfer, M., Winderickx, J., & Lichtenberg, H. (2000). Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of bacteriology*, 182(8), 2153-2162. <https://doi.org/10.1128/jb.182.8.2153-2162.2000>
- Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhoute, J., & Carr, A. M. (2005). Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 22(13), 1013-1019. <https://doi.org/10.1002/yea.1291>
- Higuchi, T., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (2002). Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 22(1), 1-11. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.1.1-11.2002>
- Hirota, K., Hoffman, C. S., & Ohta, K. (2006). Reciprocal nuclear shuttling of two antagonizing Zn finger proteins modulates Tup family corepressor function to repress chromatin remodeling. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1980-1989. <https://doi.org/10.1128/EC.00272-06>
- Hirota, K., Hoffman, C. S., Shibata, T., & Ohta, K. (2003). Fission yeast Tup1-like repressors repress chromatin remodeling at the *fbp1*⁺ promoter and the *ade6*-M26 recombination hotspot. *Genetics*, 165(2), 505-515. <https://doi.org/10.1093/genetics/165.2.505>
- Hirota, K., Mizuno, K.-i., Shibata, T., & Ohta, K. (2008). Distinct chromatin modulators regulate the formation of accessible and repressive chromatin at the fission yeast recombination hotspot *ade6*-M26. *Molecular biology of the cell*, 19(3), 1162-1173. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-04-0377>
- Hitomi, K., Kotani, T., Noda, N. N., Kimura, Y., & Nakatogawa, H. (2023). The Atg1 complex, Atg9, and Vac8 recruit PI3K complex I to the pre-autophagosomal structure. *Journal of Cell Biology*, 222(8). <https://doi.org/10.1083/jcb.202210017>
- Hoffman, C. S. (2005). Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 1), 257-260. <https://doi.org/10.1042/BST0330257>
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformant of *Escherichia coli*. *GENE*, 57(2), 267-272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1991). Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes & Development*, 5(4), 561-571. <https://doi.org/10.1101/gad.5.4.561>
- Hu, J., Wei, M., Mirzaei, H., Madia, F., Mirisola, M., Amparo, C., . . . Longo, V. D. (2014). Tor-Sch9 deficiency activates catabolism of the ketone body-like acetic acid to promote trehalose accumulation and longevity. *Aging Cell*, 13(3), 457-467. <https://doi.org/10.1111/acer.12202>
- Hu, Y., & Reggiori, F. (2022). Molecular regulation of autophagosome formation. *Biochemical Society Transactions*, 50(1), 55-69. <https://doi.org/10.1042/BST20210819>

- Hu, Z., Raucci, S., Jaquenoud, M., Hatakeyama, R., Stumpe, M., Rohr, R., . . . Dengjel, J. (2019). Multilayered Control of Protein Turnover by TORC1 and Atg1. *Cell Reports*, 28(13), 3486-3496 e3486. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.069>
- Hwang, C. J., Kim, Y. E., Son, D. J., Park, M. H., Choi, D.-Y., Park, P.-H., . . . Hong, J. T. (2017). Parkin deficiency exacerbate ethanol-induced dopaminergic neurodegeneration by P38 pathway dependent inhibition of autophagy and mitochondrial function. *Redox Biology*, 11, 456-468. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.008>
- Hwangbo, D.-S., Lee, H.-Y., Abozaid, L. S., & Min, K.-J. (2020). Mechanisms of lifespan regulation by calorie restriction and intermittent fasting in model organisms. *Nutrients*, 12(4), 1194. <https://doi.org/10.3390/nu12041194>
- Ikai, N., Nakazawa, N., Hayashi, T., & Yanagida, M. (2011). The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separate-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Open Biology*, 1(3), 110007. <https://doi.org/10.1098/rsob.110007>
- Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F., & Shiozaki, K. (2008). Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle*, 7(3), 358-364. <https://doi.org/10.4161/cc.7.3.5245>
- Innokentev, A., & Kanki, T. (2021). Mitophagy in yeast: Molecular mechanism and regulation. *Cells*, 10(12), 3569. <https://doi.org/10.3390/cells10123569>
- Ishii, S., Matsuura, A., & Itakura, E. (2019). Identification of a factor controlling lysosomal homeostasis using a novel lysosomal trafficking probe. *Scientific reports*, 9(1), 11635. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48131-2>
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T., & Yamamoto, M. (1992). Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes & Development*, 6(12b), 2455-2462. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12b.2455>
- Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A. R., Van Aalten, D. M. F., & Alessi, D. R. (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochemical Journal*, 394(3), 545-555. <https://doi.org/10.1042/BJ20051844>
- Janoo, R. T. K., Neely, L. A., Braun, B. R., Whitehall, S. K., & Hoffman, C. S. (2001). Transcriptional regulators of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene include two redundant Tup1p-like corepressors and the CCAAT binding factor activation complex. *Genetics*, 157(3), 1205-1215. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.3.1205>
- Jazwinski, S. M. (2013). The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1833(2), 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.010>
- Jeffares, D. C. (2018). The natural diversity and ecology of fission yeast. *Yeast*, 35(3), 253-260. <https://doi.org/10.1002/yea.3293>
- Jia, S., Noma, K.-i., & Grewal, S. I. S. (2004). RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. *Science*, 304(5679), 1971-1976. <https://doi.org/10.1126/science.1099035>
- Jiang, G., Liu, Q., Kato, T., Miao, H., Gao, X., Liu, K., . . . Fang, Y. (2021). Role of mitochondrial complex III/IV in the activation of transcription factor Rst2 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology*, 115(6), 1323-1338. <https://doi.org/10.1111/mmi.14678>
- Jimenez-Saucedo, T., Berlanga, J. J., & Rodriguez-Gabriel, M. (2021). Translational control of gene expression by eIF2 modulates proteostasis and extends lifespan. *Aging*, 13(8), 10989-11009. <https://doi.org/10.18632/aging.203018>
- Jin, M., & Klionsky, D. J. (2014). Regulation of autophagy: Modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS letters*, 588(15), 2457-2463. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.015>
- Jin, X., Townley, R., & Shapiro, L. (2007). Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. *Structure*, 15(10), 1285-1295. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.07.017>
- Johnson, L. N., Noble, M. E., & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85(2), 149-158. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81092-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81092-2)
- Juris, L., Montino, M., Rube, P., Schlotterhose, P., Thumm, M., & Krick, R. (2015). PI3P binding by Atg21 organises Atg8 lipidation. *EMBO Journal*, 34(7), 955-973. <https://doi.org/10.15252/embj.201488957>
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *Journal of Cell Biology*, 150(6), 1507-1513. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1507>

- Kamada, Y., Yoshino, K., Kondo, C., Kawamata, T., Oshiro, N., Yonezawa, K., & Ohsumi, Y. (2010). Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Molecular and Cellular Biology*, 30(4), 1049-1058. <https://doi.org/10.1128/MCB.01344-09>
- Kamrad, S., Grossbach, J., Rodríguez-López, M., Mülleder, M., Townsend, S., Cappelletti, V., . . . Bähler, J. (2020). Pyruvate kinase variant of fission yeast tunes carbon metabolism, cell regulation, growth and stress resistance. *Molecular Systems Biology*, 16(4), e9270. <https://doi.org/10.15252/msb.20199270>
- Kamrad, S., Grossbach, J., Rodríguez-López, M., Townsend, S., Mülleder, M., Cappelletti, V., . . . Ralser, M. (2019). A natural variant of the sole pyruvate kinase of fission yeast lowers glycolytic flux triggering increased respiration and oxidative-stress resistance but decreased growth. *bioRxiv*, 770768. <https://doi.org/10.15252/msb.20199270>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Karin, M., & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology*, 5(7), 747-757. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00151-5)
- Kato, T., Zhou, X., & Ma, Y. (2013). Possible involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in glucose deprivation-induced activation of transcription factor rst2. *PLoS One*, 8(10), e78012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078012>
- Kaufmann, A., Beier, V., Franquelim, H. G., & Wollert, T. (2014). Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell*, 156(3), 469-481. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.022>
- Keil, E., Höcker, R., Schuster, M., Essmann, F., Ueffing, N., Hoffman, B., . . . Schmitz, I. (2013). Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45β–MEKK4–p38 pathway inhibits autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 20(2), 321-332. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.129>
- Kelly, T. J., Martin, G. S., Forsburg, S. L., Stephen, R. J., Russo, A., & Nurse, P. (1993). The fission yeast *cdc18+* gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell*, 74(2), 371-382. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90427-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90427-R)
- Kettenbach, A. N., Deng, L., Wu, Y., Baldissard, S., Adamo, M. E., Gerber, S. A., & Moseley, J. B. (2015). Quantitative phosphoproteomics reveals pathways for coordination of cell growth and division by the conserved fission yeast kinase pom1. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(5), 1275-1287. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.045245>
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 152(3), 519-530. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.519>
- Kijanska, M., Dohnal, I., Reiter, W., Kaspar, S., Stoffel, I., Ammerer, G., . . . Peter, M. (2010). Activation of Atg1 kinase in autophagy by regulated phosphorylation. *Autophagy*, 6(8), 1168-1178. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13849>
- Kijanska, M., & Peter, M. (2013). Atg1 kinase regulates early and late steps during autophagy. *Autophagy*, 9(2), 249-251. <https://doi.org/10.4161/auto.22584>
- Kim, D. U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H. O., Won, M., . . . Hoe, K. L. (2010). Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*, 28(6), 617-623. <https://doi.org/10.1038/nbt.1628>
- Kim, E. J., Cho, Y. J., Chung, W. H., & Roe, J. H. (2020). The role of Rsv1 in the transcriptional regulation of genes involved in sugar metabolism for long-term survival. *FEBS Journal*, 287(5), 878-896. <https://doi.org/10.1111/febs.15052>
- Kim, H. S., Choi, E. S., Shin, J. A., Jang, Y. K., & Dai Park, S. (2004). Regulation of Swi6/HP1-dependent heterochromatin assembly by cooperation of components of the mitogen-activated protein kinase pathway and a histone deacetylase Clr6. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42850-42859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407259200>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13(2), 132-141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- King, J. S. (2012). Autophagy across the eukaryotes. *Autophagy*, 8(7), 1159-1162. <https://doi.org/10.4161/auto.20527>
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., . . . Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *Journal of Cell Biology*, 147(2), 435-446. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.435>

- Kirkin, V., & Rogov, V. V. (2019). A diversity of selective autophagy receptors determines the specificity of the autophagy pathway. *Mol Cell*, 76(2), 268-285. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.005>
- Klein, T., Heinzle, E., & Schneider, K. (2013). Metabolic fluxes in *Schizosaccharomyces pombe* grown on glucose and mixtures of glycerol and acetate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 5013-5026. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4718-z>
- Klement, T., Dankmeyer, L., Hommes, R., van Solingen, P., & Büchs, J. (2011). Acetate-glycerol cometabolism: cultivating *Schizosaccharomyces pombe* on a non-fermentable carbon source in a defined minimal medium. *J Biosci Bioeng*, 112(1), 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.02.014>
- Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11), 931-937. <https://doi.org/10.1038/nrm2245>
- Klionsky, D. J. (2007). The Importance of Diversity. *Autophagy*, 3(2), 83-84. <https://doi.org/10.4161/auto.3709>
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., . . . Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*, 17(1), 1-382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., . . . Veenhuis, M. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell*, 5(4), 539-545. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00296-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00296-X)
- Klionsky, D. J., Cuervo, A. M., Dunn, J., William A., Levine, B., van der Klei, I. J., & Seglen, P. O. (2007). How shall I eat thee? *Autophagy*, 3(5), 413-416. <https://doi.org/10.4161/auto.4377>
- Klionsky, D. J., & Schulman, B. A. (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature structural & Molecular Biology of the Cell*, 21(4), 336-345. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2787>
- Knorr, R. L., Lipowsky, R., & Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*, 11(11), 2134-2137. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091552>
- Kohda, T. A., Tanaka, K., Konomi, M., Sato, M., Osumi, M., & Yamamoto, M. (2007). Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes to Cells*, 12(2), 155-170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01041.x>
- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), 10363-10368. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806727115>
- Kraft, C., Kijanska, M., Kalie, E., Siergiejuk, E., Lee, S. S., Semplicio, G., . . . Hansmann, I. (2012). Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO Journal*, 31(18), 3691-3703. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.225>
- Krebs, H. A., & Johnson, W. A. (1980). The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS letters*, 117 Suppl, K1-10. <https://doi.org/10.4159/harvard.9780674366701.c143>
- Kremling, A., Geiselmann, J., Ropers, D., & de Jong, H. (2015). Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models. *Trends in Microbiology*, 23(2), 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.11.002>
- Krick, R., Henke, S., Tolstrup, J., & Thumm, M. (2008). Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy*, 4(7), 896-910. <https://doi.org/10.4161/auto.6801>
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2002). Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18619-18625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111889200>
- Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y., & Yamamoto, M. (2000). A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast ste11(+) gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Molecular biology of the cell*, 11(9), 3205-3217. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3205>
- Kunze, M., Kragler, F., Binder, M., Hartig, A., & Gurvitz, A. (2002). Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *European journal of biochemistry*, 269(3), 915-922. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02727.x>
- Kunze, M., Pracharoenwattana, I., Smith, S. M., & Hartig, A. (2006). A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1763(12), 1441-1452. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.009>

- Lang, B. F., & Wolf, K. (1984). The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 2. Localization of genes by interspecific hybridization in strain *ade7-50h-* and cloning of the genome in small fragments. *Molecular Genetics & Genomics*, 196(3), 465-472. <https://doi.org/10.1007/bf00436194>
- Lang, M. J., Martinez-Marquez, J. Y., Prosser, D. C., Ganser, L. R., Buelto, D., Wendland, B., & Duncan, M. C. (2014). Glucose starvation inhibits autophagy via vacuolar hydrolysis and induces plasma membrane internalization by down-regulating recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 16736-16747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525782>
- Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredschneider, M., & Thumm, M. (2000). Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9. *Journal of bacteriology*, 182(8), 2125-2133. <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2125-2133.2000>
- Larsson, C., Pählman, I. L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., & Gustafsson, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(4), 347-357. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980315\)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980315)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9)
- Lawrence, C. L., Maekawa, H., Worthington, J. L., Reiter, W., Wilkinson, C. R., & Jones, N. (2007). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5160-5170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608526200>
- Lee, Y., Kim, B., Jang, H.-S., & Huh, W.-K. (2023). Atg1-dependent phosphorylation of Vps34 is required for dynamic regulation of the phagophore assembly site and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2182478>
- Lee, Y. J., Jang, J. W., Kim, K. J., & Maeng, P. J. (2011). TCA cycle-independent acetate metabolism via the glyoxylate cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(2), 153-166. <https://doi.org/10.1002/yea.1828>
- Legon, L., & Rallis, C. (2021). Genome-wide screens in yeast models towards understanding chronological lifespan regulation. *Briefings in Functional Genomics*, 21(1), 4-12. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elab011>
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), 99-111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>
- Leupold, U. (1949). *Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei Schizosaccharomyces Pombe*. Luno. <https://books.google.es/books?id=dM3DoQEACAAJ>
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6(4), 463-477. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00099-1)
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Lewin, A. S., Hines, V., & Small, G. M. (1990). Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal. *Molecular and Cellular Biology*, 10(4), 1399-1405. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.4.1399-1405.1990>
- Li, L., Miles, S., Melville, Z., Prasad, A., Bradley, G., & Breeden, L. L. (2013). Key events during the transition from rapid growth to quiescence in budding yeast require posttranscriptional regulators. *Molecular biology of the cell*, 24(23), 3697-3709. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-05-0241>
- Li, R., Kato, H., Taguchi, Y., Deng, X., Minagawa, E., Nakata, T., & Umeda, M. (2022). Glucose starvation-caused oxidative stress induces inflammation and autophagy in human gingival fibroblasts. *Antioxidants*, 11(10), 1907. <https://doi.org/10.3390/antiox11101907>
- Licheva, M., Raman, B., Kraft, C., & Reggiori, F. (2022). Phosphoregulation of the autophagy machinery by kinases and phosphatases. *Autophagy*, 18(1), 104-123. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1909407>
- Lillie, S. H., & Pringle, J. R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of bacteriology*, 143(3), 1384-1394. <https://doi.org/10.1128/jb.143.3.1384-1394.1980>
- Lin, P. W., Chu, M. L., & Liu, H. S. (2021). Autophagy and metabolism. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 37(1), 12-19. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12299>
- Liu, J., Chang, F., Li, F., Fu, H., Wang, J., Zhang, S., . . . Yin, D. (2015). Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(3), 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.042>

- Liu, J., Jia, Y., Li, J., & Chu, Z. (2015). Transcriptional profiling analysis of individual kinase-deletion strains of fission yeast in response to nitrogen starvation. *Molecular Genetics & Genomics*, 290(3), 1067-1083. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0966-6>
- Liu, L., Tang, Y., Zhou, Z., Huang, Y., Zhang, R., Lyu, H., . . . Tang, J. (2023). Membrane Curvature: The Inseparable Companion of Autophagy. *Cells*, 12(8), 1132. <https://doi.org/10.3390/cells12081132>
- Liu, Q., Ma, Y., Zhou, X., & Furuyashiki, T. (2015). Constitutive Tor2 activity promotes retention of the amino acid transporter Agp3 at trans-Golgi/endosomes in fission yeast. *PLoS One*, 10(10), e0139045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139045>
- Liu, X., Mao, K., Yu, A. Y. H., Omairi-Nasser, A., Austin, J., 2nd, Glick, B. S., . . . Klionsky, D. J. (2016). The Atg17-Atg31-Atg29 Complex Coordinates with Atg11 to Recruit the Vam7 SNARE and Mediate Autophagosome-Vacuole Fusion. *Current Biology*, 26(2), 150-160. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.054>
- Liu, X. M., Sun, L. L., Hu, W., Ding, Y. H., Dong, M. Q., & Du, L. L. (2015). ESCRTs Cooperate with a Selective Autophagy Receptor to Mediate Vacuolar Targeting of Soluble Cargos. *Mol Cell*, 59(6), 1035-1042. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.034>
- Liu, Y., & Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 22(3), 367-376. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.143>
- 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 Res*, 47(D1), D821-d827. <https://doi.org/10.1093/nar/gky961>
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., & Avruch, J. (2005). Rheb Binds and Regulates the mTOR Kinase. *Current Biology*, 15(8), 702-713. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.053>
- López-Avilés, S., Grande, M., González, M., Helgesen, A. L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., . . . Aligue, R. (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell*, 17(1), 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.043>
- Lopez-Girona, A., Tanaka, K., Chen, X. B., Baber, B. A., McGowan, C. H., & Russell, P. (2001). Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20), 11289-11294. <https://doi.org/10.1073/pnas.191557598>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2018). Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436-446. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 441-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Luttik, M. A. H., Overkamp, K. M., Kötter, P., De Vries, S., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24529-24534. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24529>
- Ma, Y., Kato, T., & Furuyashiki, T. (2016). Genetic interactions among AMPK catalytic subunit Ssp2 and glycogen synthase kinases Gsk3 and Gsk31 in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 62(3), E70. <https://doi.org/10.24546/81009625>
- Mach, K. E., Furge, K. A., & Albright, C. F. (2000). Loss of Rhb1, a Rheb-related GTPase in fission yeast, causes growth arrest with a terminal phenotype similar to that caused by nitrogen starvation. *Genetics*, 155(2), 611-622. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.611>
- Machado, I. F., Teodoro, J. S., Castela, A. C., Palmeira, C. M., & Rolo, A. P. (2021). Mitohormesis. In *Mitochondrial Physiology and Vegetal Molecules* (pp. 729-746). Elsevier.
- MacNeill, S. A., & Fantes, P. A. (1997). Genetic and physiological analysis of DNA replication in fission yeast. *Methods Enzymol*, 283, 440-459.
- Madrid, M., Gómez-Gil, E., & Cansado, J. (2021). Negative control of cytokinesis by stress-activated MAPK signaling. *Current genetics*, 67, 715-721. <https://doi.org/10.1007/s00294-021-01155-6>
- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., . . . Cansado, J. (2004). A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41594-41602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405509200>

- Maeda, S., Yamamoto, H., Kinch, L. N., Garza, C. M., Takahashi, S., Otomo, C., . . . Otomo, T. (2020). Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A. *Nature structural & Molecular Biology of the Cell*, 27(12), 1194-1201. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00520-2>
- Maeda, T., Mochizuki, N., & Yamamoto, M. (1990). Adenylyl cyclase is dispensable for vegetative cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(20), 7814-7818. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.781>
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., & Yamamoto, M. (1994). Cloning of the pka1 gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9632-9637. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36928-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36928-4)
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., & Fuhrmann, G. F. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research*, 2(4), 539-550. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00121.x>
- Malcher, M., Schladebeck, S., & Mosch, H. U. (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 187(3), 717-730. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.125708>
- Malecki, M., & Bähler, J. (2016). Identifying genes required for respiratory growth of fission yeast. *Wellcome Open Res*, 1, 12. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.9992.1>
- Malecki, M., Bitton, D. A., Rodriguez-Lopez, M., Rallis, C., Calavia, N. G., Smith, G. C., & Bahler, J. (2016). Functional and regulatory profiling of energy metabolism in fission yeast. *Genome Biology*, 17(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1101-2>
- Malecki, M., Kamrad, S., Ralser, M., & Bähler, J. (2020). Mitochondrial respiration is required to provide amino acids during fermentative proliferation of fission yeast. *EMBO reports*, 21(11), e50845. <https://doi.org/10.15252/embr.202050845>
- Malina, C., Yu, R., Bjorkeroth, J., Kerkhoven, E. J., & Nielsen, J. (2021). Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2112836118>
- Manjithaya, R., Jain, S., Farre, J. C., & Subramani, S. (2010). A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 303-310. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909154>
- Manolescu, A. R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., & Cheeseman, C. (2007). Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology (Bethesda)*, 22, 234-240. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2007>
- Mao, K., Chew, L. H., Inoue-Aono, Y., Cheong, H., Nair, U., Popelka, H., . . . Klionsky, D. J. (2013). Atg29 phosphorylation regulates coordination of the Atg17-Atg31-Atg29 complex with the Atg11 scaffold during autophagy initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31), E2875-E2884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300064110>
- Mao, K., Wang, K., Zhao, M., Xu, T., & Klionsky, D. J. (2011). Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 193(4), 755-767. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102092>
- Marat, A. L., & Haucke, V. (2016). Phosphatidylinositol 3-phosphates—at the interface between cell signalling and membrane traffic. *EMBO Journal*, 35(6), 561-579. <https://doi.org/10.15252/emboj.201593564>
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, G., & Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO Journal*, 12(5), 1997-2003. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05849.x>
- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology*, 190(6), 1005-1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.200912089>
- Marquina, M., Lambea, E., Carmona, M., Sánchez-Marinás, M., López-Aviles, S., Ayte, J., . . . Aligue, R. (2022). A new negative feedback mechanism for MAPK pathway inactivation through Srk1 MAPKAP kinase. *cientific Reports*, 12(1), 19501. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23970-8>
- Martín, R., & Lopez-Aviles, S. (2018). Express yourself: how PP2A-B55Pab1 helps TORC1 talk to TORC2. *Current genetics*, 64(1), 43-51. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0721-8>
- Martín, R., Portantier, M., Chica, N., Nyquist-Andersen, M., Mata, J., & Lopez-Aviles, S. (2017). A PP2A-B55-mediated crosstalk between TORC1 and TORC2 regulates the differentiation response in fission yeast. *Current Biology*, 27(2), 175-188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.037>

- Martinez, O., & Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research*, 1404(1-2), 101-112. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00050-0)
- Maruyama, T., Alam, J. M., Fukuda, T., Kageyama, S., Kirisako, H., Ishii, Y., . . . Noda, N. N. (2021). Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(7), 583-593. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00614-5>
- Maruyama, T., Hayashi, K., Matsui, K., Maekawa, Y., Shimasaki, T., Ohtsuka, H., . . . Aiba, H. (2022). Characterization of hexose transporter genes in the views of the chronological life span and glucose uptake in fission yeast. *J Gen Appl Microbiol*. <https://doi.org/10.2323/jgam.2022.05.006>
- Maruyama, T., Hayashi, K., Matsui, K., Maekawa, Y., Shimasaki, T., Ohtsuka, H., . . . Aiba, H. (2023). Characterization of hexose transporter genes in the views of the chronological life span and glucose uptake in fission yeast. *J Gen Appl Microbiol*, 68(6), 270-277. <https://doi.org/10.2323/jgam.2022.05.006>
- Maruyama, T., & Noda, N. N. (2021). Delineating the lipidated Atg8 structure for unveiling its hidden activity in autophagy. *Autophagy*, 17(10), 3271-3272. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1961075>
- Masuda, F., Ishii, M., Mori, A., Uehara, L., Yanagida, M., Takeda, K., & Saitoh, S. (2016). Glucose restriction induces transient G2 cell cycle arrest extending cellular chronological lifespan. *Sci Rep*, 6, 19629. <https://doi.org/10.1038/srep19629>
- Mata, J., & Bahler, J. (2006). Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15517-15522. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603403103>
- Matoba, K., Kotani, T., Tsutsumi, A., Tsuji, T., Mori, T., Noshiro, D., . . . Noda, N. N. (2020). Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nature structural & Molecular Biology of the Cell*, 27(12), 1185-1193. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00518-w>
- Matoba, K., & Noda, N. N. (2020). Secret of Atg9: lipid scramblase activity drives de novo autophagosome biogenesis. *Cell Death & Differentiation*., 27(12), 3386-3388. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00663-1>
- Matsuhara, H., & Yamamoto, A. (2016). Autophagy is required for efficient meiosis progression and proper meiotic chromosome segregation in fission yeast. *Genes to Cells*, 21(1), 65-87. <https://doi.org/10.1111/gtc.12320>
- Matsumoto, S., Bandyopadhyay, A., Kwiatkowski, D. J., Maitra, U., & Matsumoto, T. (2002). Role of the Tsc1-Tsc2 complex in signaling and transport across the cell membrane in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 161(3), 1053-1063. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.3.1053>
- Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *EMBO Journal*, 22(12), 3073-3083. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg298>
- Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F., & Yamamoto, M. (2007). Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Journal of Molecular Biology*, 27(8), 3154-3164. <https://doi.org/10.1128/MCB.01039-06>
- Matsuo, Y., & Kawamukai, M. (2017). cAMP-dependent protein kinase involves calcium tolerance through the regulation of Prz1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*., 81(2), 231-241. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1246171>
- Matsuo, Y., McInnis, B., & Marcus, S. (2008). Regulation of the subcellular localization of cyclic AMP-dependent protein kinase in response to physiological stresses and sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 7(9), 1450-1459. <https://doi.org/10.1128/ec.00168-08>
- Matsuzawa, T., Fujita, Y., Tohda, H., & Takegawa, K. (2012). Snf1-like protein kinase Ssp2 regulates glucose derepression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 11(2), 159-167. <https://doi.org/10.1128/ec.05268-11>
- Matsuzawa, T., Hara, F., Tanaka, N., Tohda, H., & Takegawa, K. (2013). Ght2⁺ is required for UDP-galactose synthesis from extracellular galactose by *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 4957-4964. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4637-4>
- Matsuzawa, T., Hara, F., Tohda, H., Uemura, H., & Takegawa, K. (2012). Promotion of glycerol utilization using ethanol and 1-propanol in *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(2), 441-449. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3971-x>

- Matsuzawa, T., Ohashi, T., Hosomi, A., Tanaka, N., Tohda, H., & Takegawa, K. (2010). The *gld1+* gene encoding glycerol dehydrogenase is required for glycerol metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 715-727. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2586-3>
- May, A. I., Prescott, M., & Ohsumi, Y. (2020). Autophagy facilitates adaptation of budding yeast to respiratory growth by recycling serine for one-carbon metabolism. *Nature communications*, 11(1), 5052. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18805-x>
- Mayer, A., & Wickner, W. (1997). Docking of yeast vacuoles is catalyzed by the Ras-like GTPase Ypt7p after symmetric priming by Sec18p (NSF). *Journal of Cell Biology*, 136(2), 307-317. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.2.307>
- McInnis, B., Mitchell, J., & Marcus, S. (2010). Phosphorylation of the protein kinase A catalytic subunit is induced by cyclic AMP deficiency and physiological stresses in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(4), 665-669. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.139>
- Medina, M. (2020). Metabolic Reprogramming is a Hallmark of Metabolism Itself. *Bioessays*, 42(10), e2000058. <https://doi.org/10.1002/bies.202000058>
- Mehta, S., Velmurugan, S., & Lobo, Z. (1998). Repression of enzymes of the pentose phosphate pathway by glucose in fission yeast. *FEBS letters*, 440(3), 430-433. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01420-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01420-3)
- Meijer, A. J., & Codogno, P. (2007). Macroautophagy: protector in the diabetes drama? *Autophagy*, 3(5), 522-525. <https://doi.org/10.4161/auto.4449>
- Memisoglu, G., Eapen, V. V., Yang, Y., Klionsky, D. J., & Haber, J. E. (2019). PP2C phosphatases promote autophagy by dephosphorylation of the Atg1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1613-1620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817078116>
- Mi, H., Muruganujan, A., & Thomas, P. D. (2013). PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D377-386. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1118>
- Miao, H., Liu, Q., Jiang, G., Zhang, W., Liu, K., Gao, X., . . . Sakamoto, N. (2020). AMPK α Subunit Ssp2 and Glycogen Synthase Kinases Gsk3/Gsk31 are involved in regulation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) activity in fission yeast. *PLoS One*, 15(2), e0228845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228845>
- Mijaljica, D., Prescott, M., Klionsky, D. J., & Devenish, R. J. (2007). Autophagy and vacuole homeostasis: a case for self-degradation? *Autophagy*, 3(5), 417-421. <https://doi.org/10.4161/auto.4441>
- Mikawa, T., Kanoh, J., & Ishikawa, F. (2010). Fission yeast Vps1 and Atg8 contribute to oxidative stress resistance. *Genes to Cells*, 15(3), 229-242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01376.x>
- Miles, S., Bradley, G. T., & Breeden, L. L. (2021). The budding yeast transition to quiescence. *Yeast*, 38(1), 30-38. <https://doi.org/10.1002/yea.3546>
- Miles, S., Li, L., Davison, J., & Breeden, L. L. (2013). Xbp1 directs global repression of budding yeast transcription during the transition to quiescence and is important for the longevity and reversibility of the quiescent state. *PLoS genetics*, 9(10), e1003854. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003854>
- Miles, S., Li, L. H., Melville, Z., & Breeden, L. L. (2019). Ssd1 and the cell wall integrity pathway promote entry, maintenance, and recovery from quiescence in budding yeast. *Molecular biology of the cell*, 30(17), 2205-2217. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-04-0190>
- Millar, J. B., Buck, V., & Wilkinson, M. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & Development*, 9(17), 2117-2130. <https://doi.org/10.1101/gad.9.17.2117>
- Miller-Fleming, L., Antas, P., Pais, T. F., Smalley, J. L., Giorgini, F., & Outeiro, T. F. (2014). Yeast DJ-1 superfamily members are required for diauxic-shift reprogramming and cell survival in stationary phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19), 7012-7017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319221111>
- Minard, K. I., & McAlister-Henn, L. (2001). Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(6), 832-843. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00666-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00666-9)
- Mitchison, J. M. (1970). Chapter 7 Physiological and Cytological Methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Cell Biology*, 4, 131-165. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61752-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61752-5)
- Mitchison, J. M., & Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science*, 75(1), 357-376. <https://doi.org/10.1242/jcs.75.1.357>

- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861-2873. <https://doi.org/10.1242/jcs.75.1.357>
- Mizushima, N. (2020). The ATG conjugation systems in autophagy. *Current opinion in cell biology*, 63, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.001>
- Mochizuki, N., & Yamamoto, M. (1992). Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Molecular and General Genetics*, 233, 17-24. <https://doi.org/10.1007/BF00587556>
- Mohammad, K., Baratang Junio, J. A., Tafakori, T., Orfanos, E., & Titorenko, V. I. (2020). Mechanisms that link chronological aging to cellular quiescence in budding yeast. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4717. <https://doi.org/10.3390/ijms21134717>
- Mollapour, M., & Piper, P. W. (2007). Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18), 6446-6456. <https://doi.org/10.1128/MCB.02205-06>
- Moreno-Loshuertos, R., & Enríquez, J. A. (2016). Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.018>
- Moreno, S., Klar, A., & Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 194, pp. 795-823). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94059-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94059-L)
- Morgunova, G. V., Shilovsky, G. A., & Khokhlov, A. N. (2021). Effect of caloric restriction on aging: Fixing the problems of nutrient sensing in postmitotic cells? *Biochemistry*, 86, 1352-1367. <https://doi.org/10.1134/S0006297921100151>
- Morigasaki, S., & Shiozaki, K. (2013). Phosphorelay-dependent and-independent regulation of MAPKKK by the Mcs4 response regulator in fission yeast. *Communicative & integrative biology.*, 6(5), e25020. <https://doi.org/10.4161/cib.25020>
- Morozumi, Y., & Shiozaki, K. (2021). Conserved and Divergent Mechanisms That Control TORC1 in Yeasts and Mammals. *Genes*, 12(1), 88. <https://doi.org/10.3390/genes12010088>
- Mortimore, G. E., Hutson, N. J., & Surmacz, C. A. (1983). Quantitative correlation between proteolysis and macro-and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(8), 2179-2183. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2179>
- Mortimore, G. E., Lardeux, B. R., & Adams, C. E. (1988). Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *Journal of Biological Chemistry*, 263(5), 2506-2512.
- Moruno, F., Pérez-Jiménez, E., & Knecht, E. (2012). Regulation of Autophagy by Glucose in Mammalian Cells., 1(3), 372-395. <https://doi.org/10.3390/cells1030372>
- Mracek, T., Drahotka, Z., & Houstek, J. (2013). The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.*, 1827(3), 401-410. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.014>
- Mueckler, M., & Makepeace, C. (2006). Transmembrane segment 12 of the Glut1 glucose transporter is an outer helix and is not directly involved in the transport mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36993-36998. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608158200>
- Mukaiyama, H., Kajiwara, S., Hosomi, A., Giga-Hama, Y., Tanaka, N., Nakamura, T., & Takegawa, K. (2009). Autophagy-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutants undergo partial sporulation during nitrogen starvation. *Microbiology*, 155(Pt 12), 3816-3826. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034389-0>
- Mukaiyama, H., Nakase, M., Nakamura, T., Kakinuma, Y., & Takegawa, K. (2010). Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS letters*, 584(7), 1327-1334. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.037>
- Mulukutla, B. C., Yongky, A., Le, T., Mashek, D. G., & Hu, W.-S. (2016). Regulation of glucose metabolism—a perspective from cell bioprocessing. *Trends in biotechnology*, 34(8), 638-651. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.012>
- Murai, T., Nakase, Y., Fukuda, K., Chikashige, Y., Tsutsumi, C., Hiraoka, Y., & Matsumoto, T. (2009). Distinctive responses to nitrogen starvation in the dominant active mutants of the fission yeast Rheb GTPase. *Genetics*, 183(2), 517-527. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.105379>
- Murakami, C. J., Burtner, C. R., Kennedy, B. K., & Kaerberlein, M. (2008). A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences.*, 63(2), 113-121. <https://doi.org/10.1093/gerona/63.2.113>

- Nakamichi, N., Yamada, H., Aoyama, K., Ohmiya, R., Aiba, H., & Mizuno, T. (2002). His-to-Asp phosphorelay circuitry for regulation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(12), 2663-2672. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2663>
- Nakashima, A., Cheng, S.-B., Kusabiraki, T., Motomura, K., Aoki, A., Ushijima, A., . . . Yoshino, O. (2019). Endoplasmic reticulum stress disrupts lysosomal homeostasis and induces blockade of autophagic flux in human trophoblasts. *Scientific reports*, 9(1), 11466. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47607-5>
- Nakashima, A., Hasegawa, T., Mori, S., Ueno, M., Tanaka, S., Ushimaru, T., . . . Uritani, M. (2006). A starvation-specific serine protease gene, *isp6+*, is involved in both autophagy and sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet*, 49(6), 403-413. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0067-0>
- Nakashima, A., Kamada, S., Tamanoi, F., & Kikkawa, U. (2014). Fission yeast arrestin-related trafficking adaptor, Arn1/Any1, is ubiquitinated by Pub1 E3 ligase and regulates endocytosis of Cat1 amino acid transporter. *Biology open*, 3(6), 542-552. <https://doi.org/10.1242/bio.20148367>
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(7), 458-467. <https://doi.org/10.1242/jcs.060319>
- Nanji, T., Liu, X., Chew, L. H., Li, F. K., Biswas, M., Yu, Z. Q., . . . Yip, C. K. (2017). Conserved and unique features of the fission yeast core Atg1 complex. *Autophagy*, 13(12), 2018-2027. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1382782>
- Navarro-Aviño, J. P., Prasad, R., Miralles, V. J., Benito, R. M., & Serrano, R. (1999). A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. *Yeast*, 15(10A), 829-842. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199907\)15:10A<829::AID-YEA423>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199907)15:10A<829::AID-YEA423>3.0.CO;2-9)
- Neely, L. A., & Hoffman, C. S. (2000). Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17), 6426-6434. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6426-6434.2000>
- Niederberger, C., & Schweingruber, M. E. (1999). A *Schizosaccharomyces pombe* gene, *ksg1*, that shows structural homology to the human phosphoinositide-dependent protein kinase PDK1, is essential for growth, mating and sporulation. *Molecular & general genetics*, 261(1), 177-183. <https://doi.org/10.1007/s004380050955>
- Nielsen, J. (2003). It Is All about MetabolicFluxes. *Journal of bacteriology*, 185(24), 7031-7035. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7031-7035.2003>
- Noda, N. N. (2021). Atg2 and Atg9: Intermembrane and interleaflet lipid transporters driving autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Biology of Lipids*, 1866(8), 158956. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158956>
- Noda, N. N. (2023). Chapter 19 - Roles of phase separation and condensates in autophagy. In V. N. Uversky (Ed.), *Droplets of Life* (pp. 531-543). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823967-4.00021-X>
- Noda, N. N., & Fujioka, Y. (2015). Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(16), 3083-3096. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1917-z>
- Noda, T. (2017). Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules*, 7(3), 52. <https://doi.org/10.3390/biom7030052>
- Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *Journal of Cell Biology*, 148(3), 465-480. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.465>
- Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 3963-3966. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3963>
- Ntsapi, C., & Loos, B. (2016). Caloric restriction and the precision-control of autophagy: A strategy for delaying neurodegenerative disease progression. *Experimental gerontology*, 83, 97-111. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.07.014>
- O' Farrell, F., Rusten, T. E., & Stenmark, H. (2013). Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *FEBS Journal*, 280(24), 6322-6337.
- Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., & Ohsumi, Y. (2008). The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23972-23980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803180200>

- Oda, A., Takemata, N., Hirata, Y., Miyoshi, T., Suzuki, Y., Sugano, S., & Ohta, K. (2015). Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation. *Genes to Cells*, 20(5), 392-407. <https://doi.org/10.1111/gtc.12229>
- Ohashi, Y., Soler, N., García Ortegón, M., Zhang, L., Kirsten, M. L., Perisic, O., . . . Williams, R. L. (2016). Characterization of Atg38 and NRBF2, a fifth subunit of the autophagic Vps34/PIK3C3 complex. *Autophagy*, 12(11), 2129-2144. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1226736>
- Ohtsuka, H., Imada, K., Shimasaki, T., & Aiba, H. (2022). Sporulation: A response to starvation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *MicrobiologyOpen*, 11(3), e1303. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1303>
- Orii, M., Tsuji, T., Ogasawara, Y., & Fujimoto, T. (2021). Transmembrane phospholipid translocation mediated by Atg9 is involved in autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, 220(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.202009194>
- Osawa, T., Ishii, Y., & Noda, N. N. (2020). Human ATG2B possesses a lipid transfer activity which is accelerated by negatively charged lipids and WIPI4. *Genes to Cells*, 25(1), 65-70. <https://doi.org/10.1111/gtc.12733>
- Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., . . . Noda, N. N. (2019). Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nature structural & Molecular Biology of the Cell*, 26(4), 281-288. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0203-4>
- Otsubo, Y., Nakashima, A., Yamamoto, M., & Yamashita, A. (2017). TORC1-Dependent Phosphorylation Targets in Fission Yeast. *Biomolecules*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/biom7030050>
- Otsubo, Y., & Yamamoto, M. (2008). TOR signaling in fission yeast. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4), 277-283. <https://doi.org/10.1080/10409230802254911>
- Otsubo, Y., & Yamamoto, M. (2012). Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *Journal of cell science*, 125(12), 2789-2793. <https://doi.org/10.1242/jcs.094771>
- Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kotter, P., Luttk, M. A., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2002). Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2814-2821. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2814-2821.2002>
- Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kötter, P., Van Tuijl, A., De Vries, S., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2000). In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2823-2830. <https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2823-2830.2000>
- Özcan, S., & Johnston, M. (1999). Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 554-569. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.554-569.1999>
- Palabiyik, B., Ghods, F. J., & Uzuner, S. K. (2016). Role of glucose repression in the oxidative stress response of *Schizosaccharomyces pombe*: analysis of transcript levels of fbp1, hxx2, sod1 and ctt1 genes in sty1, atf1 and pap1 knock-out mutants. *Turkish Journal of Biology*, 40(4), 815-825. <https://doi.org/10.3906/biy-1501-33>
- Pan, Z. Q., & Du, L. L. (2021). Atg11-mediated activation of Atg1 kinase in fission yeast. *Autophagy*, 17(2), 584-585. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1846303>
- Pan, Z. Q., Shao, G. C., Liu, X. M., Chen, Q., Dong, M. Q., & Du, L. L. (2020). Atg1 kinase in fission yeast is activated by Atg11-mediated dimerization and cis-autophosphorylation. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.58073>
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., & Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *J Biotechnol*, 127(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.008>
- Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C. A., Maiolica, A., . . . Kraft, C. (2014). Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell*, 53(3), 471-483. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.011>
- Patra, K. C., & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences*, 39(8), 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.005>
- Paul, A., Wilson, S., Belham, C. M., Robinson, C. J. M., Scott, P. H., Gould, G. W., & Plevin, R. (1997). Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cellular signalling*, 9(6), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(97\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(97)00042-9)
- Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T., & Ruis, H. (1993). The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Current genetics*, 24(1-2), 21-25. <https://doi.org/10.1007/BF00324660>

- Peekhaus, N., & Conway, T. (1998). What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180(14), 3495-3502. <https://doi.org/10.1128/jb.180.14.3495-3502.1998>
- Pérez, P., & Cansado, J. (2010). Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci*, 11(8), 680-692. <https://doi.org/10.2174/138920310794557718>
- Petersen, J., & Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nature cell biology*, 9(11), 1263-1272. <https://doi.org/10.1038/ncb1646>
- Petrescu-Dănilă, E., Voicu, M., Stănescu, R., Stoica, B., & Rusu, M. (2009). Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a producer and secretor of heterologous proteins. *Romanian Biotechnological Letters*, 14, 4201-4210.
- Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci*, 1, 17. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>
- Pfeiffer, T., Schuster, S., & Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292(5516), 504-507. <https://doi.org/10.1126/science.1058079>
- Pluskal, T., Hayashi, T., Saitoh, S., Fujisawa, A., & Yanagida, M. (2011). Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast. *FEBS Journal*, 278(8), 1299-1315. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08050.x>
- Pollard, T. D., & Wu, J.-Q. (2010). Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), 149-155. <https://doi.org/10.1038/nrm2834>
- Prick, T., Thumm, M., Haussinger, D., & Vom Dahl, S. (2006). Deletion of HOG1 leads to Osmosensitivity in starvation-induced, but not rapamycin-dependent Atg8 degradation and proteolysis: further evidence for different regulatory mechanisms in yeast autophagy. *Autophagy*, 2(3), 241-243. <https://doi.org/10.4161/auto.2743>
- Prick, T., Thumm, M., Kohrer, K., Haussinger, D., & Vom Dahl, S. (2006). In yeast, loss of Hog1 leads to osmosensitivity of autophagy. *Biochemical Journal*, 394(Pt 1), 153-161. <https://doi.org/10.1042/BJ20051243>
- Prieto-Ruiz, F., Vicente-Soler, J., Franco, A., Gomez-Gil, E., Sanchez-Marin, M., Vazquez-Marin, B., . . . Cansado, J. (2020). RNA-Binding Protein Rnc1 Regulates Cell Length at Division and Acute Stress Response in Fission Yeast through Negative Feedback Modulation of the Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *mBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02815-19>
- Rabinowitz, J. D., & White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science*, 330(6009), 1344-1348. <https://doi.org/10.1126/science.1193497>
- Ragusa, M. J., Stanley, R. E., & Hurley, J. H. (2012). Architecture of the Atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis. *Cell*, 151(7), 1501-1512. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.028>
- Rahman, M. S., & Islam, M. R. (2019). Role of Intermittent Fasting, Calorie Restriction and Autophagy in Healthy Aging: A Review of Literature. *Bangladesh Journal of Neuroscience*, 35(1), 39-45. <https://doi.org/10.3329/bjn.v35i1.57624>
- Rallis, C., Codlin, S., & Bahler, J. (2013). TORC1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression, and cell proliferation of fission yeast. *Aging Cell*, 12(4), 563-573. <https://doi.org/10.1111/accel.12080>
- Rallis, C., Townsend, S., & Bähler, J. (2017). Genetic interactions and functional analyses of the fission yeast *gsk3* and *amk2* single and double mutants defective in TORC1-dependent processes. *Scientific reports*, 7(1), 44257. <https://doi.org/10.1038/srep44257>
- Rambold, A. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle*, 10(23), 4032-4038. <https://doi.org/10.4161/cc.10.23.18384>
- Ramírez-Peinado, S., León-Annicchiarico, C. L., Galindo-Moreno, J., Iurlaro, R., Caro-Maldonado, A., Prehn, J. H. M., . . . Muñoz-Pinedo, C. (2013). Glucose-starved cells do not engage in prosurvival autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30387-30398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490581>
- Rao, Y., Perna, M. G., Hofmann, B., Beier, V., & Wollert, T. (2016). The Atg1-kinase complex tethers Atg9-vesicles to initiate autophagy. *Nature communications*, 7, 10338. <https://doi.org/10.1038/ncomms10338>
- Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E., & Klionsky, D. J. (2004). The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental cell*, 6(1), 79-90. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00402-7)

- Reidick, C., Boutouja, F., & Platta, H. W. (2017). The class III phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 398(5-6), 677-685. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0288>
- Reidick, C., El Magraoui, F., Meyer, H. E., Stenmark, H., & Platta, H. W. (2014). Regulation of the tumor-suppressor function of the class III phosphatidylinositol 3-kinase complex by ubiquitin and SUMO. *Cancers*, 7(1), 1-29. <https://doi.org/10.3390/cancers7010001>
- Rhind, N., Chen, Z., Yassour, M., Thompson, D. A., Haas, B. J., Habib, N., . . . Nusbaum, C. (2011). Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science*, 332(6032), 930-936. <https://doi.org/10.1126/science.1203357>
- Rigoulet, M., Aguilaniu, H., Averet, N., Bunoust, O., Camougrand, N., Grandier-Vazeille, X., . . . Gustafsson, L. (2004). Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256-257(1-2), 73-81. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009888.79484.fd>
- Ristow, M., & Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental gerontology*, 45(6), 410-418. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.014>
- Rodríguez-López, M., Gonzalez, S., Hillson, O., Tunnacliffe, E., Codlin, S., Tallada, V. A., . . . Rallis, C. (2020). The GATA transcription factor Gaf1 represses tRNAs, inhibits growth, and extends chronological lifespan downstream of fission yeast TORC1. *Cell Reports*, 30(10), 3240-3249. e3244. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.058>
- Rogov, V. V., Nezis, I. P., Tsapras, P., Zhang, H., Dagdas, Y., Noda, N. N., . . . Johansen, T. (2023). Atg8 family proteins, LIR/AIM motifs and other interaction modes. *Autophagy Reports*, 2(1), 2188523. <https://doi.org/10.1080/27694127.2023.2188523>
- Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C., & Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO Journal*, 31(22), 4304-4317. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.278>
- Ronnow, B., & Kielland-Brandt, M. C. (1993). GUT2, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9(10), 1121-1130. <https://doi.org/10.1002/yea.320091013>
- Roux, A. E., Leroux, A., Alaamery, M. A., Hoffman, C. S., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Rokeach, L. A. (2009). Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS genetics*, 5(3), e1000408. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000408>
- Roux, A. E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Rokeach, L. A. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell*, 5(4), 345-357. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00225.x>
- Rubinstein, A. D., & Kimchi, A. (2012). Life in the balance—a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Journal of cell science*, 125(22), 5259-5268. <https://doi.org/10.1242/jcs.115865>
- Russell, R. C., Yuan, H.-X., & Guan, K.-L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell research*, 24(1), 42-57. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.166>
- Ryter, S. W., Cloonan, S. M., & Choi, A. M. (2013). Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Molecules and Cells*, 36(1), 7-16. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0140-8>
- Saitoh, S., Mori, A., Uehara, L., Masuda, F., Soejima, S., & Yanagida, M. (2015). Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Molecular Biology of the Cell*, 26(2), 373-386. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1503>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 292(33), 13635-13644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.794339>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Sampaio-Marques, B., Burhans, W. C., & Ludovico, P. (2019). Yeast at the forefront of research on ageing and age-related diseases. *Yeasts in Biotechnology and Human Health: Physiological Genomic Approaches*, 217-242. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13035-0_9
- Sampaio-Marques, B., Felgueiras, C., Silva, A., Rodrigues, M., Tenreiro, S., Franssens, V., . . . Ludovico, P. (2012). SNCA (α -synuclein)-induced toxicity in yeast cells is dependent on Sir2-mediated mitophagy. *Autophagy*, 8(10), 1494-1509. <https://doi.org/10.4161/auto.21275>

- Sánchez-Mir, L., Fraile, R., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2020). Phosphorylation of the transcription factor Atf1 at multiple sites by the MAP kinase Sty1 controls homologous recombination and transcription. *Journal of Molecular Biology*, 432(19), 5430-5446. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.004>
- Sánchez-Mir, L., Salat-Canela, C., Paulo, E., Carmona, M., Ayté, J., Oliva, B., & Hidalgo, E. (2018). Phospho-mimicking Atf1 mutants bypass the transcription activating function of the MAP kinase Sty1 of fission yeast. *Current genetics*, 64, 97-102. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0730-7>
- Sanchez-Wandelmer, J., Kriegenburg, F., Rohringer, S., Schuschnig, M., Gomez-Sanchez, R., Zens, B., . . . Reggiori, F. (2017). Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation. *Nature communications*, 8(1), 295. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00302-3>
- Sanso, M., Gogol, M., Ayte, J., Seidel, C., & Hidalgo, E. (2008). Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryotic Cell*, 7(5), 826-835. <https://doi.org/10.1128/EC.00465-07>
- Santo, P. D., Blanchard, B., & Hoffman, C. S. (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* pyp1 protein tyrosine phosphatase negatively regulates nutrient monitoring pathways. *Journal of cell science*, 109 (Pt 7)(0 7), 1919-1925. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.7.1919>
- Sato, M., Dhut, S., & Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 22(7), 583-591. <https://doi.org/10.1002/yea.1233>
- Sato, M., & Mueckler, M. (1999). A conserved amino acid motif (R-X-G-R-R) in the Glut1 glucose transporter is an important determinant of membrane topology. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24721-24725. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24721>
- Sato, T. K., Darsow, T., & Emr, S. D. (1998). Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), 5308-5319. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.9.5308>
- Schaeffer, H. J., & Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2435-2444. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2435>
- Schink, K. O., Tan, K.-W., & Stenmark, H. (2016). Phosphoinositides in control of membrane dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, 32, 143-171. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125349>
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D. E., & Hall, M. N. (2004). Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 338-351. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.338-351.2004>
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis [Article]. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schonbrun, M., Laor, D., López-Maury, L., Bähler, J., Kupiec, M., & Weisman, R. (2009). TOR complex 2 controls gene silencing, telomere length maintenance, and survival under DNA-damaging conditions. *Molecular and cellular biology*
- Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D., & Emr, S. D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS 34 gene essential for protein sorting. *Science*, 260(5104), 88-91. <https://doi.org/10.1126/science.8385367>
- Schuller, H. J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 43(3), 139-160. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0381-8>
- Schutt, K. L., & Moseley, J. B. (2017). Transient activation of fission yeast AMPK is required for cell proliferation during osmotic stress. *Molecular biology of the cell*, 28(13), 1804-1814. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-04-0235>
- Schütter, M., Giavalisco, P., Brodesser, S., & Graef, M. (2020). Local fatty acid channeling into phospholipid synthesis drives phagophore expansion during autophagy. *Cell*, 180(1), 135-149. e114. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.005>
- Seatter, M. J., De la Rue, S. A., Porter, L. M., & Gould, G. W. (1998). QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site. *Biochemistry*, 37(5), 1322-1326. <https://doi.org/10.1021/bi972322u>
- Seike, T., & Niki, H. (2022). Pheromone Response and Mating Behavior in Fission Yeast. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(4), e00130-00122. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00130-22>
- Sekito, T., Kawamata, T., Ichikawa, R., Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2009). Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes to Cells*, 14(5), 525-538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01299.x>

- Selig, M., Xavier, K. B., Santos, H., & Schönheit, P. (1997). Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Archives of Microbiology*, 167, 217-232. <https://doi.org/10.1007/BF03356097>
- Senmatsu, S., Asada, R., Abe, T., Hoffman, C. S., Ohta, K., & Hirota, K. (2019). lncRNA transcriptional initiation induces chromatin remodeling within a limited range in the fission yeast *fbp1* promoter. *Scientific reports*, 9(1), 299. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36049-0>
- Şeylan, C., & Tarhan, Ç. (2023). Metformin extends the chronological lifespan of fission yeast by altering energy metabolism and stress resistance capacity. *FEMS Yeast Research*, 23. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad018>
- Shen, K., Pender, C. L., Bar-Ziv, R., Zhang, H., Wickham, K., Willey, E., . . . Dillin, A. (2022). Mitochondria as Cellular and Organismal Signaling Hubs. *Annual review of cell and developmental biology*, 38, 179-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120420-015303>
- Shen, Z. J., Postnikoff, S., & Tyler, J. K. (2019). Is Gcn4-induced autophagy the ultimate downstream mechanism by which hormesis extends yeast replicative lifespan? *Current genetics*, 65(3), 717-720. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00936-4>
- Sheng, R., & Qin, Z.-H. (2019). History and current status of autophagy research. In *Autophagy: Biology & Diseases: Basic Science* (Vol. 1206, pp. 3-37). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_1
- Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., Buck, V., Morgan, B. A., Makino, K., & Millar, J. B. (1997). The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes & Development*, 11(8), 1008-1022. <https://doi.org/10.1101/gad.11.8.1008>
- Shimasaki, T., Okamoto, K., Ohtsuka, H., & Aiba, H. (2020). Sulfur depletion induces autophagy through Ecl1 family genes in fission yeast. *Genes to Cells*, 25(12), 825-830. <https://doi.org/10.1111/gtc.12815>
- Shiozaki, K., & Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature*, 378(6558), 739-743. <https://doi.org/10.1038/378739a0>
- 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*, 10(18), 2276-2288. <https://doi.org/10.1101/gad.10.18.2276>
- Sideri, T., Rallis, C., Bitton, D. A., Lages, B. M., Suo, F., Rodríguez-López, M., . . . Bähler, J. (2015). Parallel profiling of fission yeast deletion mutants for proliferation and for lifespan during long-term quiescence. *G3: Genes, Genomes, Genetics.*, 5(1), 145-155. <https://doi.org/10.1534/g3.114.014415>
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biology*, 1(2), REVIEWS1011. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-2-reviews1011>
- Smets, B., Ghillebert, R., De Sniijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., & Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 56, 1-32. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0287-1>
- Smith, E. M., Finn, S. G., Tee, A. R., Browne, G. J., & Proud, C. G. (2005). The Tuberos Sclerosis Protein TSC2 Is Not Required for the Regulation of the Mammalian Target of Rapamycin by Amino Acids and Certain Cellular Stresses *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18717-18727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414499200>
- Soto, T., Beltrán, F. F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J. B. A., Vicente-Soler, J., . . . Gacto, M. (2002). Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European journal of biochemistry*, 269(20), 5056-5065. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03214.x>
- Soto, T., Fernandez, J., Cansado, J., Vicente-Soler, J., & Gacto, M. (1997). Protein kinase Sck1 is involved in trehalase activation by glucose and nitrogen source in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*, 143 (Pt 7), 2457-2463. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2457>
- Stack, J. H., DeWald, D. B., Takegawa, K., & Emr, S. D. (1995). Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *Journal of Cell Biology*, 129(2), 321-334. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.2.321>
- Stack, J. H., & Emr, S. D. (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31552-31562. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31729-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31729-0)

- Stack, J. H., Herman, P., Schu, P., & Emr, S. (1993). A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO Journal*, 12(5), 2195-2204. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05867.x>
- Stanton, R. C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64(5), 362-369. <https://doi.org/10.1002/iub.1017>
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), 17049-17054. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903316106>
- Stiefel, J., Wang, L., Kelly, D. A., Janoo, R. T. K., Seitz, J., Whitehall, S. K., & Hoffman, C. S. (2004). Suppressors of an adenylate cyclase deletion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 3(3), 610-619. <https://doi.org/10.1128/ec.3.3.610-619.2004>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., . . . Tauqeer Alam, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927-963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Stjepanovic, G., Davies, C. W., Stanley, R. E., Ragusa, M. J., Kim, D. J., & Hurley, J. H. (2014). Assembly and dynamics of the autophagy-initiating Atg1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12793-12798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407214111>
- Sullivan, L. B., Gui, D. Y., Hosios, A. M., Bush, L. N., Freinkman, E., & Vander Heiden, M. G. (2015). Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*, 162(3), 552-563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017>
- Sun, L., Zhang, H., & Gao, P. (2022). Metabolic reprogramming and epigenetic modifications on the path to cancer. *Protein Cell*, 13(12), 877-919. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00846-7>
- Sun, L. L., Li, M., Suo, F., Liu, X. M., Shen, E. Z., Yang, B., . . . Du, L. L. (2013). Global analysis of fission yeast mating genes reveals new autophagy factors. *PLoS genetics*, 9(8), e1003715. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003715>
- Sun, S., & Gresham, D. (2021). Cellular quiescence in budding yeast. *Yeast*, 38(1), 12-29. <https://doi.org/10.1002/yea.3545>
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., & Neumann, D. (2006). Dissecting the role of AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32207-32216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606357200>
- Suzuki, H., Kaizuka, T., Mizushima, N., & Noda, N. N. (2015). Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation. *Nature structural & Molecular Biology of the Cell*, 22(7), 572-580. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3036>
- Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H., & Ohsumi, Y. (2013). Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 126(Pt 11), 2534-2544. <https://doi.org/10.1242/jcs.122960>
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO Journal*, 20(21), 5971-5981. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5971>
- Swaffer, M. P., Jones, A. W., Flynn, H. R., Snijders, A. P., & Nurse, P. (2016). CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell*, 167(7), 1750-1761.e1716. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.034>
- Takahara, T., & Maeda, T. (2012). TORC1 of fission yeast is rapamycin-sensitive. *Genes to Cells*, 17(8), 698-708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01618.x>
- Takaine, M., Ueno, M., Kitamura, K., Imamura, H., & Yoshida, S. (2019). Reliable imaging of ATP in living budding and fission yeast. *Journal of cell science*, 132(8), jcs230649. <https://doi.org/10.1242/jcs.230649>
- Takeda, K., Starzynski, C., Mori, A., & Yanagida, M. (2015). The critical glucose concentration for respiration-independent proliferation of fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mitochondrion*, 22, 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.04.003>
- Takeda, K., Yoshida, T., Kikuchi, S., Nagao, K., Kokubu, A., Pluskal, T., . . . Yanagida, M. (2010). Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3540-3545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911055107>

- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., & Jones, N. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* *atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO Journal*, *14*(24), 6193-6208. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00310.x>
- Takenaka, K., Tanabe, T., Kawamukai, M., & Matsuo, Y. (2018). Overexpression of the transcription factor Rst2 in *Schizosaccharomyces pombe* indicates growth defect, mitotic defects, and microtubule disorder. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *82*(2), 247-257. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1415126>
- Tamura, N., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Koyama-Honda, I., Yamamoto, H., & Mizushima, N. (2017). Differential requirement for ATG2A domains for localization to autophagic membranes and lipid droplets. *591*(23), 3819-3830. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12901>
- Tanabe, T., Kawamukai, M., & Matsuo, Y. (2020). Glucose limitation and *pka1* deletion rescue aberrant mitotic spindle formation induced by Mal3 overexpression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, biotechnology, biochemistry*, *84*(8), 1667-1680. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1763157>
- Tanabe, T., Yamaga, M., Kawamukai, M., & Matsuo, Y. (2019). Mal3 is a multi-copy suppressor of the sensitivity to microtubule-depolymerizing drugs and chromosome mis-segregation in a fission yeast *pka1* mutant. *PLoS One*, *14*(4), e0214803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214803>
- Tanaka, N., Ohuchi, N., Mukai, Y., Osaka, Y., Ohtani, Y., Tabuchi, M., . . . Takegawa, K. (1998). Isolation and characterization of an invertase and its repressor genes from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *245*(1), 246-253. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8406>
- Tang, Y., & McLeod, M. (2004). In vivo activation of protein kinase A in *Schizosaccharomyces pombe* requires threonine phosphorylation at its activation loop and is dependent on PDK1. *Genetics*, *168*(4), 1843-1853. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.032466>
- Tapia, P. C. (2006). Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Medical hypotheses*, *66*(4), 832-843. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.09.009>
- Tate, J. J., Georis, I., Dubois, E., & Cooper, T. G. (2010). Distinct phosphatase requirements and GATA factor responses to nitrogen catabolite repression and rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(23), 17880-17895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085712>
- Tatebe, H., Morigasaki, S., Murayama, S., Zeng, C. T., & Shiozaki, K. (2010). Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Current Biology*, *20*(22), 1975-1982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.026>
- Tay, Y. D., Leda, M., Spanos, C., Rappsilber, J., Goryachev, A. B., & Sawin, K. E. (2019). Fission Yeast NDR/LATS Kinase Orb6 Regulates Exocytosis via Phosphorylation of the Exocyst Complex. *Cell Reports*, *26*(6), 1654-1667.e1657. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.027>
- Taylor, K. M., Kaplan, C. P., Gao, X., & Baker, A. (1996). Localization and targeting of isocitrate lyases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, *319* (Pt 1)(Pt 1), 255-262. <https://doi.org/10.1042/bj3190255>
- Teixeira, V. (2023). Special Issue: Yeast Cell Signaling Pathways (Volume 1). *International journal of molecular sciences*, *24*(5), 4929. <https://doi.org/10.3390/ijms24054929>
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., & Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, *50*(2), 277-287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90223-6)
- Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., & Jones, N. (1998). Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes & Development*, *12*(10), 1453-1463. <https://doi.org/10.1101/gad.12.10.1453>
- Torres-Quiroz, F., Filteau, M., & Landry, C. R. (2015). Feedback regulation between autophagy and PKA. *Autophagy*, *11*(7), 1181-1183. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1055440>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(9), 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Townley, R., & Shapiro, L. (2007). Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science*, *315*(5819), 1726-1729. <https://doi.org/10.1126/science.1137503>

- Toyoda, Y., & Saitoh, S. (2021). Fission yeast TORC2 signaling pathway ensures cell proliferation under glucose-limited, nitrogen-replete conditions. *Biomolecules*, 11(10), 1465. <https://doi.org/10.3390/biom11101465>
- Tsai, C. S., Aveledo, A. J., McDonald, I. J., & Johnson, B. F. (1987). Diauxic growth of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* in mixtures of D-glucose and ethanol or acetate. *Can J Microbiol*, 33(7), 593-597. <https://doi.org/10.1139/m87-103>
- Tsai, C. S., Ye, H., & Shi, J. (1995). Carbon-13 NMR studies and purification of gluconate pathway enzymes from *Schizosaccharomyces pombe*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316(1), 155-162. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1023>
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 333(1-2), 169-174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-e)
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., . . . Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO Journal*, 27(2), 433-446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
- Umekawa, M., & Klionsky, D. J. (2012). Ksp1 kinase regulates autophagy via the target of rapamycin complex 1 (TORC1) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16300-16310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.344952>
- Urano, J., Comiso, M. J., Guo, L., Aspuria, P. J., Deniskin, R., Tabancay Jr, A. P., . . . Tamanoi, F. (2005). Identification of novel single amino acid changes that result in hyperactivation of the unique GTPase, Rheb, in fission yeast. *Molecular microbiology*, 58(4), 1074-1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04877.x>
- Uttenweiler, A., & Mayer, A. (2008). Microautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagosome and Phagosome*, 245-259. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_16
- Valbuena, N., Guan, K.-L., & Moreno, S. (2012). The Vam6 and Gtr1-Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast. *Journal of cell science*, 125(Pt 8), 1920-1928. <https://doi.org/10.1242/jcs.094219>
- Valbuena, N., & Moreno, S. (2012). AMPK phosphorylation by Ssp1 is required for proper sexual differentiation in fission yeast. *Journal of cell science*, 125(11), 2655-2664. <https://doi.org/10.1242/jcs.098533>
- Valcourt, J. R., Lemons, J. M. S., Haley, E. M., Kojima, M., Demuren, O. O., & Coller, H. A. (2012). Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle*, 11(9), 1680-1696. <https://doi.org/10.4161/cc.19879>
- Valverde, D. P., Yu, S., Boggavarapu, V., Kumar, N., Lees, J. A., Walz, T., . . . Melia, T. J. (2019). ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology*, 218(6), 1787-1798. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811139>
- van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A., & Pronk, J. T. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63(3-4), 343-352. <https://doi.org/10.1007/BF00871229>
- van Gulik, W. M., & Heijnen, J. J. (1995). A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnology & Bioengineering*, 48(6), 681-698. <https://doi.org/10.1002/bit.260480617>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(5), 329-341. <https://doi.org/10.1038/nrm2882>
- Vassiliadis, D., Wong, K. H., Andrianopoulos, A., & Monahan, B. J. (2019). A genome-wide analysis of carbon catabolite repression in *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics*, 20(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5602-8>
- Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., McEwen, J. E., Olsson, L., & Nielsen, J. (2007). Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2402-2407. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607469104>
- Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A., & van Dijken, J. P. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 59(1), 49-63. <https://doi.org/10.1007/bf00582119>
- von Jagow, G., & Klingenberg, M. (1970). Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *European journal of biochemistry*, 12(3), 583-592. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00890.x>

- Vozza, A., Blanco, E., Palmieri, L., & Palmieri, F. (2004). Identification of the mitochondrial GTP/GDP transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20850-20857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313610200>
- Vyas, A., Freitas, A. V., Ralston, Z. A., & Tang, Z. (2021). Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: A unicellular “micromammal” model organism. *Current protocols*, 1(6), e151. <https://doi.org/10.1002/cpz1.151>
- Wahls, W. P., & Smith, G. R. (1994). A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes & Development*, 8(14), 1693-1702. <https://doi.org/10.1101/gad.8.14.1693>
- Wang, L., Klionsky, D. J., & Shen, H.-M. (2023). The emerging mechanisms and functions of microautophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 24(3), 186-203. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00529-z>
- Wang, Y., & Le, W.-D. (2019). Autophagy and ubiquitin-proteasome system. *Autophagy: Biology & Diseases: Basic Science*, 527-550. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_25
- Wang, Y. Y., Zhang, J., Liu, X. M., Li, Y., Sui, J., Dong, M. Q., . . . Du, L. L. (2021). Molecular and structural mechanisms of ZZ domain-mediated cargo selection by Nbr1. *EMBO Journal*, 40(15), e107497. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020107497>
- Wang, Z., Wilson, W. A., Fujino, M. A., & Roach, P. J. (2001). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5742-5752. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.17.5742-5752.2001>
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 21(3), 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>
- Webber, J. L. (2010). Regulation of autophagy by p38alpha MAPK. *Autophagy*, 6(2), 292-293. <https://doi.org/10.4161/auto.6.2.11128>
- Webber, J. L., & Tooze, S. A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO Journal*, 29(1), 27-40. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.321>
- Weinberg, S. E., & Chandel, N. S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*, 11(1), 9-15. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1712>
- Weisman, R. (2016). Target of rapamycin (TOR) regulates growth in response to nutritional signals. *Microbiology spectrum*, 4(5), 4.5. 18. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0006-2016>
- Weisman, R., & Choder, M. (2001). The fission yeast TOR homolog, *tor1+*, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7027-7032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010446200>
- Weisman, R., Roitburg, I., Schonbrun, M., Harari, R., & Kupiec, M. (2007). Opposite effects of *tor1* and *tor2* on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics*, 175(3), 1153-1162. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.064170>
- Wen, X., & Klionsky, D. J. (2016). An overview of macroautophagy in yeast. *Journal of Molecular Biology*, 428(9 Pt A), 1681-1699. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.021>
- Whitaker, R. H., & Cook, J. G. (2021). Stress relief techniques: p38 MAPK determines the balance of cell cycle and apoptosis pathways. *Biomolecules*, 11(10), 1444. <https://doi.org/10.3390/biom11101444>
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J.-C., Toda, T., . . . Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & Development*, 10(18), 2289-2301. <https://doi.org/10.1101/gad.10.18.2289>
- Wood, V., & Bahler, J. (2002). Website review: how to get the best from fission yeast genome data. *Comp Funct Genomics*, 3(3), 282-288. <https://doi.org/10.1002/cfg.175>
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., . . . Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), 871-880. <https://doi.org/10.1038/nature724>
- Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2013). Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells via elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK. *Redox Biology*, 1(1), 552-565. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.10.008>
- Wu, S.-Y., & McLeod, M. (1995). The *sak1+* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes an RFX family DNA-binding protein that positively regulates cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated exit from the mitotic cell cycle. *Molecular Cellular biology*, 15(3), 1479-1488. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.3.1479>
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>

- Xi, H., Barredo, J. C., Merchan, J. R., & Lampidis, T. J. (2013). Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK β leading to autophagy. *Biochemical Pharmacology*, 85(10), 1463-1477. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.037>
- Xie, Z., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2008). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular biology of the cell*, 19(8), 3290-3298. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1292>
- Xu, D. D., & Du, L. L. (2022). Fission Yeast Autophagy Machinery. *Cells*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/cells11071086>
- Yamada, T., Fischle, W., Sugiyama, T., Allis, C. D., & Grewal, S. I. S. (2005). The nucleation and maintenance of heterochromatin by a histone deacetylase in fission yeast. *Mol Cell*, 20(2), 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.002>
- Yamada, T., Mizuno, K. i., Hirota, K., Kon, N., Wahls, W. P., Hartsuiker, E., . . . Ohta, K. (2004). Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *EMBO Journal*, 23(8), 1792-1803. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600138>
- Yamaguchi, M., Noda, N. N., Yamamoto, H., Shima, T., Kumeta, H., Kobashigawa, Y., . . . Inagaki, F. (2012). Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate. *Structure*, 20(7), 1244-1254. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.018>
- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., . . . Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, 198(2), 219-233. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202061>
- Yamamoto, M., Imai, Y., & Watanabe, Y. (1997). *12 Mating and Sporulation in Schizosaccharomyces pombe*. <https://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/4687>
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell*, 17(12), 5094-5104. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0479>
- Yao, W., Li, Y., Chen, Y., Chen, Y., Zhao, P., Zhang, Y., . . . Yi, C. (2023). Mec1 regulates PAS recruitment of Atg13 via direct binding with Atg13 during glucose starvation-induced autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(1), e2215126120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2215126120>
- Yao, W., Li, Y., Wu, L., Wu, C., Zhang, Y., Liu, J., . . . Yi, C. (2020). Atg11 is required for initiation of glucose starvation-induced autophagy. *Autophagy*, 16(12), 2206-2218. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1719724>
- Yao, Z., Delorme-Axford, E., Backues, S. K., & Klionsky, D. J. (2015). Atg41/Icy2 regulates autophagosome formation. *Autophagy*, 11(12), 2288-2299. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1107692>
- Yeh, Y. Y., Shah, K. H., Chou, C. C., Hsiao, H. H., Wrasman, K. M., Stephan, J. S., . . . Herman, P. K. (2011). The identification and analysis of phosphorylation sites on the Atg1 protein kinase. *Autophagy*, 7(7), 716-726. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15155>
- Yeh, Y. Y., Shah, K. H., & Herman, P. K. (2011). An Atg13 protein-mediated self-association of the Atg1 protein kinase is important for the induction of autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 28931-28939. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.250324>
- Yeh, Y. Y., Wrasman, K., & Herman, P. K. (2010). Autophosphorylation within the Atg1 activation loop is required for both kinase activity and the induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 185(3), 871-882. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.116566>
- Yen, W. L., Legakis, J. E., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2007). Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Molecular biology of the cell*, 18(2), 581-593. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-07-0612>
- Yi, C., Tong, J., Lu, P., Wang, Y., Zhang, J., Sun, C., . . . Yu, L. (2017). Formation of a Snf1-Mec1-Atg1 Module on Mitochondria Governs Energy Deprivation-Induced Autophagy by Regulating Mitochondrial Respiration. *Developmental cell*, 41(1), 59-71 e54. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.03.007>
- Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microbial cell*, 3(12), 588. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>
- Yokota, H., Gomi, K., & Shintani, T. (2017). Induction of autophagy by phosphate starvation in an Atg11-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 522-527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.112>

- Yorimitsu, T., Zaman, S., Broach, J. R., & Klionsky, D. J. (2007). Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 18(10), 4180-4189. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0485>
- Yoshida, G. J. (2015). Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34, 111. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0221-y>
- Yu, Z. Q., Liu, X. M., Zhao, D., Xu, D. D., & Du, L. L. (2021). Visual detection of binary, ternary and quaternary protein interactions in fission yeast using a Pil1 co-tethering assay. *Journal of cell science*, 134(19). <https://doi.org/10.1242/jcs.258774>
- Yu, Z. Q., Sun, L. L., Jiang, Z. D., Liu, X. M., Zhao, D., Wang, H. T., . . . Du, L. L. (2020). Atg38-Atg8 interaction in fission yeast establishes a positive feedback loop to promote autophagy. *Autophagy*, 16(11), 2036-2051. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1713644>
- Zampar, G. G., Kümmel, A., Ewald, J., Jol, S., Niebel, B., Picotti, P., . . . Heinemann, M. (2013). Temporal system-level organization of the switch from glycolytic to gluconeogenic operation in yeast. *Molecular Systems Biology*, 9, 651. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.11>
- Zetterberg, A., & Larsson, O. (1985). Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(16), 5365-5369. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.16.5365>
- Zhang, C., & Cuervo, A. M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature medicine*, 14(9), 959-965. <https://doi.org/10.1038/nm.1851>
- Zhang, D., Chen, Y., Xu, X., Xiang, H., Shi, Y., Gao, Y., . . . Pan, J. (2020). Autophagy inhibits the mesenchymal stem cell aging induced by D-galactose through ROS/JNK/p38 signalling., 47(3), 466-477. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13207>
- Zhang, N., & Cao, L. (2017). Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity. *Current genetics*, 63(5), 839-843. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0697-4>
- Zhang, Y., Su, M., Wang, Z., Nielsen, J., & Liu, Z. (2022). Rewiring regulation on respiro-fermentative metabolism relieved Crabtree effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Synthetic & Systems Biotechnology*, 7(4), 1034-1043. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.06.004>
- Zhao, D., Zou, C. X., Liu, X. M., Jiang, Z. D., Yu, Z. Q., Suo, F., . . . Du, L. L. (2020). A UPR-Induced Soluble ER-Phagy Receptor Acts with VAPs to Confer ER Stress Resistance. *Mol Cell*, 79(6), 963-977 e963. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.019>
- Zhao, X., Nedvetsky P., Stanchi, F., Vion, A. C., Popp, O., Zuhlke, K., . . . Gerhardt, H. (2019). Endothelial PKA activity regulates angiogenesis by limiting autophagy through phosphorylation of ATG16L1. *Elife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.46380>
- Zhao, Y. G., Liu, N., Miao, G., Chen, Y., Zhao, H., & Zhang, H. (2018). The ER Contact Proteins VAPA/B Interact with Multiple Autophagy Proteins to Modulate Autophagosome Biogenesis. *Current Biology*, 28(8), 1234-1245 e1234. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.002>
- Zhou, J., Li, G., Zheng, Y., Shen, H. M., Hu, X., Ming, Q. L., . . . Gao, N. (2015). A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNM1L-mediated mitochondrial fission. *Autophagy*, 11(8), 1259-1279. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1056970>
- Zou, C.-X., Ma, Z.-H., Pan, Z.-Q., Xu, D.-D., Suo, F., Jiang, Z.-D., & Du, L.-L. (2023). Fission yeast ortholog of human REEP1-4 is required for autophagosomal enclosure of ER-phagy/nucleophagy cargos. *bioRxiv*, 2023.2004. 2024.538066. <https://doi.org/10.1101/2023.04.24.538066>
- Zuin, A., Carmona, M., Morales-Ivorra, I., Gabrielli, N., Vivancos, A. P., Ayte, J., & Hidalgo, E. (2010). Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO Journal*, 29(5), 981-991. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.407>
- Zuin, A., Castellano-Estève, D., Ayte, J., & Hidalgo, E. (2010). Living on the edge: stress and activation of stress responses promote lifespan extension. *Aging*, 2(4), 231-237. <https://doi.org/10.18632/aging.100133>
- Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I. A., García-Santamarina, S., Hoe, K. L., Kim, D. U., . . . Hidalgo, E. (2008). Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS One*, 3(7), e2842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002842>

