

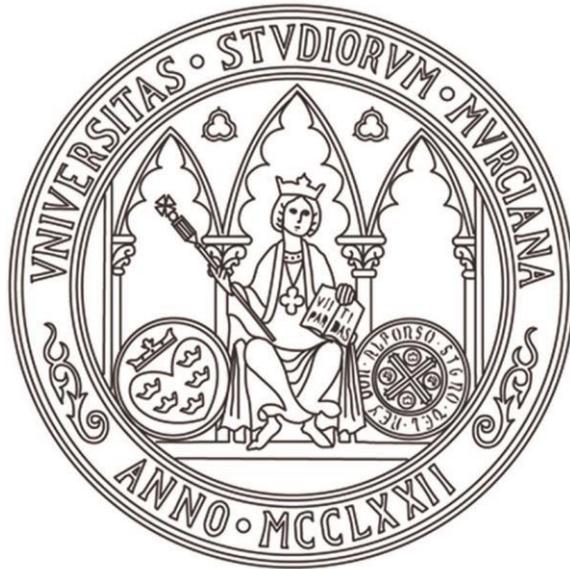


**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Interacción funcional entre la maquinaria que regula el crecimiento polarizado, la citocinesis y las rutas de MAP quinasas de estrés e integridad celular.

**D. Francisco Prieto Ruiz**  
**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Interacción funcional entre la maquinaria que regula el crecimiento polarizado, la citocinesis y las rutas de MAP quininas de estrés e integridad celular.

Autor: D. Francisco Prieto Ruiz

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





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

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

D./Dña. Francisco Prieto Ruiz

doctorando del Programa de Doctorado en

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:

Interacción funcional entre la maquinaria que regula el crecimiento polarizado, la citocinesis, y las rutas de MAP quinasas de estrés e integridad celular.

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.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, 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 28 de septiembre de 2023

Fdo.: Francisco Prieto Ruiz

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: <a href="mailto:dpd@um.es">dpd@um.es</a>
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

Interacción funcional entre la maquinaria que regula el crecimiento polarizado, la citocinesis y la rutas de MAP quinasas de respuesta a estrés e integridad celular.

**Trabajo 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 del graduado Francisco Prieto Ruiz.**

**Murcia, 28 de septiembre de 2023**

Esta memoria ha sido concebida como compendio de las siguientes publicaciones:

- 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* (2020). <https://doi.org/10.1128/mBio.02815-19>.
- Myosin II regulatory light chain phosphorylation and formin availability modulate cytokinesis upon changes in carbohydrate metabolism. *eLife*, 2023. <https://doi.org/10.7554/eLife.83285>.
- Divergence of cytokinesis and dimorphism control by myosin II regulatory light chain in fission yeasts. *iScience*, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107611>.

El trabajo presentado en esta memoria ha sido financiado con las ayudas procedentes de:

-**Título del proyecto:** “Regulación por MAP quinasas del citoesqueleto de actina y la polaridad celular” Referencia: BFU2017-82423-P Entidad financiadora: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España 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 Innovación y Universidades de España Entidades participantes: Universidad de Murcia.

- **Título del proyecto:** “Citocinesis e integridad celular en la célula fúngica y su interés en terapias antifúngicas.” Referencia: PGC2018-098924-B-100 Entidad financiadora: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España Entidades participantes: Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC).

- **Título del proyecto:** “Escalera de la excelencia” Referencia: CLU-2017-03 Entidad financiadora: Junta de Castilla y León Entidades participantes: Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC).

Francisco Prieto Ruiz ha realizado la tesis doctoral financiado por una ayuda para la Formación del Profesorado Universitario (FPU) por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU17/01663).

## LISTADO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	
Abreviatura	Nombre
ABPs	Proteínas de unión a actina o <i>“Actin Binding Proteins”</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPc-PKA	Adenosín monofosfato cíclico- Proteína quinasa A
ARE	Elementos ricos en AU o <i>“AU Rich Elements”</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AKAP	Proteína de anclaje a PKA o <i>“A-Kinase Anchoring Protein”</i>
CAR	Anillo contráctil de actomiosina o <i>“Contractile Actomyosin Ring”</i>
CESR	Respuesta a estrés ambiental central o <i>“Core Environmental Stress Response”</i>
CME	Endocitosis mediada por clatrina o <i>“Clathrin Mediated Endocytosis”</i>
CPT	Camptotecina
DSPs	Fosfatasa de especificidad dual o <i>“Dual Specificity Phosphatase”</i>
DYRK	Quinasa de especificidad dual por fosforilación en tirosina o <i>“Dual-specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase”</i>
ELC	Cadena ligera esencial de miosina o <i>“myosin Essential Light Chain”</i>
ESCRT	Complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte o <i>“Endosomal Sorting Complexes Required for Transport”</i>
GDP	Guanosina 5'difosfato o <i>“Guanosine 5'Diphosphate”</i>
GEF	Factor intercambiador de GTP o <i>“GTP Exchange Factor”</i>
GPCR	Receptor acoplado a Proteína G o <i>“G Protein-Coupled Receptor”</i>
GSH	Glutatión
GTD	Dominio globular del tallo o <i>“Globular Tail Domain”</i>
GTP	Guanosina 5'trifosfato o <i>“Guanosine 5'triphosphate”</i>
KH	Motivo de Homología K o <i>“Homologous K Domain”</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos o <i>“Mitogen Activated Protein Kinase”</i>
MAPKK	MAP quinasa quinasa o <i>“MAP kinase kinase”</i>
MAPKKK	MAP quinasa quinasa quinasa o <i>“MAP kinase kinase kinase”</i>
MAPKP	Fosfatasa de MAP quinasa o <i>“MAP kinase phosphatase”</i>
MTOC	Centro organizador de microtúbulos o <i>“Microtubule Organizing Centre”</i>
NES	Secuencia de exporte nuclear o <i>“Nuclear Export Sequence”</i>
NETO	Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo o <i>“New End Take Off”</i>
NLS	Secuencia de localización nuclear o <i>“Nuclear Localization Signal”</i>
NMII	Miosina tipo II no muscular o <i>“Non-muscle Myosin II”</i>
OETO	Comienzo del crecimiento por el polo antiguo o <i>“Old End Take Off”</i>

<b>PCH</b>	Familia de proteínas homóloga a Cdc15 en <i>S. pombe</i> o " <i>Pombe Cdc15 Homology</i> "
<b>PP2C</b>	Fosfatasa de serina y treonina o " <i>Serine/Threonine Phosphatase</i> "
<b>PTP</b>	Fosfatasa de Tirosina o " <i>Tyrosine Phosphatase</i> "
<b>RBP</b> s	Proteínas de unión a ARN o " <i>RNA Binding Proteins</i> "
<b>RBD</b> s	Dominios de unión a ARN o " <i>RNA Binding Domains</i> "
<b>RGE</b>	Extracto de uva roja o " <i>Red Grape Extract</i> "
<b>RLC</b>	Cadena ligera reguladora de miosina o " <i>myosin Regulatory Light Chain</i> "
<b>RRM</b>	Motivo de reconocimiento de ARN o " <i>RNA Recognition Motif</i> "
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno o " <i>Reactive Oxygen Species</i> "
<b>SCPR</b>	Búsqueda, captura, empuje y liberación o " <i>Search, Capture, Pull, Release</i> "
<b>SIN</b>	Complejo de inicio de la septación o " <i>Septation Initiation Network</i> "
<b>SPB</b>	Cuerpo polar del huso o " <i>Spindle Pole Body</i> "
<b>SPK</b>	<i>Spitzenkörper</i>
<b>STREP</b>	Elemento de respuesta a estrés en <i>S. pombe</i> o " <i>Stress Response Element in S. pombe</i> "

# RESUMEN

La citocinesis, el proceso que permite la separación física de las células una vez ha finalizado la mitosis, consiste en la formación de un anillo contráctil (19) formado por filamentos de actina y miosina tipo II, cuya actividad está finamente regulada por la fosforilación de su cadena ligera reguladora (RLC). En las células eucariotas, las vías de señalización de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), conservadas evolutivamente, desempeñan un papel fundamental durante la respuesta adaptativa a las señales ambientales. El correcto ensamblaje y organización de los filamentos de actina depende en gran medida de la activación y/o inhibición coordinada de muchas proteínas conservadas a través de diferentes cascadas de señalización, incluyendo las MAPKs. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se ha establecido en las últimas décadas como un excelente organismo modelo para estudiar diversos mecanismos vinculados a las vías de señalización dependientes de MAPK y la citocinesis, debido su alto grado de conservación evolutiva con las de organismos superiores. Además, la levadura de fisión dimórfica *Schizosaccharomyces japonicus* se está convirtiendo en un modelo atractivo para explorar la divergencia evolutiva dentro del género *Schizosaccharomyces* ya que, a diferencia de las demás especies de este género, se trata de un organismo dimórfico. *S. japonicus* presenta otras características distintivas, como una respiración defectuosa, un citoesqueleto de actina muy dinámico y una mitosis semiabierta. Así pues, ambas levaduras de fisión se han posicionado como modelos sencillos pero excepcionales para estudios de biología celular evolutiva.

Numerosos trabajos han revelan la importancia de la correcta regulación de la magnitud de la respuesta de las rutas de MAPKs. Tanto es así que no solamente intervienen las fosfatasa de MAP quinasa para reducir la actividad de la MAPK central si no también existen otras proteínas encargadas de modular la expresión tanto de proteínas del módulo como sus reguladores directos. En este sentido las proteínas de unión a ARNm juegan un papel clave estabilizando/desestabilizando los ARNm de diferentes proteínas. Diferentes estudios han descrito que la proteína de unión a ARNm Rnc1 une y estabiliza al ARNm de la MAP fosfatasa Pmp1, que desfosforila específicamente a la MAPK de la ruta de integridad celular (CIP) Pmk1. Además, Rnc1 es fosforilada por Pmk1 en un residuo de treonina en posición 50 (T50) que permite la unión a su ARNm diana. Sin embargo, nuestros resultados indican que Rnc1 es también fosforilada por la MAPK central de la ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK), Sty1, y esta fosforilación impide la unión a los ARNm de la MAPKKK Wak1, la MAPKK Wis1 y las serín-treonín fosfatasa Pyp1 y Pyp2. Por otro lado, hemos observado que la unión de Rnc1 a estos ARNm es mediada por la fosforilación de Sty1 y provoca su desestabilización, lo que sugiere un mecanismo de doble retroalimentación negativa para regular exquisitamente la actividad de la ruta SAPK.

Las miosinas son una superfamilia de proteínas que emplean el ATP como fuente de energía y los filamentos de actina como elemento motor. Consisten en un complejo

de dos cadenas pesadas que terminan en dos cabezas motoras, dos cadenas ligeras esenciales dependientes de calcio y dos cadenas ligeras reguladoras que, mediante su fosforilación, regulan la actividad motora de las cadenas pesadas. En *S. pombe* se ha descrito que Rlc1 es la cadena ligera reguladora tanto de la miosina II esencial Myo2 y la no esencial Myp2. Además, Rlc1 es fosforilado por la p21 quinasa esencial Pak1. Sin embargo, el papel de la fosforilación de Rlc1 como regulador positivo o negativo de la actividad de Myo2/Myp2 no está del todo claro, pues algunos estudios sugieren que su papel es positivo para la actividad de la miosina mientras que otros sugieren que es negativo. En este estudio hemos identificado que Rlc1 es fosforilado por Pak1 y Pak2 en el residuo serina 35 (S35). Dicha fosforilación resulta ser esencial para regular la actividad de la miosina II durante la respiración. Esto se debe a que durante la respiración el apagado de la actividad de la ruta AMP cíclico proteína quinasa A (AMPC-PKA) junto con el incremento en la producción de ROS como consecuencia de la actividad mitocondrial provoca la activación de Sty1 que reduce los niveles de la formina For3 y, por tanto, los cables de actina interfásicos que podrán ser utilizados por la miosina durante la citocinesis. La adición de antioxidantes como el glutatión reducido (20), la introducción de una versión constitutivamente activa de For3 y la ausencia de actividad de Sty1 son capaces de aliviar los fenotipos de pérdida de función del mutante Rlc1(S35A). Además, nuestros resultados sugieren que la fosforilación de Rlc1 en S35 regula fundamentalmente la actividad de Myo2 durante la constricción de CAR en respiración.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la citocinesis influye de manera crítica en el desarrollo filamentoso en levaduras dimórficas. En *S. japonicus* podemos observar en células interfásicas la presencia de nodos de miosina II a diferencia de lo que ocurre en *S. pombe*, donde la miosina no aparece hasta instantes antes de comenzar la mitosis. En esta tesis doctoral hemos observado que la ausencia de Rlc1 produce una clara reducción en la capacidad de *S. japonicus* de miceliar, dando lugar a hifas que acumulan múltiples defectos de separación. Curiosamente, a diferencia de *S. pombe*, Rlc1 en *S. japonicus* no se fosforila, y si introducimos tanto una versión de Rlc1 de *S. pombe* como una versión de *S. japonicus* capaz de fosforilarse las células presentan un fenotipo de pérdida de función. Sin embargo, si introducimos la versión silvestre de *S. japonicus* en *S. pombe* sí es capaz de recuperar el fenotipo de la delección de Rlc1. Este hecho se debe a que, en *S. pombe*, la fosforilación de Rlc1 en S35 permite a la proteína adquirir una conformación abierta lo que permite regular correctamente a Myo2, por el contrario, la versión silvestre de *S. japonicus* ya se encuentra de forma abierta permanentemente. En conjunto, estos resultados sugieren una clara divergencia evolutiva dando lugar a dos mecanismos de regulación de la actividad de la miosina II, uno dependiente y otro independiente de la fosforilación de la RLC.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Morfogénesis y citoesqueleto celular .....</b>	<b>1</b>
1.1. Las levaduras del género <i>Schizosaccharomyces</i> como organismos modelo....	1
1.1.1. Características generales de <i>S. pombe</i> .....	2
1.1.1.1. Ciclo de vida y morfogenético de <i>S. pombe</i> .....	2
1.1.2. Características generales de <i>S. japonicus</i> .....	4
1.2.1.1. Ciclo de vida y morfogenético de <i>S. japonicus</i> .....	5
1.2. El dimorfismo.....	6
1.2.1. Regulación del crecimiento filamentoso .....	7
1.2.2. Relación entre la transición levadura-hifa y la patogénesis.....	8
1.2.3. Dimorfismo en <i>S. pombe</i> .....	9
1.2.4. Dimorfismo en <i>S. japonicus</i> .....	10
1.3. El citoesqueleto .....	12
1.3.1. El citoesqueleto de tubulina.....	12
1.3.1.1. El citoesqueleto de tubulina en <i>S. pombe</i> .....	13
1.3.2 El citoesqueleto de actina .....	15
1.3.2.1 El citoesqueleto de actina de <i>S. pombe</i> .....	16
1.3.2.1.1. Parches de actina.....	17
1.3.2.1.2. Cables de actina.....	18
1.3.2.1.3. Anillo de actomiosina (CAR) .....	18
1.4. Las miosinas.....	18
1.4.1. Conservación evolutiva de las miosinas .....	20
1.4.2. Miosinas en <i>S. pombe</i> .....	21
1.4.2.1 Miosinas tipo I .....	21
1.4.2.2 Miosinas tipo V .....	22
1.4.2.3 Miosinas tipo II .....	23
1.4.2.3.1 Mecanismos de regulación de la actividad de miosinas tipo II.....	25
1.4.2.3.2 La cadena ligera reguladora Rlc1.....	27
1.5. La citocinesis en <i>S. pombe</i> .....	28
1.5.1. Determinación del sitio de división .....	30
1.5.2. Maduración de los precursores del CAR .....	32

1.5.3 Formación del CAR .....	34
1.5.3.1 Modelo SCPR (Búsqueda, Captura, empuje y liberación) .....	34
1.5.3.2 Modelo de cable líder .....	35
1.5.3.2.1 La ruta SIN (Septation Initiation Network) .....	36
1.5.4. Maduración del CAR .....	37
1.5.5. Constricción del CAR .....	38
1.5.6 Síntesis del septo .....	39
1.5.7. Separación celular .....	41
<b>2. Señalización y respuesta frente a estímulos nutricionales .....</b>	<b>42</b>
2.1. La ruta AMPc-PKA .....	43
2.1.1. Organización de la ruta AMPc-PKA .....	43
2.1.1.1. Sensores .....	43
2.1.1.2. La proteína kinasa A .....	43
2.1.1.3 Efectores .....	44
2.1.2 La ruta AMPc-PKA en <i>S. pombe</i> .....	44
2.1.2.1. Sensores .....	44
2.1.2.2. La PKA en <i>S. pombe</i> .....	45
2.1.2.3. Efectores .....	45
2.2. Las rutas de MAPKs .....	46
2.2.1. Sensores .....	46
2.2.2. Módulo de MAPKs .....	47
2.2.3. Reguladores de MAPKs .....	47
2.2.4. Efectores de MAPKs .....	49
2.2.4.1 Las proteínas de unión a ARN .....	49
2.2.4.1.1. Dominios de unión a ARN .....	50
Motivos de reconocimiento de ARN .....	50
Motivo de unión por dedos de Zinc .....	51
Motivos KH de unión a ARN .....	51
2.2.4.1.2. Secuencias de unión a ARN .....	51
Motivos TOP .....	52
Secuencias poli(U) y cola poli(A) .....	52
Elementos ricos en secuencias AU .....	53
2.2.4.1.3. Las RBPs en <i>S. pombe</i> .....	54

2.2.4.1.3.1. La proteína Rnc1.....	54
2.2.5 La ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i> .....	56
2.2.5.1 Sensores.....	56
2.2.5.1.1 Regulador de respuesta Mcs4 .....	56
2.2.5.3. Módulo de MAPKs .....	57
2.2.5.3.1. MAPKKKs Wak1 y Win1 .....	57
2.2.5.3.2. MAPKK Wis1 .....	57
2.2.5.3.3. MAPK Sty1 .....	58
2.2.5.3.4. Efectores de la ruta SAPK .....	58
2.2.5.3.5. Reguladores negativos de la ruta SAPK.....	60
2.2.6. Interacción funcional entre la ruta de MAPK de respuesta a estrés y la ruta AMPC-PKA .....	61
2.3. Control de la citocinesis por estímulos nutricionales.....	61
<b>3. Bibliografía .....</b>	<b>67</b>
<b>4. Justificación y objetivos .....</b>	<b>103</b>
<b>5. Publicaciones .....</b>	<b>105</b>
5.1. 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 .....	105
5.2. Myosin II regulatory light chain phosphorylation and formin availability modulate cytokinesis upon changes in carbohydrate metabolism. ....	136
5.3. Divergence of cytokinesis and dimorphism control by myosin II regulatory light chain in fission yeast.....	200
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>232</b>
6.1. Conclusiones específicas .....	232
6.2. Conclusiones generales.....	233

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

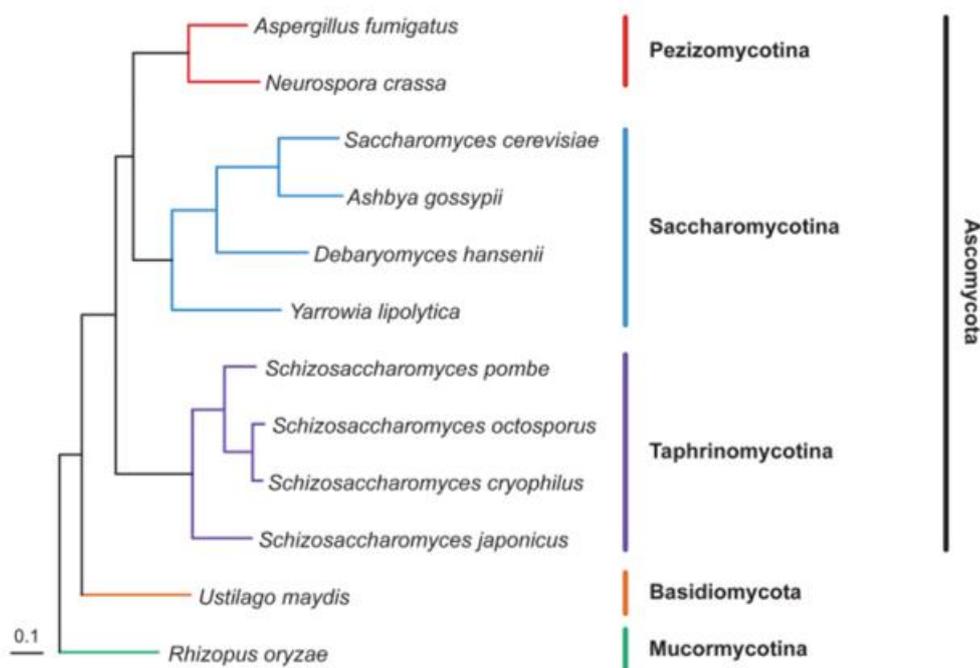
Tabla 1. Principales motivos de reconocimiento de ARN. ....	52
Tabla 2. Principales secuencias de unión a ARN.....	53
Figura 1. Árbol filogenético del género <i>Schizosaccharomyces</i> .....	1
Figura 2. Ciclo de vida y morfofenético de <i>S. pombe</i> .....	3
Figura 3. Proceso de mitosis en levaduras del género <i>Schizosaccharomyces</i> . ....	6
Figura 4. Patrón de desarrollo hifal.....	8
Figura 5. Etapas del desarrollo filamentoso en <i>S. japonicus</i> .....	11
Figura 6. Los microtúbulos como vías de transporte de marcadores de polaridad hacia el polo de crecimiento. ....	14
Figura 7. Citoesqueleto de actina de <i>S. pombe</i> .. ....	17
Figura 8. Multímero que conforma la miosina. ....	20
Figura 9. Principales dominios en las miosinas de <i>S. pombe</i> .. ....	24
Figura 10. Papel de la fosforilación de RLC en metazoos.....	26
Figura 11. Papel de la fosforilación de Rlc1 sobre la actividad de Myo2 en <i>S. pombe</i> . .....	28
Figura 12. La citocinesis en <i>S. pombe</i> .....	30
Figura 13. Posicionamiento del plano de división y dinámica de llegada de los nodos tipo 1 y tipo 2. ....	31
Figura 14. Maduración de los precursores del CAR.....	33
Figura 15. Modelos de ensamblaje del CAR.....	37
Figura 16. Constricción del CAR y síntesis del septo.....	40
Figura 17. La ruta AMPc-PKA en <i>S. pombe</i> . ....	46
Figura 18. Módulo de MAPKs y transducción de la señal. ....	48
Figura 19. Modelo de regulación de Rnc1.....	55
Figura 20. La ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i> . ....	59

# INTRODUCCIÓN

## 1. Morfogénesis y citoesqueleto celular

### 1.1. Las levaduras del género *Schizosaccharomyces* como organismos modelo

El género *Schizosaccharomyces* se engloba dentro del grupo de los ascomicetos al igual que las especies del género *Saccharomyces*. Sin embargo, según el análisis filogenético de los genomas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* (dos especies ampliamente empleadas como organismos modelo de estudio) revela que ambas levaduras se separaron hace aproximadamente 1000 millones de años (21) (19). Su nombre genérico hace referencia, por un lado, a su condición de levadura (*-saccharomyces*), y por otro a su mecanismo de división por fisión (*Schizo*). A este género pertenecen cuatro especies: *S. pombe*, *S. octosporus*, *S. cryophilus* y *S. japonicus*, siendo esta última la primera en separarse evolutivamente (**Figura 1**).



**Figura 1.** Árbol filogenético del género *Schizosaccharomyces*. Adaptado de (3).

Las levaduras de este género presentan un ciclo de vida rápido y generalmente haploide, dividiéndose por fisión binaria, desarrollándose de forma unicelular formando colonias inmóviles. Sin embargo, bajo determinadas condiciones la levadura *S. japonicus* únicamente presenta un crecimiento en forma hifal propiamente dicho (3).

Dentro del género *Schizosaccharomyces* se ha empleado ampliamente a la levadura *S. pombe* como organismo modelo en investigación. Esto es debido a que pese

# INTRODUCCIÓN

a tratarse de un eucariota simple, presenta un alto grado de similitud con las células de organismos eucariotas superiores en procesos fundamentales como el citoesqueleto, la citocinesis, las rutas de señalización entre otros. Junto con estas características, su división por bipartición ha permitido realizar estudios exhaustivos sobre el ciclo celular ya que al tener una morfología muy definida es sencillo identificar en qué fase del mismo se encuentran. Finalmente, al tratarse de un hongo posee una pared celular rígida que aísla a la célula del medio exterior, lo que junto con su no patogenicidad la hace un organismo modelo muy atractivo para la identificación y cribado de fármacos antifúngicos (22). Sin embargo, durante los últimos diez años *S. japonicus* ha surgido como un modelo interesante de estudio ya que se encuentra evolutivamente más alejado de *S. pombe* y *S. cerevisiae* junto con el crecimiento dimórfico y otras características lo hacen un organismo muy prometedor para el estudio de estos procesos siendo nuevamente una levadura no patógena (23).

## 1.1.1. Características generales de *S. pombe*

La levadura *S. pombe* fue aislada por primera vez por Paul Liender en 1893, quien la aisló a partir de cerveza de mijo elaborada en el este de África. De hecho, su epíteto específico “pombe” significa cerveza en Suajili, el idioma local del lugar donde se aisló. La mayoría de las estirpes silvestres y mutantes empleadas en el laboratorio proceden de una estirpe homotálica  $h^{90}$  aislada a partir de mosto por A. Osterwalder en Francia en 1921. Durante los años 40, Urs Leopold obtuvo y caracterizó genéticamente cepas heterotálicas de los tipos sexuales opuestos  $h^+$  y  $h^-$ . Durante los años 1950, Murdoch Mitchison puso de manifiesto su potencial para los estudios del crecimiento celular y, posteriormente, en los años 70 Paul Nurse combinó las técnicas genéticas aprendidas en el grupo de Leopold con éxito para estudiar en profundidad el ciclo celular de esta levadura, produciéndose un incremento exponencial en su uso como organismo modelo de estudio que, entre otros muchos hallazgos, llevó a la secuenciación completa de su genoma en el año 2002 revelando que presenta aproximadamente 14 Mb englobadas en 3 cromosomas (24 2015 2015).

### 1.1.1.1. Ciclo de vida y morfogenético de *S. pombe*

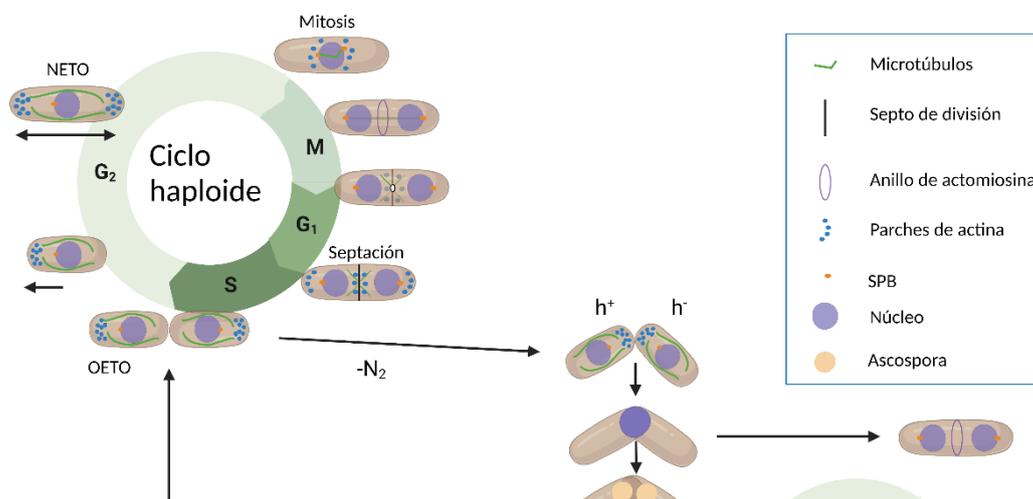
En condiciones de crecimiento no perturbadas, en medio, rico *S. pombe* presenta un ciclo haploide y se divide de forma asexual por mitosis en un ciclo de 2,5-3 horas, presentando una morfología cilíndrica con una longitud de 12-15  $\mu\text{M}$  y un ancho de 3-4  $\mu\text{M}$ . Cuando las células detectan un déficit nutricional, especialmente el de nitrógeno se induce el ciclo sexual entre células de tipo sexual opuesto  $h^-$  y  $h^+$ , aunque también existen cepas homotálicas  $h^{90}$  capaces de conjugarse entre sí.

# INTRODUCCIÓN

En ausencia de fuente de nitrógeno las células quedan arrestadas en fase G1 y aquellas de tipo sexual opuesto se reconocen mediante la liberación de feromonas. Una vez detectada la presencia de las mismas se inicia la maquinaria que desencadena el proceso de conjugación que comienza con la proyección del extremo de una célula hacia la fuente emisora de las feromonas del tipo sexual contrario (“*shmooing*”). Las dos células se fusionan y establecen un cigoto diploide que inicia el proceso de meiosis que finaliza con la formación de un asca con cuatro ascoporas haploides en su interior. Las paredes del asca se autolisan liberando los cuatro productos meióticos al medio manteniéndose viables durante largos periodos de tiempo mientras las condiciones ambientales no sean favorables, sin embargo, cuando éstas lo son dichas ascoporas germinan iniciando un nuevo ciclo meiótico (25, 26).

Alternativamente, el cigoto puede mantenerse viable en un ciclo vegetativo diploide mientras las condiciones del medio sean favorables. Sin embargo, éstos son muy inestables e inician la meiosis cuando las condiciones del medio son desfavorables, originando ascas azigóticas con cuatro esporas haploides.

Como organismo unicelular eucariota, su ciclo mitótico está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (27). La fase G1 o “*Gap 1*” tiene lugar inmediatamente después de la mitosis y perdura hasta la replicación de los cromosomas, y en ella se produce la síntesis del ARN y de proteínas implicadas en la duplicación del ADN. Durante esta fase las células crecen a partir del polo viejo, heredado de la división anterior. En *S. pombe* la duración de la fase G1 es relativamente corta, ya que las células tienen un tamaño suficiente para llevar a cabo la duplicación del ADN (28). El crecimiento monopolar perdura a lo largo de la fase S, donde se da la replicación del material genético que continúa durante la fase G2. Esta fase constituye un periodo muy largo que puede



**Figura 2. Ciclo de vida y morfogenético de *S. pombe*.** Ciclo de vida haploide (Izquierda), ciclo de vida diploide (derecha). La fase G1 del ciclo celular es más corta y en ella se conforma el septo de división. Durante la fase S las células replican su material genético y al final de esta fase se produce la separación de las células hijas, donde los parches de actina localizan en el polo viejo (OETO). La fase G2 es más larga donde los parches localizan también en el polo procedente de la división anterior (NETO) y al final de esta fase se movilizan hacia la zona ecuatorial donde se producirá la división celular. Finalmente, durante la mitosis se formará el anillo de actomiosina (CAR) y se produce la separación de los núcleos. Adaptado de MacNeill & Nurse, 1997 y de (5).

## INTRODUCCIÓN

ocupar hasta el 70% del ciclo celular de la célula en el que se produce el incremento de la masa y volumen celular. Durante esta fase, la célula al alcanzar un tamaño determinado comienza a crecer por el nuevo polo resultado de la división mitótica pasando a crecer bipolarmente, mediante un proceso conocido como NETO (“*New End Take Off*”) (29).

Cuando la célula alcanza un tamaño determinado el crecimiento polar cesa y comienza la fase M o de mitosis, produciéndose la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la segregación de las cromátidas hermanas hacia ambos polos celulares (30). Al inicio de la fase M tiene lugar la citocinesis, proceso en el que se ensambla el anillo contráctil de actomiosina (CAR) en la zona media de la célula. El anillo se cierra progresivamente al final de la fase M iniciando el núcleo una nueva fase G1. Durante la constricción del CAR se forma el septo de división que permitirá la separación física de las nuevas células hijas. Finalmente se produce la disolución del septo permitiendo la separación total de las dos nuevas células al comienzo de la fase S. Antes de producirse la separación completa, las células comienzan a crecer por el polo viejo en un proceso conocido como OETO (“*Old End Take Off*”) (28). La transición entre las diferentes fases del ciclo celular es un proceso finamente regulado en el que participan muchas proteínas sintetizándose y/o activándose de forma periódica (**Figura 2**).

### 1.1.2. Características generales de *S. japonicus*

La levadura *S. japonicus* fue aislada y descrita por primera vez por Yukawa y Maki en 1928 a partir de un producto fermentado de fresas cosechadas en la universidad de Kyushu, Japón. En 1945, Wickerham y Duprat aislaron a partir de un zumo de uva casero que había fermentado a la levadura *Schizosaccharomyces versatilis*, aunque estudios posteriores confirmaron que *S. versatilis* era una variedad de la especie *S. japonicus* originalmente descrita por Yukawa y Maki (31). Los primeros estudios con este microorganismo ya mostraban que compartía similitud con otras levaduras de fisión, sin embargo, poseía también rasgos únicos que la hacían un organismo interesante, como la capacidad de filamentar pese a ser un organismo no patógeno o la particular dinámica de los cromosomas durante la división celular.

A pesar del atractivo de esta levadura al poseer características diferentes con respecto a otras levaduras de su mismo género, pocos grupos de investigación trabajaron con este microorganismo durante los años 80 y 90 debido a la baja disponibilidad de técnicas de manipulación genética y molecular existentes para este modelo, a diferencia de las ya existentes en *S. pombe*. En el año 2011 se completó la secuenciación de su genoma, indicando que *S. japonicus* fue la primera en separarse del resto de levaduras de fisión, hace aproximadamente 221 millones de años (3). Durante la última década se han desarrollado técnicas moleculares y herramientas genéticas para el estudio de *S. japonicus*, facilitando que adquiriera una especial relevancia no solo

## INTRODUCCIÓN

para estudios de conservación evolutiva, si no también en estudios genéticos, fisiológicos y del ciclo celular.

Una de las principales características distintivas de esta levadura es su incapacidad para respirar, creciendo exclusivamente mediante la fermentación en condiciones anaerobias. Por el contrario, *S. pombe* presenta un metabolismo respiro-fermentativo (Crabtree positivo) en función de la disponibilidad de glucosa u otra fuente de carbono alternativa en el medio. De hecho, *S. japonicus* presenta unos niveles de Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) muy bajos, lo que indica una falta de función mitocondrial (32).

### 1.2.1.1. Ciclo de vida y morfogenético de *S. japonicus*

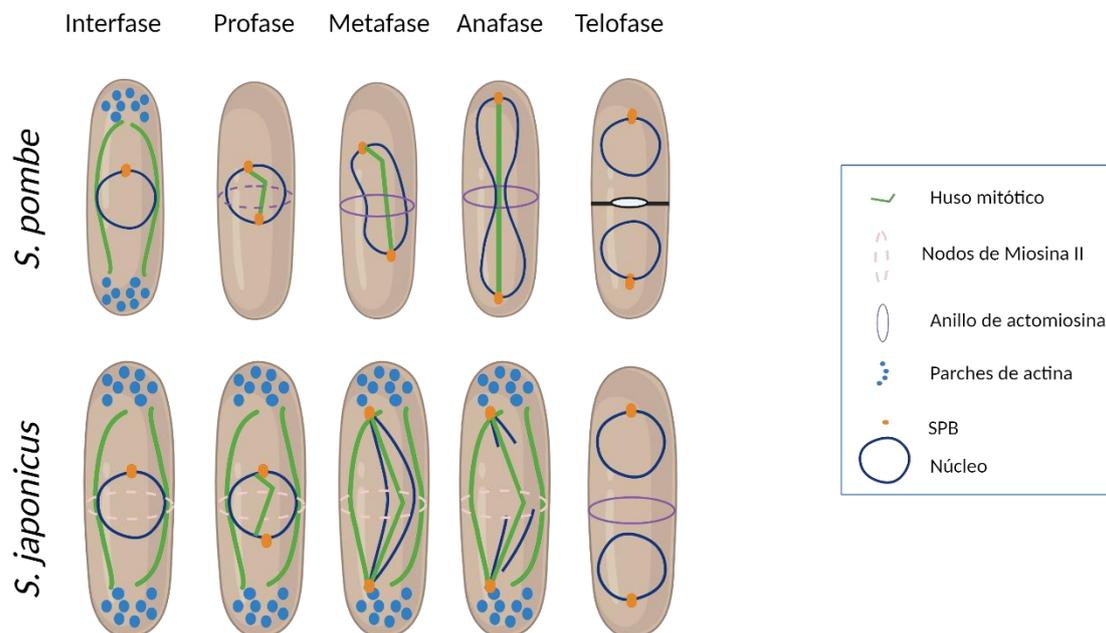
De igual manera que *S. pombe*, cuando las condiciones del medio son favorables, *S. japonicus* crece vegetativamente en medio de forma haploide en un ciclo de aproximadamente unas 2 horas, comparado con las 2,5 horas de *S. pombe*. Las células de *S. japonicus* presentan forma cilíndrica con una longitud entre las 15 y 18  $\mu\text{M}$  y un ancho de 6-7  $\mu\text{M}$ , dividiéndose asexualmente por fisión.

Un abundante número de hongos y levaduras, como *S. pombe*, presentan una mitosis cerrada, donde, a diferencia de organismos eucariotas superiores, la segregación cromosómica tiene lugar en el interior de la envuelta nuclear permaneciendo intacta durante todo el ciclo celular (33). Curiosamente, *S. japonicus* ejecuta una mitosis semi-abierta, en el que la división celular va acompañada de una rotura parcial de la envuelta nuclear al inicio de la anafase y vuelve a formarse en torno al material genético segregado una vez finalizada la mitosis. Dicha rotura parcial facilita el flujo de moléculas entre el citoplasma y el nucleoplasma, mientras que el resto de la envuelta sin disgregarse permite la protección de los cromosomas del citoplasma (34, 35). Esta diferencia podría explicarse por la necesidad de mantener la escala núcleo-citoplasma, lo que permite que el núcleo mantenga un volumen constante, de tal manera que en una mitosis cerrada las células necesitan expandir la envuelta nuclear para generar dos nuevos núcleos. Sin embargo, en *S. japonicus* no se produce la expansión de la misma debiendo romperse para producir la segregación cromosómica (35).

De igual manera que en *S. pombe*, cuando las condiciones del medio son desfavorables, en ausencia de una fuente de nitrógeno, *S. japonicus* inicia el ciclo sexual con una cinética más rápida que *S. pombe*, donde dos células de tipo sexual opuesto h<sup>+</sup> y h<sup>-</sup> conjugan fusionando sus núcleos. En este caso particular se produce un asca con ocho ascosporas como resultado de una mitosis sucesiva de los productos meióticos (23). Finalmente, la pared del asca se autolisa liberando las esporas, que pueden permanecer viables hasta que las condiciones del medio sean nuevamente favorables germinando e iniciando un nuevo ciclo mitótico.

# INTRODUCCIÓN

En cuanto a su ciclo morfológico, mientras que en *S. pombe* se forma el CAR de manera prematura al comienzo de la fase M y se mantiene hasta el final de la anafase con el fin de evitar aneuploidías, lo que conlleva una coordinación muy precisa entre los elementos que regulan la mitosis y la citocinesis asegurando una segregación cromosómica exitosa. Sin embargo, en la mayoría de las células eucariotas superiores y en levaduras como *S. cerevisiae* y *S. japonicus*, el ensamblaje del anillo contráctil se retrasa hasta que los cromosomas no se hayan segregado correctamente (16). Además, a diferencia de *S. pombe* y *S. cerevisiae*, *S. japonicus* presenta un cambio morfológico pudiéndose desarrollar como hifas en respuesta a cambios ambientales (**Figura 3**).



**Figura 3. Proceso de mitosis en levaduras del género *Schizosaccharomyces*.** En *S. pombe* (superior) ocurre una mitosis cerrada por el cual la envuelta nuclear no se disgrega durante la segregación cromosómica. Por el contrario, en *S. japonicus* (inferior) presenta una mitosis semi-abierta en donde se produce la rotura parcial de la envuelta nuclear al inicio de la anafase. Además, en *S. pombe* se forma el anillo prematuramente al inicio de la mitosis mientras que en *S. japonicus* el CAR no se forma hasta que no se han separado completamente los cromosomas. Sin embargo, en *S. japonicus* ya en células interfásicas encontramos nodos de Miosina II a diferencia de *S. pombe*. Adaptado de (16).

## 1.2. El dimorfismo

La inmensa mayoría de especies de hongos crecen vegetativamente bien en forma levaduriforme o bien de forma filamentosa. Sin embargo, existen también un número importante de especies que son capaces de crecer de ambas formas en determinadas circunstancias. Dicha transición se orquesta mayormente en respuesta a condiciones ambientales adversas, como la temperatura, disponibilidad de nutrientes o de oxígeno. El pensamiento más probable que podría venir de este tipo de crecimiento es que las levaduras hayan iniciado este proceso de transición como respuesta evolutiva hacia formas de crecimiento más complejas. Sin embargo, diferentes estudios filogenéticos apuntan a que el crecimiento filamentoso es más ancestral que el levaduriforme, donde

# INTRODUCCIÓN

la evolución habría seleccionado en diferentes especies la incapacidad para filantar, dado su crecimiento más rápido y sencillo, presentando un genoma más pequeño y un metabolismo secundario menos desarrollado (36).

## 1.2.1. Regulación del crecimiento filamentoso

Independientemente de si la levadura presenta un crecimiento dimórfico o filamentoso exclusivamente, la unidad básica de dicho crecimiento es la hifa, una estructura cilíndrica que terminan en un ápice redondeado. Contrariamente a lo que sucede con la gemación, la fisión por bipartición o en crecimiento en pseudohifa, que permiten la separación física entre las células hijas, las hifas consisten en largos filamentos tubulares de células con lados paralelos y carentes de elementos que permiten la constricción del septo (37). Las hifas crecen apicalmente, siendo un tipo de crecimiento compartido con los pelos radiculares de vegetales o incluso de las neuronas, siendo, por tanto, esencial el correcto establecimiento del crecimiento polar en estas estructuras requiriendo la síntesis activa de diversos elementos que posteriormente serán transportados hacia el ápice para el crecimiento de la célula (38).

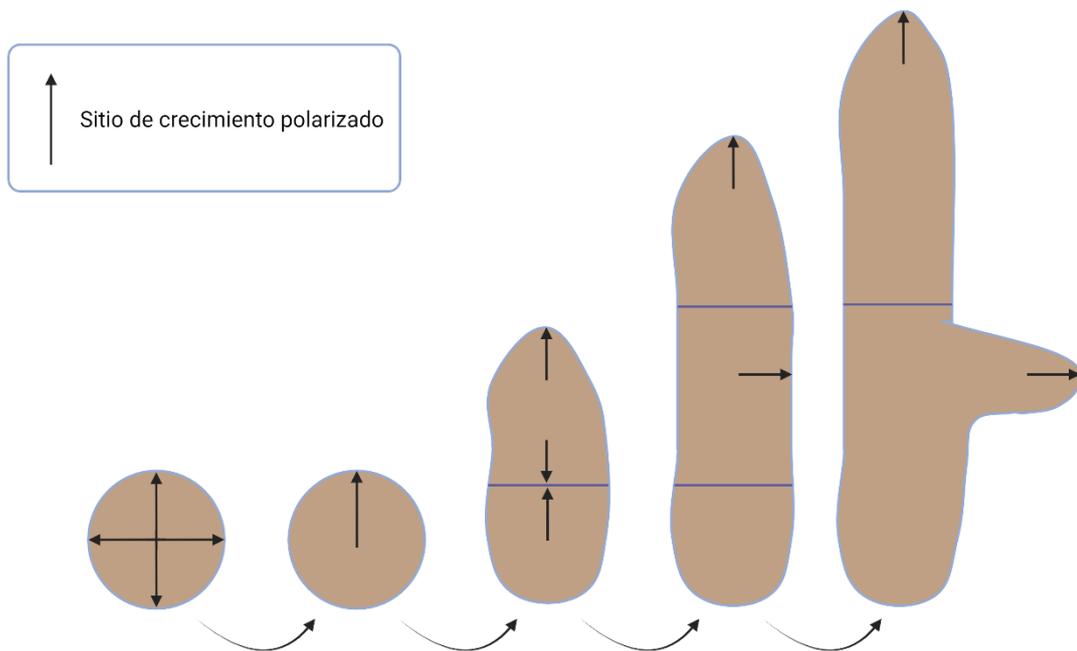
Generalmente, las hifas se suelen desarrollar a partir de la germinación de las esporas o de otras estructuras reproductivas diferentes, o incluso de otras hifas. Sin embargo, en el caso de hongos dimórficos pueden diferenciarse a partir de la forma levaduriforme. Existen dos eventos clave que determinan el desarrollo hifas, el establecimiento de un eje polar y la estabilización del mismo. El establecimiento del eje de polaridad implica la ruptura de la simetría celular, pasando a un crecimiento únicamente polar. Por otro lado, la estabilización de dicho eje es clave para la elongación de las hifas que requiere el transporte de diferentes vesículas que permitan el crecimiento apical de las mismas, limitando la superficie celular y la deposición de pared hacia una localización específica de la célula. En este sentido, el citoesqueleto de actina y microtúbulos juegan un papel esencial en este proceso, en el caso del primero es esencial para el correcto funcionamiento de ambos procesos mientras que el de microtúbulos es fundamental para el mantenimiento de la morfología, dirección y velocidad de desarrollo de la hifa (9, 38).

El tráfico polarizado de vesículas permite la remodelación de la membrana y pared celular, necesario para el rápido crecimiento de las hifas. Dichas vesículas fusionarán con la membrana plasmática en su extremo apical, formando una estructura específica denominada Spitzenkörper (SPK), conformado por ribosomas, actina y microtúbulos. Esta estructura controla la tasa de crecimiento de las hifas y suele emplearse como un indicador del crecimiento hifal propiamente dicho (9, 39).

Las hifas también pueden formar un micelio debido a que son capaces de formar diferentes ejes de polaridad que dará lugar a una serie de ramificaciones que pueden ser laterales o apicales en función de si se establecen en un lateral o en el extremo apical de la hifa como consecuencia de la división de la misma (**Figura 4**). Así, se genera una

## INTRODUCCIÓN

red interconectada de hifas que permiten el crecimiento de la colonia favoreciendo la fusión hifal facilitando la captación e intercambio de nutrientes entre las distintas partes de la colonia (40).



**Figura 4. Patrón de desarrollo hifal.** Originalmente la espora crece de forma isotrópica. Posteriormente, se determina un eje de polaridad dando lugar a una hifa que crece polarizadamente por su extremo apical. Además, también pueden establecerse diferentes ejes de polaridad dando lugar a ramificaciones laterales. Adaptado de (13).

### 1.2.2. Relación entre la transición levadura-hifa y la patogénesis

El dimorfismo se asocia en diversas ocasiones con la patogenicidad de diferentes especies de hongos, siendo esencial el cambio dimórfico para que prospere la infección con el hospedador. Hongos como *Hialoplasma capsulatum* o *Blastomyces dermatitidis* constituyen ejemplos de hongos dimórficos que son patógenos primarios de humanos. En estos casos, el hongo se encuentra en su forma filamentosamente no patógena en el suelo que, tras la inhalación de las esporas, éstas germinan en forma levaduriforme en el hospedador siendo patógenas (41). Es en su forma de levadura cuando el microorganismo es capaz de evadir las células del sistema inmune. Esta transición dimórfica se encuentra regulada por diversas rutas de señalización, como las rutas de señalización por AMP cíclico (AMPC), el sistema de dos componentes y las rutas de señalización mediadas por proteínas kinasas asociadas a mitógenos (MAPKs) (42).

Hongos como *Ustilago maydis*, perteneciente al grupo de los basidiomicetos, se trata de un fitopatógeno que afecta al maíz, el cual es en su forma filamentosamente cuando es

## INTRODUCCIÓN

patógeno para la planta, provocando la enfermedad conocida como el carbón de la espiga. Para que se produzca la transición dimórfica es necesario que conjuguen dos células de tipos sexuales distintos donde tras la activación de rutas de MAPKs y de la ruta AMPc-Proteína kinasa A (AMPc-PAK) regulan el estado de fosforilación del factor transcripcional Prf1, favoreciendo la expresión del nuevo programa morfogénico (43).

En relación a los hongos ascomicetos, *Candida albicans* se trata de un patógeno oportunista de humanos, pudiendo crecer dentro del hospedador tanto en forma levaduriforme como en forma filamentosa, de ahí a su patogenicidad (44). Estímulos como un pH alcalino, la presencia de suero, la limitación de nitrógeno y una temperatura de 37°C son algunos de los múltiples estímulos que desencadenan este cambio. En esta levadura, el factor transcripcional Nrg1 actúa como represor de genes responsables de la filamentación mediante su unión a las secuencias NRE (Nrg1 Response Element) de la región promotora de estos genes (45, 46). Sin embargo, como respuesta a los estímulos mencionados anteriormente provocan la activación de rutas de señalización activadas por la GTPasa Ras1 reducen el nivel de expresión de Nrg1 y regulan positivamente la activación de otros factores transcripcionales que favorecen la expresión de genes que inducen este cambio dimórfico (47).

### 1.2.3. Dimorfismo en *S. pombe*

Pese a ser un hongo no patógeno, de igual manera que *S. cerevisiae*, *S. pombe* puede crecer en forma de pseudohifa en respuesta a determinados estímulos ambientales. Las pseudohifas se definen como cadenas de células elongadas que crecen monopolarmente y carecen de la comunicación citoplásmica típica de las hifas (48). En ambas especies son necesarias altas densidades poblacionales y un medio pobre en fuente de nitrógeno para transicionar e invadir el medio (49).

La transición a formas pseudohifales es mediada por la ruta AMPc-PKA, ya que la falta de diferentes elementos aguas arriba de la ruta como Git3, Cyr1 o Pka1, que se detallarán en el apartado 2.1., son incapaces de formar pseudohifas, aunque ninguna de las rutas de MAPKs de esta levadura están implicadas en la formación de estas estructuras (50). Sin embargo, para que se produzca este cambio es necesario que el citoesqueleto de actina funcione correctamente, siendo los cables interfásicos críticos para la transición (51, 52). Por el contrario, mutantes carentes de elementos implicados en citocinesis y que a su vez presentan defectos en polaridad celular favorecen la invasividad en estos medios, donde, por ejemplo, la falta de la cadena ligera reguladora de la miosina II, Rlc1, presenta una mayor invasividad en el medio comparado con cepas silvestres (53).

## 1.2.4. Dimorfismo en *S. japonicus*

*S. japonicus* es la única levadura de su género que es dimórfica estrictamente, formando sobre la superficie de medios sólidos pseudomicelios o bien penetrando en ellos formando un micelio verdadero. Dicha transición dimórfica se produce en respuesta a diversos estímulos y cambios ambientales siendo un proceso reversible. Todo esto en conjunto con su no patogenicidad la hacen un modelo atractivo de estudio para morfogénesis y polaridad (54-56).

Cuando las células se encuentran en un medio favorable para la transición dimórfica, las células levaduriformes comienzan a crecer monopolarmente, provocando consecuentemente un crecimiento vacuolar que acumulan en el polo que no crece (54). Durante este cambio se pueden diferenciar secuencialmente tres fases. En la primera fase, las levaduras comienzan a desarrollar vacuolas que se distribuyen por el citoplasma de la levadura, en un estado que se conoce como levadura vacuolizada. A continuación, las vacuolas polarizan hacia uno de los extremos en lo que se conoce como formas de transición. Finalmente, las vacuolas se fusionan generando una o pocas vacuolas grandes durante la elongación, dando lugar a la forma hifal (**Figura 5**). Las formas de levadura y levadura vacuolizada crecen bipolarmente y de forma simétrica, sin embargo, durante la transición dimórfica al romperse la polaridad son ya las formas de transición y las hifas las que comienzan a crecer monopolarmente. En las hifas, el crecimiento suele estar relacionado con la vacuola que se acumula en el polo de no crecimiento. A diferencia de otros hongos filamentosos, *S. japonicus* no forma un SPK en el extremo de crecimiento de la hifa lo que sugiere que esta transición no requiere de la reorganización de la maquinaria de polaridad y tráfico celular e independiente del citoesqueleto de microtúbulos (9, 55).

La transición levadura-hifa en *S. japonicus* se puede inducir en respuesta a estrés nutricional, aunque siempre debe tener un soporte de medio sólido. En este caso, el desarrollo filamentoso se produce por la presencia de un gradiente de nutrientes, concretamente de fuente de nitrógeno, permitiendo el crecimiento filamentoso en largos tiempos de incubación (mínimo 5-7 días) (54, 56). También, el crecimiento hifal de esta levadura se produce en medio rico suplementado con extracto de uva roja (RGE) y en presencia de extracto de otros frutos rojos como fresa u otras bayas, aunque no se conoce cuál es el mecanismo de inducción de esta transición dimórfica independiente de estrés nutricional (9). Sin embargo, el incremento en los niveles de glucosa en el medio de cultivo o cambios en la temperatura de crecimiento de 30°C a 18°C inhiben el crecimiento filamentoso, siendo este proceso reversible (54).

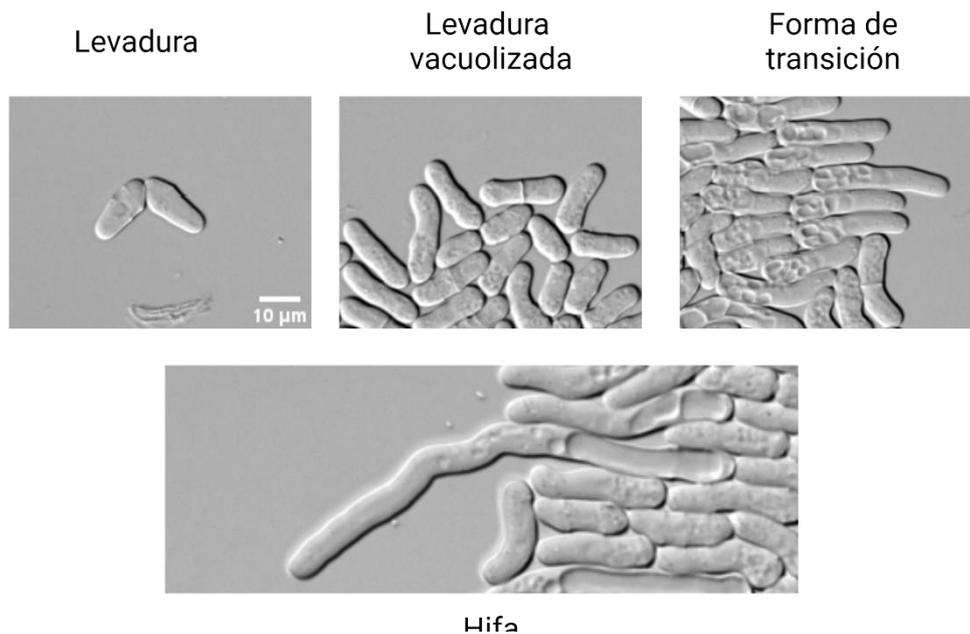


Figura 5. Etapas del desarrollo filamentoso en *S. japonicus*. Adaptado de (9).

También es posible inducir el crecimiento filamentoso en medio líquido tras la adición de camptotecina (CPT) consiguiendo una transición levadura-hifa muy rápida en *S. japonicus*. La CPT es un inhibidor específico de la topoisomerasa I que activa el punto de control de daño en el ADN (“*checkpoint*”) deteniendo a las células en fase G2, aunque la concentración necesaria para inducir el crecimiento filamentoso es significativamente menor que la necesaria para producir el arresto celular (56-59). El desarrollo filamentoso inducido por CPT implica la acción de genes en respuesta al *checkpoint* de daño en el ADN como la kinasa Chk1, regulador de los activadores e inhibidores Wee1 y Cdc25 de la kinasa Cdc2. Sin embargo, Chk1 no es necesario para la inducción de la filamentación en respuesta a estrés nutricional, lo que sugiere la existencia de al menos dos mecanismos responsables del dimorfismo (60). La inducción de la filamentación por CPT es reversible y tras la eliminación de la droga las células comienzan a transicionar a un crecimiento levaduriforme (56, 59).

En *S. japonicus* las rutas de señalización mediadas por MAPKs están implicadas en el desarrollo hifal. Mientras que la ruta de MAPKs de respuesta a estrés (SAPK) regula negativamente la filamentación, pues la ausencia de su MAPK central Sty1 presenta un crecimiento filamentoso de manera constitutiva (61). Por el contrario, la ruta de MAPK de integridad celular (CIP) controla positivamente la transición levadura-hifa de igual manera que sucede con el desarrollo hifal y pseudohifal de hongos como *C. albicans* o *S. cerevisiae* respectivamente (47, 62, 63). Además, la transición dimórfica en esta levadura se ve reprimida por un mecanismo de percepción del quorum (61). Estudios recientes apuntan a que el citoesqueleto de actina resulta ser clave para la correcta transición dimórfica, más concretamente la presencia de cables interfásicos implicados en el tráfico vesicular hacia el polo de crecimiento es crítica para la filamentación (9). Junto con el citoesqueleto de actina, en otros hongos dimórficos la citocinesis juega

también un papel clave en el dimorfismo. Como se ha comentado en el **apartado 1.2.3.**, mutantes defectivos en citocinesis presentan una mayor invasividad en el desarrollo pseudohifal, aunque, curiosamente en *Penicillium marneffe* la ausencia de la miosina II MyoB reprime el desarrollo filamentoso (53, 64).

### 1.3. El citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura tridimensional, dinámica y compleja compuesta por polímeros interconectados y proteínas nucleadoras y reguladoras que se distribuyen por todo el citoplasma. Participan en múltiples procesos como la organización del contenido celular, endocitosis, exocitosis, polaridad celular, tráfico vesicular o la división celular gracias a la formación de estructuras específicas en función de la situación de la célula (65).

El citoesqueleto está presente en todos los dominios de organismos vivos. Sin embargo, sólo los eucariotas presentan actina y tubulina propiamente dichas, mientras que bacterias y arqueas presentan estructuras análogas con funciones diferentes. Los principales tipos de polímeros que constituyen el citoesqueleto son filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Éstos se organizan formando redes con capacidad de organizarse y desorganizarse en respuesta a diferentes condiciones tanto internas como externas. Todo esto es posible gracias a la presencia de proteínas adaptadoras y reguladoras, entre las que se encuentran factores promotores de la nucleación, polimerasas, proteínas caperuza, factores de corte y proteínas de entrecruzamiento (65).

Los microtúbulos constituyen las estructuras más rígidas de los tres polímeros, que consisten en una asociación de protofilamentos ensamblados a partir de filamentos de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, presentando una dinámica de asociación y desasociación compleja. En el caso de procariotas, FtsZ constituye la proteína análoga a los microtúbulos y participa fundamentalmente en citocinesis (66). Los filamentos de actina son estructuras más flexibles, pero a los que se asocian numerosas proteínas, formados por la polimerización de monómeros de actina. Por su parte, en procariotas encontramos como análogos a FtsA o MerB con estructura y función similar a la actina (67). Los filamentos intermedios son los polímeros más flexibles del citoesqueleto encontrándose entrecruzados entre sí o bien asociados a filamentos de actina y microtúbulos. Estas estructuras son exclusivas de metazoos, no habiéndose descrito en otros grupos de organismos (65, 68).

#### 1.3.1 El citoesqueleto de tubulina

## INTRODUCCIÓN

La tubulina es una proteína globular con hasta 6 isoformas diferentes, constituyendo el componente principal de los microtúbulos en organismos eucariotas. Los microtúbulos son polímeros huecos de morfología cilíndrica formados por heterodímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina ensamblados como protofilamentos, donde tras la asociación lateral de unos 13 de ellos constituyen los microtúbulos. Pese a su alto grado de conservación evolutiva, los microtúbulos pueden presentar diferencias estructurales en función del tipo de organismo o celular que analicemos debido a las diferentes isoformas de la propia tubulina y a la presencia o ausencia de modificaciones post-traduccionales. Se trata de estructuras polares que presentan un extremo + o de crecimiento rápido con  $\beta$  tubulina y un extremo – o de crecimiento lento con  $\alpha$  tubulina expuesta hacia el exterior del filamento. Ambas isoformas presentan motivos de unión a GTP aunque sólo la  $\beta$  tubulina puede hidrolizarlo a GDP (66, 69, 70).

El ensamblaje de los microtúbulos a partir de dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina tiene lugar en dos fases. La primera etapa, denominada fase de nucleación, se inicia en los centrosomas (corpúsculo polar del huso o SPB en levaduras) o en los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) a excepción de plantas donde esta función la ejerce la envuelta nuclear. Esta nucleación comienza con la presencia de  $\gamma$  tubulina, una isoforma inusual que se dispone en los MTOCs formando anillos abiertos que actúan como soportes para la generación de nuevos microtúbulos. En la segunda etapa, conocida como fase de elongación, los microtúbulos crecen desde su extremo – más cercano al centrosoma hacia el extremo + orientado hacia la periferia, siempre y cuando exista  $\beta$  tubulina unida a GTP (71, 72).

En la mayoría de células los microtúbulos pueden alternar entre dos estadios, uno de crecimiento estable y otro de acortamiento rápido en un comportamiento denominado inestabilidad dinámica. Esto les permite una rápida reorganización del citoesqueleto de microtúbulos, necesaria dada la cantidad de múltiples procesos en los que está implicado (73).

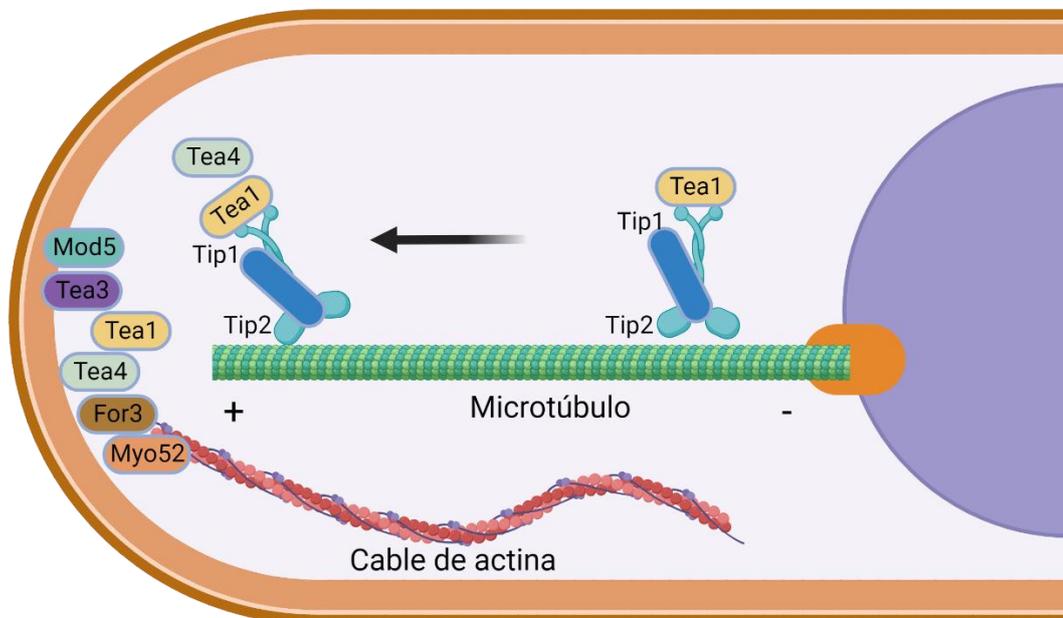
### 1.3.1.1. El citoesqueleto de tubulina en *S. pombe*

Los microtúbulos interfásicos en *S. pombe* polimerizan desde el SPB y otros MTOCs y se componen de haces de entre 3 y 5 filamentos antiparalelos, donde encontramos un extremo positivo que queda orientado al polo celular y uno negativo que se ancla al MTOC. Los microtúbulos elongan desde su extremo positivo alcanzando el polo, en donde se inicia su desensamblaje rápido con el fin de volver a comenzar su crecimiento (30, 74). Los haces de microtúbulos se estructuran con el extremo + orientado hacia los polos celulares, alternando ciclos de crecimiento y acortamiento. La inestabilidad dinámica de los microtúbulos genera fuerzas que son transmitidas hacia la envuelta nuclear lo que propicia el movimiento del núcleo hacia el centro de la célula (75, 76). El posicionamiento del núcleo es esencial para el correcto posicionamiento del sitio de

## INTRODUCCIÓN

división gracias a la presencia de la anillina Mid1 (77). Durante la mitosis, los microtúbulos interfásicos se reordenan y forman el huso mitótico, cuya función es la correcta segregación de los cromosomas en las células hijas (30).

Los microtúbulos juegan un papel fundamental determinando el sitio de crecimiento polarizado, transportando al marcador inicial Tea1 (78). Tea1 se trata de una proteína con repeticiones Kelch que localiza en los polos gracias a la kinesina Tea2 anclándose a los extremos positivos de los microtúbulos, que junto con Tip1, perteneciente a la familia CLIP-170, la cual necesaria para la correcta regulación de la dinámica de los microtúbulos. Ya en los polos, Tea1 se ancla a la membrana donde Mod5 y Tea3 median su anclaje en un mecanismo aún desconocido (79, 80). Tea4 es transportada por microtúbulos formando un complejo con Tea1. Tea4 presenta un su dominio SH3 que permite la unión a For3 haciendo de anclaje con Tea1 en el polo de crecimiento. Un trabajo sugiere que el complejo Tea1-Tea4 tienen un papel en la formación de dominios ricos en esteroides que determinan el sitio de crecimiento en *S. pombe* (81) (**Figura 6**).



**Figura 6. Los microtúbulos como vías de transporte de marcadores de polaridad hacia el polo de crecimiento.** Tea1 es llevado hacia los polos gracias a su asociación con las proteínas Tip1 y Tip2. Una vez en el polo, Tea1 y Tea4 forman un complejo que se ancla a la membrana gracias a su asociación con Tea3 y Mod5. Por otro lado, Tea4 es capaz de reclutar a la formina For3 junto con la miosina V Myo52 para nuclear los cables de actina interfásicos. Adaptado de (11).

La quinasa Pom1 localiza en los polos gracias a Tea4 pudiendo actuar aguas abajo de Tea1 entrelazando la comunicación de microtúbulos-actina para asegurar el sitio de crecimiento. Tea4 recluta a la subunidad catalítica de la PP1, Dis2, a los polos celulares actuando como subunidad reguladora (82). Aquí, Dis2 desfosforila a Pom1 facilitando su asociación con la membrana plasmática mediante la unión a fosfolípidos de la misma.

Pom1 se tiene capacidad de autofosforilarse impidiendo su localización en la membrana (83).

Los microtúbulos presentan un papel esencial durante la citocinesis ya que están implicados en el posicionamiento del núcleo en la zona central de la célula. Proteínas motoras asociadas al SPB son capaces de responder a las señales que indican la posición del núcleo en la célula además de la posición de los nuevos núcleos formados tras la mitosis en las regiones que formarán el nuevo centro de las células hijas (30, 84). El SPB también se encarga de formar el huso mitótico junto con los microtúbulos astrales que se forman en prometafase siendo más abundantes durante la anafase B (85). Estudios previos recientes sugieren que Mto1 y Mto2, factores promotores de la nucleación de microtúbulos, participan durante la división celular coordinando la formación del surco citocinético (86).

## 1.3.2 El citoesqueleto de actina

La actina es una proteína de las más abundantes dentro de los seres vivos y una de las más conservadas. Se trata de una proteína de 42 kDa cuya secuencia de aminoácidos varía muy poco entre los distintos clados de organismos eucariotas. Esta conservación se debe a su papel esencial para la supervivencia celular, interviniendo en procesos como la señalización celular, endocitosis, exocitosis o la citocinesis (87, 88).

La actina se puede encontrar tanto en forma globular (actina G) como en forma filamentosa (actina F). Esta polimerización tiene lugar en dos pasos, la nucleación y la elongación. La primera etapa, la nucleación, es la más crítica, limitada por la disponibilidad de dímeros y trímeros de actina que, dado su inestabilidad energética, tienden a despolimerizarse. Una vez estabilizados los trímeros, se añade una cuarta subunidad formando un oligómero estable que elonga rápidamente siempre y cuando haya disponibilidad de monómeros de actina G (88, 89). Tras la adición de los monómeros de actina al extremo del filamento se produce la hidrólisis de ATP que permite la unión de más monómeros de actina (90). Los filamentos de actina presentan una estructura helicoidal y están polarizados, presentando un extremo barbado o + en el cual se adicionan los monómeros de actina G unidos a ATP y un extremo puntiagudo o – donde se localizan los monómeros unidos a ADP. El extremo barbado es el más dinámico elongándose hasta 10 veces más rápido que el puntiagudo (90).

Los filamentos de actina interaccionan a su vez con numerosas proteínas de unión a actina (ABPs). En eucariotas encontramos hasta 100 ABPs altamente conservadas y se encuentran finamente reguladas espaciotemporalmente, permitiendo el cambio rápido en la dinámica del citoesqueleto en diversas condiciones ambientales. Entre las principales ABPs encontramos proteínas secuestradoras de actina, proteínas

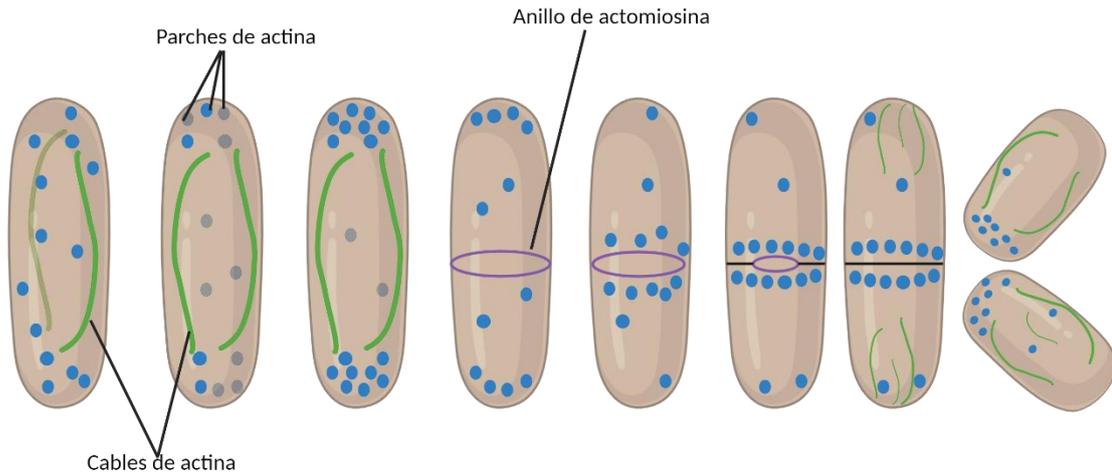
## INTRODUCCIÓN

fragmentadoras del filamento, proteínas promotoras de nucleación, proteínas de entrecruzamiento, proteínas de unión a filamentos y proteínas motoras que son las miosinas (88, 89). Tanto los microtúbulos como los filamentos de actina son polares, lo que se traduce en que presentan asimetría. Esta característica sirve como vía de transporte para proteínas motoras como la dineína o la kinesina en el caso de microtúbulos o de miosinas en el caso de filamentos de actina, jugando todas ellas un papel clave en la organización estructural del citoesqueleto (65).

En eucariotas la actina polimeriza formando microfilamentos helicoidales, aunque dichos filamentos pueden ensamblarse diferencialmente dando lugar a una amplia variedad de estructuras con funciones específicas. En metazoos se han descrito hasta 15 estructuras diferentes a partir de un grupo común de monómeros de actina, como las microvellosidades, filopodios, lamelipodios o las fibras de estrés. En levaduras, los filamentos de actina presentan una red menos extensa que en metazoos pudiendo diferenciarse en tres estructuras fundamentales: parches, cables y anillo de actomiosina (91, 92).

### 1.3.2.1 El citoesqueleto de actina de *S. pombe*

*S. pombe* presenta una única isoforma de actina codificada por el gen *act1<sup>+</sup>*. En *S. pombe*, al igual que en *S. japonicus* o *S. cerevisiae* encontramos tres estructuras diferentes de actina polimerizada: parches, cables y el anillo contráctil de actomiosina (CAR) (91, 93). Los parches localizan principalmente en los polos participando en procesos como la endocitosis y el crecimiento polarizado, los cables son filamentos de actina que se disponen desde los polos recorriendo el citoplasma longitudinalmente y participan en transporte de vesículas hasta las zonas de crecimiento. Finalmente, el CAR localiza exclusivamente en la zona de división siendo esencial para la citocinesis (89). La organización de estas estructuras es regulada por factores de nucleación específicos que, a su vez, regulan el reclutamiento de ciertas ABPs, encontrándose su actividad y funciones biológicas altamente conservadas evolutivamente (10, 94) (**Figura 7**).



**Figura 7. Citoesqueleto de actina de *S. pombe*.** Los parches de actina localizan fundamentalmente en los polos de crecimiento y en la zona media de la célula durante la citocinesis. Los cables nucleados desde los polos recorren longitudinalmente la célula y durante la división son reclutados hacia la zona ecuatorial. Finalmente, el anillo contráctil se localiza exclusivamente en la zona media y apareciendo durante la citocinesis. Adaptado de (10).

### 1.3.2.1.1. Parches de actina

Los parches de actina están constituidos por filamentos de actina cortos y ramificados entre 100 y 200 nm de longitud (95, 96). Se trata de estructuras móviles y muy dinámicas que localizan en los polos celulares durante la interfase y en la zona de división durante la citocinesis. Están implicados en el proceso de endocitosis mediada por clatrina (CME) (89, 95, 96).

El complejo Arp2/3 es el único encargado de polimerizar los parches de actina a partir de monómeros de actina (97, 98). Dicha capacidad es regulada por la unión a ATP, la disponibilidad de monómeros de actina y la activación del propio complejo (99). Su activación es debida a la acción coordinada de tres factores promotores de nucleación: Myo1, Pan1 y Wsp1. Aunque todas estas proteínas localizan en los polos celulares, exclusivamente Myo1 y Wsp1 poseen la capacidad de iniciar la nucleación de parches de actina donde Wsp1 presenta una mayor capacidad comparada con la de Myo1 que necesita la llegada de la verprolina Vrp1 para poder activar el complejo Arp2/3 (10, 96, 100, 101). Mientras las subunidades Arp2 y Arp3 se encuentran disociadas el complejo se mantiene inactivo. Sin embargo, con la llegada de los factores de nucleación ambas subunidades se aproximan y asocian junto con el resto de subunidades del complejo favoreciendo la unión de monómeros de actina iniciándose la nucleación (99). La llegada y activación de Arp2/3 produce el reclutamiento de numerosas ABPs como la fimbrina (Fim1) que participa en el entrecruzamiento de los filamentos de actina y contribuye a su reforzamiento alrededor de la invaginación endocítica. Además, Fim1 previene la unión de la tropomiosina Cdc8 favoreciendo la actuación del factor despolimerizante de los filamentos de actina, la cofilina (Adf1) que corta los filamentos existentes para la generación de nuevos parches de actina (102, 103).

## INTRODUCCIÓN

La principal función de los parches de actina se da durante la endocitosis, donde, diferentes mutantes del complejo Arp2/3 presentan defectos en este proceso (10, 104). Además, participan en durante la citocinesis y síntesis del septo, aunque no participan en el ensamblaje del CAR pese a encontrarse próximo al mismo (105, 106).

### 1.3.2.1.2. Cables de actina

Los cables de actina se conforman por haces paralelos de filamentos de actina no ramificada que se extienden longitudinalmente a lo largo de la célula. La selección del sitio de ensamblaje de los cables de actina es compleja, aunque sí se conoce la existencia de diferentes vías, como la mediada por la GTPasa Cdc42 junto con la proteína adaptadora Pob1 (107). Además, Los microtúbulos participan en la nucleación de los cables cerca de la corteza celular gracias al complejo Tea1-Tea4 (108, 109). Una vez determinado el sitio de nucleación la formina For3 se recluta y activa comenzando la polimerización de los filamentos de actina (110, 111). Cdc42 y Bud6 se encargan de la localización y activación de For3 liberándola de su estado inactivo, autoinhibido (112). Otras proteínas asociadas a los cables nucleados por For3 son la coronina Crn1 y Cdc8, las cuales estabilizan y facilitan su interacción con las miosinas (113, 114). La principal función de los cables de actina es la regulación del crecimiento polarizado participando en el transporte de vesículas mediado por la miosina Myo52 que transporta, entre otras proteínas, los componentes necesarios para la síntesis de la pared celular (115, 116).

La función de For3 se vuelve esencial durante el ensamblaje del CAR en mutantes hipomorfos de la formina Cdc12, sugiriendo que For3 coopera con Cdc12 para la nucleación de cables de actina que posteriormente se incorporarán al CAR durante la citocinesis (117).

### 1.3.2.1.3. Anillo de actomiosina (CAR)

El anillo contráctil es una estructura compleja formada por filamentos antiparalelos no ramificados, miosinas de tipo II, que serán explicadas en el apartado 1.4., y otras ABPs que pueden asociarse con hasta 100 proteínas diferentes (10, 89). En *S. pombe* los filamentos de actina que se incorporan al CAR son nucleados fundamentalmente por la formina Cdc12 (118, 119). El CAR es una estructura esencial para la citocinesis cuya formación se produce al final de la mitosis y determinará la posición donde se producirá la división celular (120). Su posicionamiento, dinámica de formación y regulación están altamente coordinados, tal y como se explicará en el apartado 1.5.

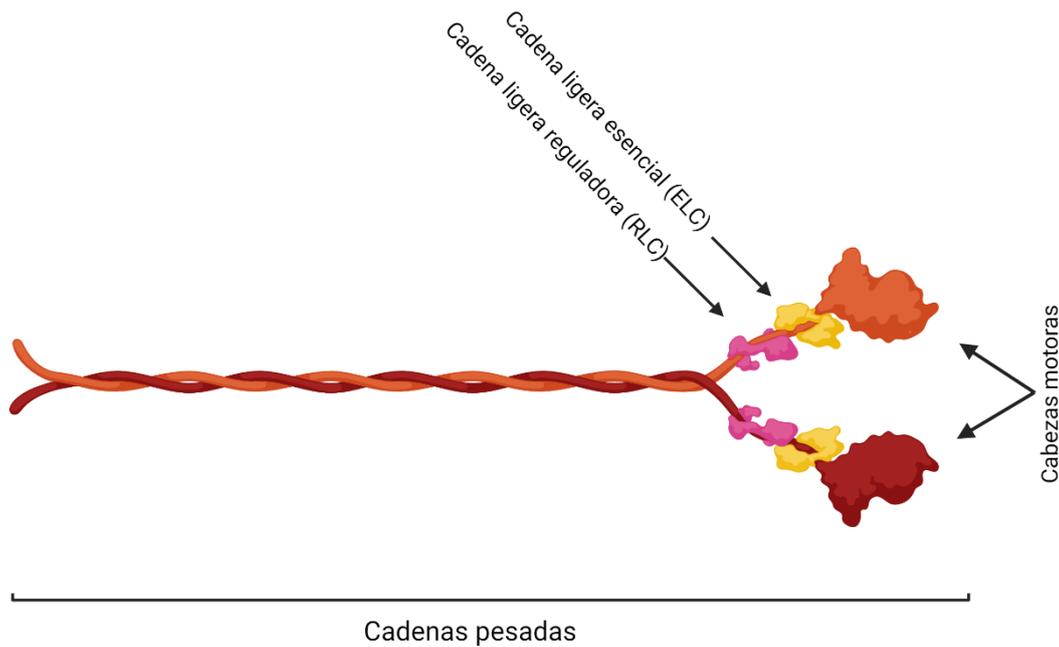
## 1.4. Las miosinas

## INTRODUCCIÓN

Las miosinas constituyen una superfamilia de proteínas que emplean el ATP como fuente de energía y filamentos de actina como medio motor. Constituyen un grupo muy amplio de ABPs de las cuales solo un número reducido de ellas han podido caracterizarse en análisis bioquímicos complejos (121). Hasta la fecha, se han descrito en eucariotas hasta 35 tipos de miosinas agrupados en diferentes clases (14, 122). La diversidad funcional de estas proteínas viene dada en la amplia variedad de comportamientos biofísicos y estructurales en las diferentes miosinas, clasificándolas en diferentes clases en función de su estructura general (14).

Independientemente de su función, las miosinas están conformadas por un multímero que contiene dos cadenas pesadas, donde en función de su estructura general se clasificarán las miosinas, cuatro cadenas ligeras, dos esenciales (ELCs) y dos reguladoras (RLCs). Las cadenas pesadas presentan una región N-terminal conservada evolutivamente donde se encuentra el dominio motor, capaz de producir fuerza, y en su extremo C-terminal una cola muy divergente entre las diferentes cadenas pesadas (**Figura 8**). El dominio motor además contiene el motivo de unión a actina e hidrólisis de ATP mientras que el C-terminal se encarga de la correcta localización de la miosina confiriéndose su especificidad en procesos como la citocinesis o transporte vesicular (123). Entre el dominio motor y el extremo C-terminal de las cadenas pesadas presentan un número variable (de uno a seis) de dominios de unión a sus cadenas ligeras en la región “*Neck*” o cuello (124, 125).

La actividad de todas las miosinas está regulada por interacciones con cadenas ligeras específicas. Estas proteínas similares a la calmodulina (y en algunos casos de calmodulina en sí) se asocian con diferente afinidad a la región cuello de las cadenas pesadas, donde no sólo aumentan la rigidez del 'brazo de palanca' si no también evitando que la cola se doble sobre sí misma para inhibir su actividad motora (126, 127).



**Figura 8. Multímero que conforma la miosina.** Adaptado de (2).

La función más conocida de las miosinas es su participación en la contracción muscular en células eucariotas superiores. Sin embargo, esta función solo está presente en metazoos y, pese a constituir entre el 60 y el 70% del total de proteínas del músculo esquelético, las miosinas realizan diversas funciones tanto en metazoos como en el resto de grupos de organismos vivos (121). Entre las diversas funciones que desarrollan las miosinas se encuentran el transporte de vesículas, endocitosis, formación de estructuras complejas junto con la actina y la citocinesis, todas ellas asociándose las diferentes clases de miosinas en miosinas no musculares (NM) (14). Precisamente, la interacción entre los filamentos de actina y las miosinas juegan un papel crucial en la generación de fuerza y movimientos inter e intracelulares. Durante el ciclo de unión-desunión de las cadenas pesadas dependiente de ATP, como consecuencia de la hidrólisis de éste en los dominios ATPasa, se producen cambios en la afinidad de las cabezas motoras de la miosina por los filamentos de actina desde estados con menor afinidad (con ATP unido) a estados con mayor afinidad (con ADP unido), resultando en la generación de fuerza y el consecuente desplazamiento de la miosina sobre los filamentos de actina (128).

### 1.4.1. Conservación evolutiva de las miosinas

Todos los organismos eucariotas que tienen citoesqueleto de actina tienen al menos algún tipo de miosina. Estas proteínas se encuentran altamente conservadas que desarrollan diversas funciones dependiendo del tipo de tejido en el que se encuentren. Si alineamos la secuencia del extremo C-terminal de las cadenas pesadas podemos observar las diferentes funciones exclusivamente no motoras que desarrollan dichas

## INTRODUCCIÓN

cadena, como, por ejemplo, su capacidad de unir cargos, la membrana u otras proteínas y diversos sustratos (14).

Sorprendentemente, si alineamos los extremos N-terminal de las mismas podemos inferir la función de las mismas. Por ejemplo, las diferencias en el dominio motor muestran que algunas clases de miosina se mueven de manera procesiva, ya sea como dímeros o monómeros (miosinas de tipo V, VI o IX), para trabajar junto con otras miosinas para ejercer una fuerza continua (como, por ejemplo, miosinas tipo II), o para actuar como un sensor de tensión dentro de la célula (por ejemplo, miosinas tipo I) (129-131). Sin embargo, a medida que se dispone de más genomas secuenciados, conocemos más tipos de miosinas llegando hasta 35 clases diferentes (132), número que probablemente aumente con el descubrimiento de más miosinas específicas de determinados tejidos u organismos.

Si bien es cierto que las miosinas de tipo II son las más estudiadas en los diferentes grupos de eucariotas, bien sea por su implicación con la contracción muscular o su función citocinética, el resto de grupos de miosinas se han podido caracterizar específicamente en diversos grupos de hongos y levaduras (14). En *S. cerevisiae*, se han descrito 5 cadenas pesadas de miosinas agrupadas en tres clases diferentes. Myo3 y Myo5 constituyen las cadenas pesadas de tipo I, cuya función principal es asociarse con el complejo Arp2/3 para la nucleación de parches de actina (100). Myo1 es la única miosina tipo II cuya función principal es la formación y cierre del CAR (133). Finalmente, Myo2 y Myo4 se tratan de miosinas tipo V encargadas del transporte de cargos por la célula, mientras que en el caso de Myo2 estos cargos son vesículas necesarias para la formación de nueva pared celular tras la citocinesis, Myo4 parece estar implicada en el transporte de mRNAs dentro del citoplasma celular (134).

En el caso de *S. pombe* y *S. japonicus*, de igual manera que *S. cerevisiae*, encontramos exclusivamente miosinas de tipo I, II y V. En ambos casos encontramos una sola miosina tipo I, denominada Myo1; dos miosinas tipo II, Myo2 y Myp2/Myo3; y dos miosinas tipo V, Myo51 y Myo52, implicadas en diversas funciones (9, 135, 136).

### 1.4.2. Miosinas en *S. pombe*

*S. pombe* presenta cinco cadenas pesadas agrupadas en tres clases: I (Myo1), II (Myo2 y Myp2/Myo3) y V (Myo51 y Myo52) (137, 138).

#### 1.4.2.1 Miosinas tipo I

Myo1 es la única miosina de clase I en *S. pombe*. Aunque su delección no es letal, pero presenta un fuerte retraso en el crecimiento tanto a bajas como a altas temperaturas

además de una morfología aberrante (139). Myo1 participa en la activación del complejo Arp2/3 (100, 101).

Su función no se restringe solo a la polimerización de parches de actina sino que también juega un papel clave en la renovación de la membrana y la endocitosis (140). Como en todas las miosinas de clase I, el extremo C-terminal de Myo1 contiene un dominio de homología conservado (dominio TH2), necesario para la asociación de Myo1 con la membrana. El dominio TH2 permite la formación de membranas celulares durante la endocitosis y, probablemente, la reorganización de la membrana durante la meiosis (100, 139, 141-143).

Myo1 posee dos dominios de unión a calmodulina (IQ) adyacentes al extremo C-terminal de su dominio motor. En eucariotas superiores se ha descrito que la unión de la calmodulina a miosinas tipo I es dependiente de  $Ca^{2+}$ . Esto se traduce en un aumento de la rigidez estructural de la región del dominio IQ, que le permite actuar como una palanca que permite el movimiento del dominio motor sobre los parches de actina. Además, la unión a calcio altera de manera crítica la afinidad de esta miosina para modular su función dentro la célula modulando la actividad ATPasa de las cabezas motoras (144). Así, la calmodulina Cam1 se asocia con Myo1 y es necesaria para su correcta localización (139) (**Figura 9**).

Un análisis de fosfoproteoma revela múltiples sitios de fosforilación en Myo1 (145). Hasta la fecha, solo se ha descrito que la fosforilación de Myo1 se da en motivos TEDS de su dominio motor. Este motivo TEDS sólo se encuentra en las miosinas de organismos unicelulares simples (146). La fosforilación en este motivo se da en el residuo Ser361 dependiente de las quinasas de la familia Ste20 Nak1 y Pak1 (también conocidas como Orb3 y Orb2, respectivamente), y modula la afinidad de Myo1 por la actina, regulando así su función endocítica (140). Las mutaciones dentro del motivo TEDS alteran críticamente la afinidad por la actina de Myo1 (137, 140).

Cdc8 es capaz de inhibir a Myo1 impidiendo que se asocie a la actina, mientras que la fimbrina Fim1, secuestra a Cdc8 favoreciendo la unión de Myo1 a los filamentos de actina (137). Myo1 localiza también en la zona media, probablemente activando al complejo Arp2/3 durante la etapa final de la citocinesis (106, 143).

### 1.4.2.2 Miosinas tipo V

En *S. pombe* encontramos dos cadenas pesadas de miosinas de clase V, Myo51 y Myo52. Myo52 se encuentra tanto en los polos de crecimiento como en la zona media durante la citocinesis mientras que Myo51 localiza exclusivamente en el CAR durante citocinesis (115, 147). Sin embargo, tanto Myo51 como Myo52 requieren de un citoesqueleto de actina inalterado para su adecuada localización ya que su principal papel es el transporte de vesículas secretoras a lo largo de los cables de actina (148). Adyacentes a sus dominios motores, en sus cadenas pesadas presentan una larga región

## INTRODUCCIÓN

de cuello que se compone de hasta seis motivos IQ de unión a calmodulina, que preceden a un dominio tipo *coiled-coil* (permitiendo la dimerización de las cadenas pesadas) y un dominio tipo GTD en el extremo C-terminal, que se une, ya sea directamente o a través de proteínas adaptadoras, a los cargos que transporta (**Figura 9**). En las células de metazoos, las miosinas de clase V son capaces de moverse procesivamente en la actina (es decir, dar varios pasos antes de disociar del polímero de actina). Sin embargo, las miosinas de tipo V en levaduras y eucariotas más simples representan un subconjunto de miosinas de clase V cuya única función descrita es transportar cargos en un solo sentido (149-152).

La ausencia de Myo51 no presenta graves defectos mientras que la falta de Myo52 muestra una pérdida de la polaridad seguido de un retraso en el crecimiento y defectos en citocinesis. Sorprendentemente, ambas deleciones no presentan un fenotipo aditivo (115, 147). Myo52 participa en la formación de los cables de actina gracias al transporte de los reguladores de For3 hacia los polos celulares (148). Además, se encarga transportar vesículas con Bgs1 y otras glucán-sintasas a los polos de crecimiento y a la zona media para la síntesis del septo. Por el contrario, Myo51 tiene un papel más discreto durante el ensamblaje del CAR (116, 147, 153).

A diferencia de Myo52, la función de Myo51 durante el crecimiento vegetativo aún no está del todo definida. Sin embargo, análisis transcriptómicos sugieren un posible papel, de igual manera que Myo52, en el proceso de meiosis (154). De igual manera que Myo52, en ausencia de éste Myo51 localiza en los polos celulares, lo que sugiere que ambas las miosinas desempeñan un papel en la promoción de la fusión celular (155). Sin embargo, el papel fundamental de Myo51 se ha descrito en citocinesis, donde después de completar la profase I, Myo51 llega a la zona media donde juega un papel coordinando la organización temporal y espacial de la segregación cromosómica. El mantenimiento de la localización de Myo51 en los SPB no dependen de la actina sino del citoesqueleto de los microtúbulos. (155).

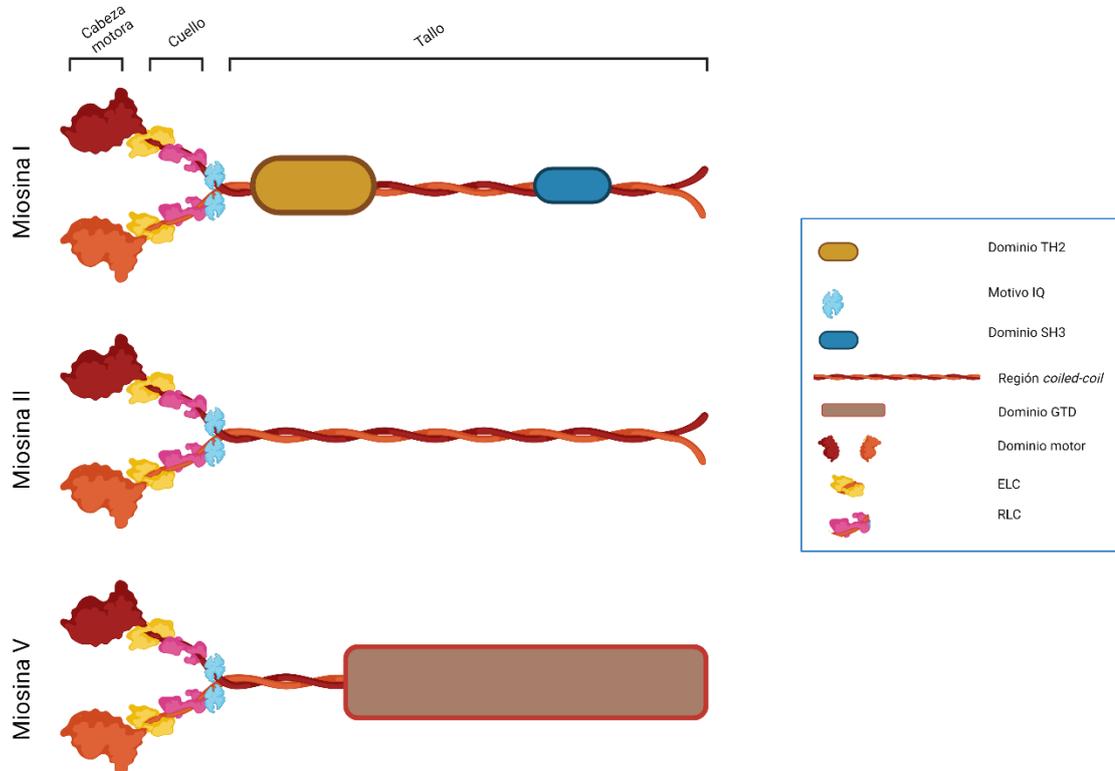
De igual manera que Myo1, la actividad de Myo51 y Myo52 está regulada por cadenas ligeras. De igual manera que con Myo1, la calmodulina actúa como una cadena ligera para Myo51 y Myo52, y se asocia con cada uno de los motivos IQ dentro de la región del cuello de ambas miosinas (156). Además, se ha demostrado que la cadena ligera esencial Cdc4 también se uniría a Myo51, y esto podría reflejar la localización exclusiva de Myo51 en CAR durante la citocinesis (157). Sorprendentemente, la eliminación de todos los motivos IQ de Myo52 no alteran notablemente su movilidad intracelular, lo que indica que la calmodulina es prescindible para Myo52 (156). El papel de la fosforilación de las cadenas pesadas en la regulación tanto de Myo51 como de Myo52 no es del todo conocido a día de hoy (137, 158).

### 1.4.2.3 Miosinas tipo II

## INTRODUCCIÓN

Myo2 y Myp2/Myo3 son las dos cadenas pesadas de miosina II en *S. pombe* (159-161). Están asociadas, por un lado, a la cadena ligera esencial Cdc4 (162) y a la cadena ligera reguladora Rlc1 (163). Las miosinas de clase II proporcionan la fuerza contráctil en el tejido muscular. Fueron las primeras miosinas en ser identificadas y, por tanto, son las miosinas más estudiadas. Estas miosinas poseen largos dominios *coiled-coil*, lo que les permite formar homodímeros (**Figura 9**). En células de metazoos no musculares, la miosina II proporciona la fuerza contráctil necesaria para la citocinesis (14).

La principal función de Myo2 y Myp2 se da durante la citocinesis, localizándose en la zona media (159-161, 164). Myo2 es el principal componente CAR siendo una de las primeras moléculas en llegar a la zona de división durante la mitosis y citocinesis mientras que Myp2 llega 30 minutos más tarde (153, 165). Myo2 forma un dímero de 2 cabezas, mientras que Myp2 es monomérica (166).



**Figura 9. Principales dominios en las miosinas de *S. pombe*.** El dominio motor le confiere la capacidad de asociarse a la actina de gracias a la hidrólisis de ATP provocando un cambio conformacional en el dominio de la cabeza que se traduce en un movimiento. La región del cuello de la miosina consta normalmente de un número variable de dominios IQ, a los que se asocian la calmodulina y las cadenas ligeras esencial y reguladora. Esta asociación de una cadena ligera con los motivos IQ dentro de la región del cuello no sólo aumenta la rigidez de este "brazo de palanca", sino que también impide que la región de la cola se pliegue sobre sí misma, lo que inhibiría la actividad motora. Los dominios del tallo divergen sustancialmente entre las distintas clases de miosinas. Es este dominio es que le confiere la capacidad de participar en funciones no motoras y, por tanto, determina las funciones específicas de cada tipo de miosina, como la endocitosis, citocinesis o el transporte de vesículas. Adaptado de (14).

La contribución de ambas cadenas pesadas durante la citocinesis es diferente. Mientras que Myo2 es esencial y su delección da lugar a células incapaces de completar

## INTRODUCCIÓN

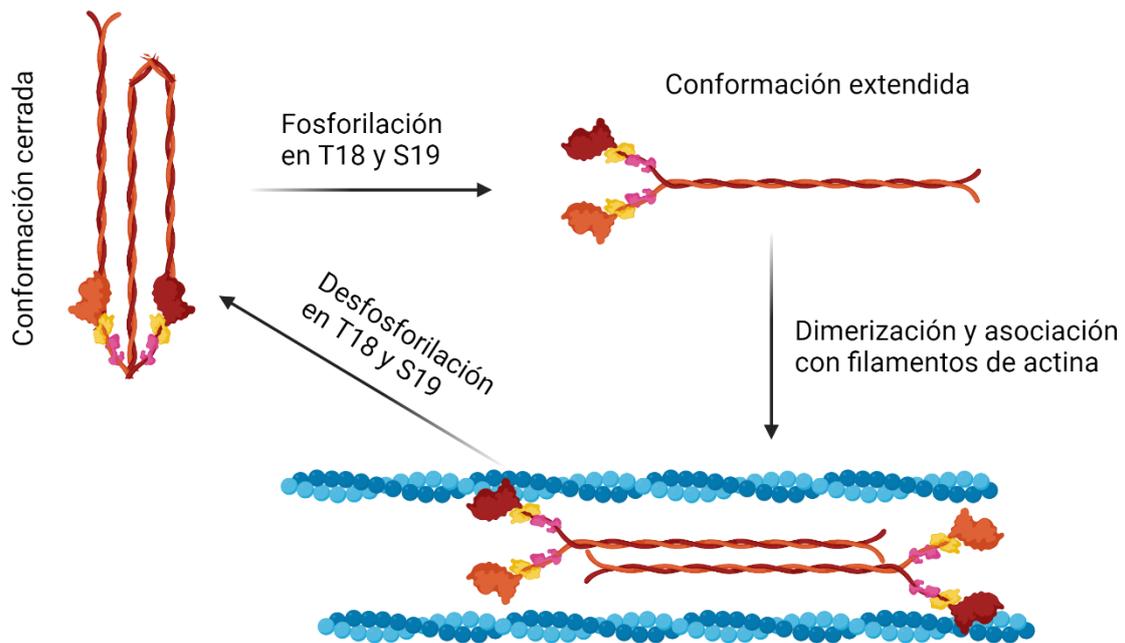
la citocinesis (160, 164), la delección de Myp2, presentan un defecto menos agresivo en citocinesis, siendo capaces de proliferar (167, 168). Sin embargo, la principal función de Myp2 se da durante el estrés, pues los efectos de su delección se ven agravados cuando es expuesto a un medio hipertónico (159, 161, 167, 169). Myo2 participa fundamentalmente durante el ensamblaje y contracción del CAR debido a su actividad motora, como desarrollaremos en el apartado 1.5. Por el contrario, Myp2 adquiere mayor relevancia durante la contracción del CAR, donde su papel se manifiesta de manera más clara cuando la actividad de Myo2 se ve comprometida (170, 171). Pese a tener diferentes funciones, recientemente se ha observado que también colaboran en la activación de Bgs1 (169). En metazoos se ha descrito que la actividad motora de las miosinas de clase II es esencial para que, junto con las septinas, se genere la fuerza necesaria para formar el futuro de abscisión en la célula (172).

### 1.4.2.3.1 Mecanismos de regulación de la actividad de miosinas tipo II

Las miosinas tipo II juegan un papel crítico en procesos fundamentales tales como la morfogénesis, adhesión celular, exocitosis, migración celular y, sobre todo, en citocinesis (133), por ello es necesario que tanto la actividad ATPasa como la capacidad de unión de las cadenas pesadas a la actina debe estar perfectamente regulada y coordinada. Si bien el ensamblaje *in vitro* de las cadenas pesadas en células de metazoos y su regulación por fosforilación han sido estudiadas y bien caracterizadas (122, 173-176), a día de hoy no existen muchos estudios *in vivo* que respalden estos estudios.

En células eucariotas superiores, las cadenas pesadas Myh9, Myh10 y Myh14 han sido profundamente estudiadas tanto sus propiedades bioquímicas, su estructura monomérica y su ensamblaje en filamentos bipolares, y la regulación de su ensamblaje de filamentos por las RLC y la fosforilación de las cadenas pesadas, en el contexto de adhesión, polarización y migración celular (122, 176) (**Figura 10**). Diversos estudios han puesto de manifiesto que alteraciones en la secuencia de MYH9 está relacionados con diversas patologías, ya que o bien su estructura se ve alterada o bien su regulación por fosforilación de su secuencia o de sus RLCs altera la actividad de la miosina (122, 176, 177).

En cuanto al papel de las RLCs, la fosforilación de la RLC es un mecanismo regulador común de la actividad de la miosina II tanto en el músculo esquelético como en células no musculares. La fosforilación de RLC juega un papel positivo clave como regulador de la función de miosina II en la contracción del músculo cardíaco en condiciones normales y de enfermedad. Los pacientes con insuficiencia cardíaca muestran una fosforilación RLC reducida (20). En otros grupos de vertebrados, la fosforilación de RLC en Ser19 es esencial para la actividad contráctil de NMII durante la migración celular y la citocinesis (178, 179).



**Figura 10. Papel de la fosforilación de RLC en metazoos.** En ausencia de fosforilación de RLC, las cadenas pesadas adoptan una conformación cerrada quedando su actividad motora completamente inhibida. La fosforilación de RLC en T18 y S19 resulta en un cambio conformacional adquiriendo el complejo una conformación extendida, la cual de manera espontánea es capaz de dimerizar y asociarse con filamentos de actina. Es en este estadio donde las cabezas motoras presentan una mayor actividad ATPasa y, por tanto, motora. Adaptado de Garrido-Casado *et al.*, 2021.

De igual manera, en *Drosophila melanogaster*, la fosforilación de su RLC denominada *Spaghetti squash* en el residuo Ser21 es fundamental para activar la miosina II evitando la letalidad embrionaria y defectos graves de citocinesis (180). Por el contrario, en *Dictyostelium discoideum* la fosforilación de su RLC en Ser13 no es esencial para regular la función de la miosina II, ya que la expresión de una versión mutante S13A no fosforilable rescata completamente los defectos citocinéticos y de desarrollo en mutantes nulos para la RLC (181).

En *S. cerevisiae*, la actividad de Myo1 no parece estar regulada por la fosforilación de sus cadenas pesadas ni por la fosforilación de su RLC, Mlc2. Si bien es cierto que mutantes nulos para esta proteína provocan defectos citocinéticos en la levadura, alteraciones en el residuo Ser6 no alteran la función de Myo1 (2). Estudios posteriores han identificado que la regulación de la actividad de Myo1 en citocinesis viene dada por la disponibilidad de cables interfásicos nucleados por la formina Bni1, lo que sugiere una fuerte relación funcional entre la actividad de las miosinas tipo II y los cables interfásicos (133).

## 1.4.2.3.2 La cadena ligera reguladora Rlc1

Rlc1 es la cadena ligera reguladora no esencial de la miosina II en *S. pombe*. Su delección fue caracterizada de una búsqueda de mutantes con defectos de separación a bajas temperaturas. En este mismo estudio, identificaron que el mutante *rlc1Δ* era incapaz de suprimir el fenotipo de termosensibilidad del mutante hipomorfo de Cdc4, el mutante *Cdc4-8*. Además, el mutante nulo para Rlc1 resulta ser sintético letal con el mutante *Myo2.E1* y *Rng2-D5*, mutantes termosensibles de la miosina II. Curiosamente, el doble mutante *myp2Δ rlc1Δ* sí resultó ser viable (163).

El análisis de la secuencia de Rlc1 revela que su extremo C-terminal se encuentra altamente conservado con otras RLCs tanto de levaduras como de organismos eucariotas superiores (4, 182). Tanto Rlc1 como Cdc4 mantienen su localización en el CAR durante la mitosis. Sin embargo, sólo Cdc4 se mantiene en la zona media al eliminar los dominios IQ de Myo2 y Myp2. Esto se debe a que Cdc4 tiene capacidad de unirse a otras proteínas del CAR con dominio IQ como Myo51 o Rng2, lo que promueve un aumento de la interacción de Myo2 con Rlc1 (157). La asociación de Myo2 con Cdc4 a través del primer motivo IQ de Myo2 estabiliza a la miosina y favorece su acumulación en los nodos, mientras que Rlc1 se asocia al segundo motivo IQ y modula su actividad mediante fosforilación (183). Rlc1 se une tanto a Myo2 como a Myp2 por sus dominios IQ localizando con Myo2 durante todo el proceso de citocinesis y con Myp2 durante la constricción del CAR (182).

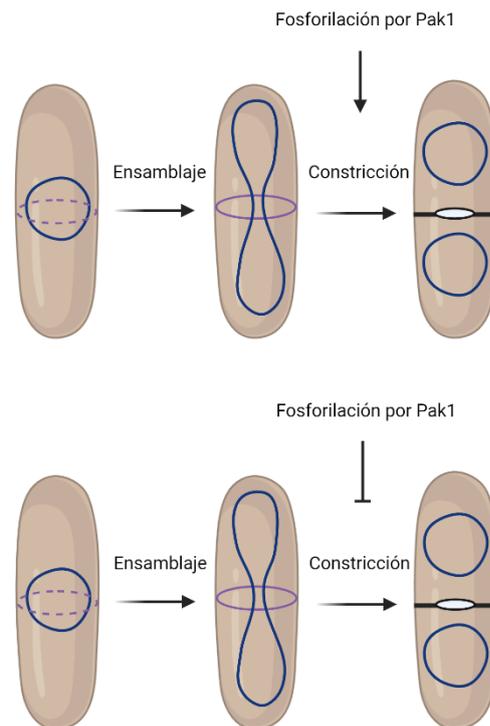
De igual manera que en *S. pombe*, en *S. japonicus* Rlc1 se trata de la cadena ligera reguladora de Myo2 y Myp2 en esta levadura y, aunque se desconocen las funciones específicas de Rlc1 en esta levadura, Rlc1 localiza durante todo el CAR junto con Myo2, ya que en ausencia de Pom1, tanto Myo2 como Rlc1 no son capaces de posicionar en el centro celular durante la citocinesis (135).

La regulación de la actividad motora de Myo2 en *S. pombe* no está del todo definido. Los primeros estudios realizados tanto con Myo2 como con Rlc1 sugieren una regulación por autoinhibición de la propia cadena pesada, de tal manera que Rlc1 se uniría a sus motivos IQ liberando a Myo2 de su estado autoinhibitorio. Sin embargo, el mutante carente de este motivo no presenta alteraciones significativas en citocinesis (182). Por otro lado, otros estudios sugieren una regulación de la propia cadena pesada por fosforilación en un residuo conservado de Serina, Ser1444. Nuevamente, alteraciones en este residuo no producen cambios relevantes en la actividad de Myo2 (184).

Diversos estudios han identificado que Rlc1 es fosforilado por Pak1 en los residuos Ser35 y Ser36, aunque estudios posteriores apuntan a que es exclusivamente el residuo Ser35 el que es verdaderamente fosforilado por Pak1 (185, 186). Sin embargo, el papel de la fosforilación de Rlc1 sobre la actividad de Myo2 es contradictorio. Mientras que unos autores sugieren que la fosforilación ejerce una regulación negativa, ya que, por un lado, su ausencia provoca un adelanto en citocinesis (185) y, por otro, estudios in

## INTRODUCCIÓN

in vitro observan que la adición de Rlc1 fosforilado a Myo2 provoca una menor afinidad por los filamentos de actina, lo que sugiere una menor actividad de la miosina (4). Por el contrario, otro estudio apunta a que la fosforilación de Rlc1 es positiva para la actividad de Myo2, pues el fosfomutante rlc1S35AS36A presenta un claro retraso citocinético que es restaurado en el mutante fosfomimético rlc1S35DS36D (184). Finalmente, otros autores apuntan a que el papel de la fosforilación de Rlc1 no es relevante para la actividad de Myo2, pues no produce alteraciones sobre la dinámica de citocinesis en la célula (186) (**Figura 11**).



**Figura 11. Papel de la fosforilación de Rlc1 sobre la actividad de Myo2 en *S. pombe*.** (Arriba) Algunos autores sugieren que la fosforilación de Rlc1 en S35 y S36 es positiva para la actividad de Myo2, dicha fosforilación favorece la constricción del anillo. En cambio, otros autores (abajo) sugieren que la fosforilación de Rlc1 es negativa para la actividad de Myo2, por tanto, esta fosforilación impide el cierre del CAR. Adaptado de (4).

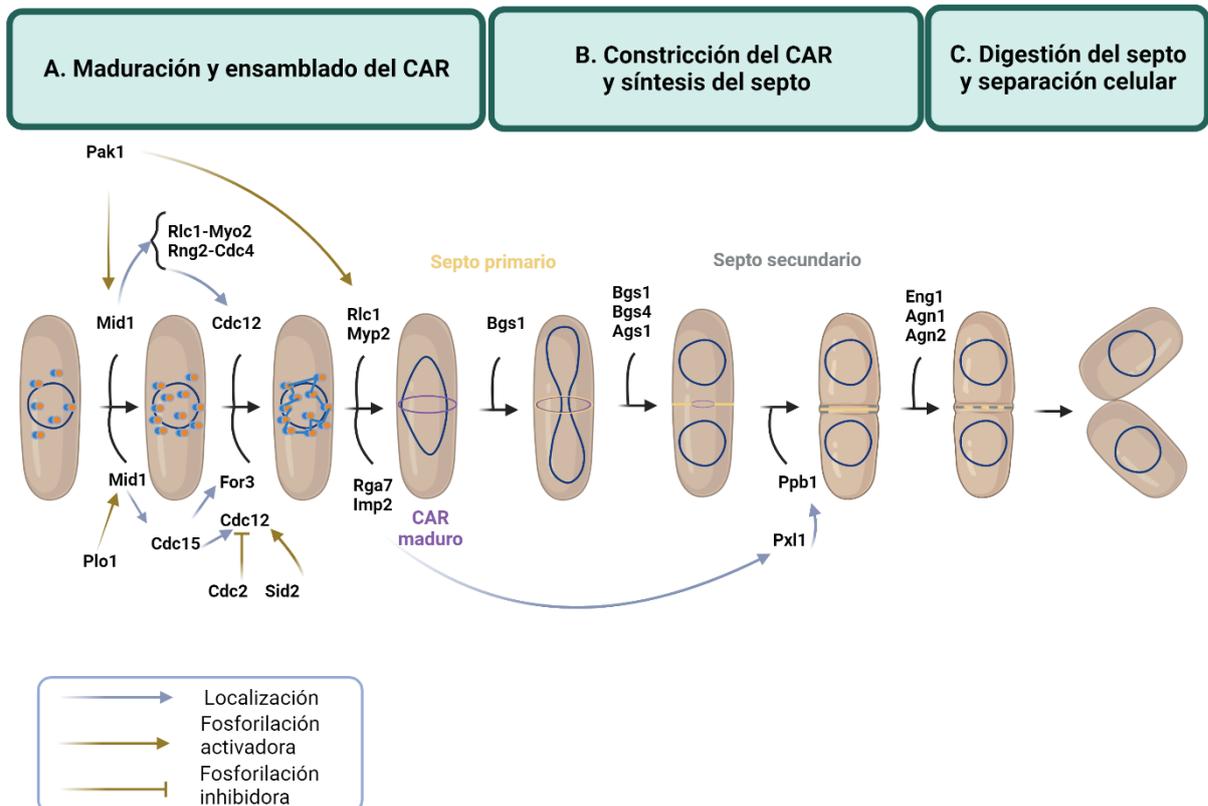
### 1.5. La citocinesis en *S. pombe*

La citocinesis es la etapa final del ciclo celular en la que una célula se divide físicamente para dar lugar a dos células independientes. Se trata de un proceso complejo y altamente regulado, que debe estar coordinado espacial y temporalmente con la mitosis para asegurar que el material genético se reparta de forma equitativa entre las dos células resultantes. Los fallos en la regulación de la citocinesis son deletéreos para los seres vivos, ya que conducen a la aparición de aneuploidías, que en muchos casos son el punto de partida del desarrollo tumoral en metazoos (187, 188). Los mecanismos de control de la citocinesis han de ser robustos, pero a la vez lo

## INTRODUCCIÓN

suficientemente flexibles para responder de manera eficiente frente a los cambios ambientales, ya que estos cambios determinan en último término si se dan las condiciones adecuadas para la proliferación celular. Con este fin las células han desarrollado elaborados mecanismos regulatorios entre las diferentes rutas de señalización que participan en la citocinesis, y que incluyen múltiples mecanismos de interacción funcional y circuitos de retroalimentación (189).

En células animales eucariotas y levaduras, la citocinesis involucra una organización profunda del citoesqueleto y está asociada con la formación del CAR, que se contrae al final de la anafase B y es esencial para la división celular. Este proceso de división apareció hace millones de años en los ancestros de muchos animales, amebas y hongos. Por ello, las proteínas implicadas en la citocinesis, así como los mecanismos que controlan su formación y desmontaje, están más conservados y son más conocidos en la levadura de fisión que en otros eucariotas, incluidas las células de animales. (120) (Figura 12).



**Figura 12. La citocinesis en *S. pombe*.** El posicionamiento del núcleo en la zona media determina cual será sitio de división. Mid1 localiza dentro del núcleo y su fosforilación por Plo1 en G2 promueve su exporte al citoplasma. Además, Mid1 es fosforilada por Pak1, favoreciendo su interacción con los nodos precursores del anillo, localizados alrededor del núcleo los cuales reclutan a Rng2, Cdc4, Myo2 y Rlc1, además de a Cdc15. Al final de la profase tanto Cdc15 como el módulo Rng2-miosina II reclutan a la formina esencial Cdc12, nucleando los cables de actina que se incorporarán al CAR, estando regulada por fosforilación dependiente Sid2 y Cdc2, localizando también la formina For3 en esta fase. Tras el ensamblaje del CAR se produce la maduración del mismo donde la miosina no esencial Myp2 y las proteínas F-BAR Imp2 y Rga7 llegan al CAR. Una vez maduro comienza su constricción seguido de la síntesis del septo de división gracias a las glucán sintetas Bgs1, Bgs4 y Ags1. Por último, se produce la separación de las nuevas células hijas gracias a la constricción del CAR y por la de las glucanasas Agn1, Agn2 y Eng2, que digirán el septo primario. Adaptado de (17).

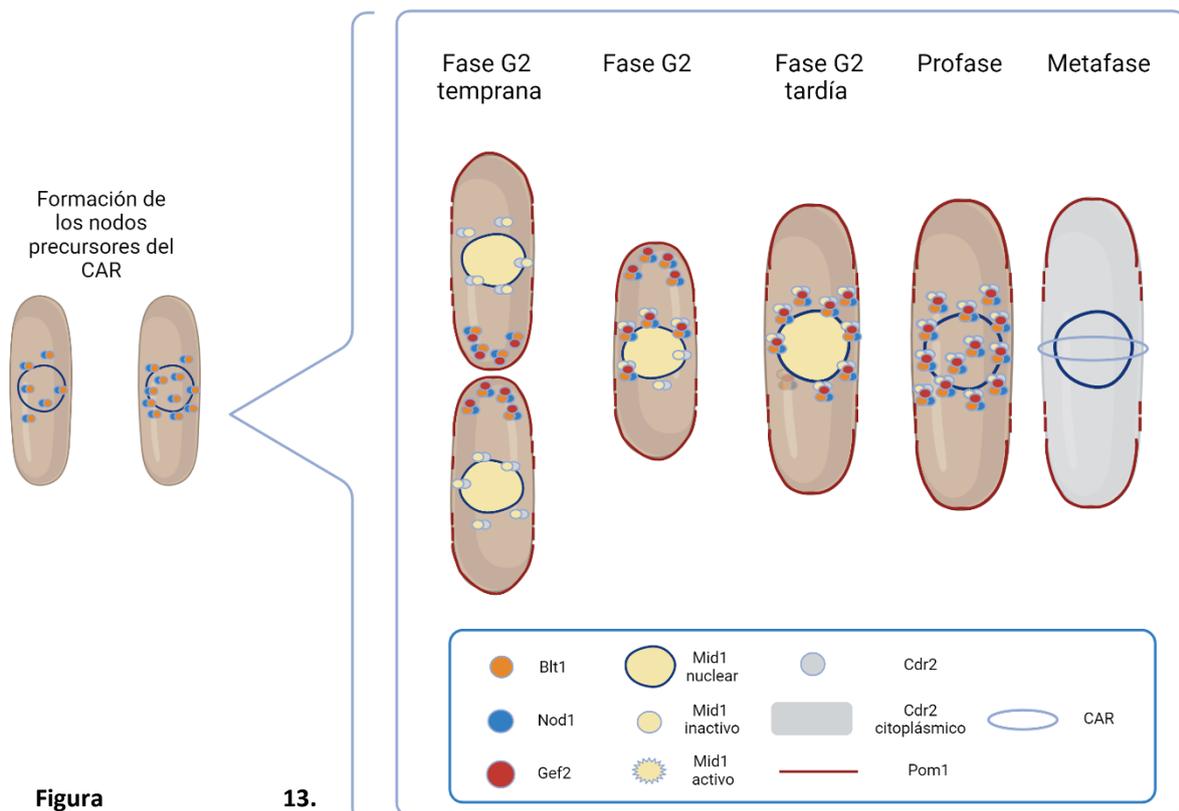
## 1.5.1 Determinación del sitio de división

La citocinesis se trata de un proceso evolutivamente muy conservado en el cual la selección del sitio de división difiere entre las células eucariotas, y se establece en diferentes puntos del ciclo celular. En las células animales el determinante principal del posicionamiento del surco de división es el huso mitótico, y la selección tiene lugar durante la mitosis, concretamente durante la anafase tardía y/o la telofase (190). En *S. cerevisiae* las septinas determinan el plano de división durante la fase G1 de la interfase al reclutar a las proteínas marcadoras del sitio de gemación a la región adyacente al mismo (191). En *S. pombe* la selección del sitio de división ocurre durante la fase G2 del ciclo celular, y depende de la señalización por Mid1, una proteína similar a la anilina de mamíferos (192). Los precursores de la formación del anillo se ensamblan en nodos que se disponen alrededor del núcleo y pueden ser de dos tipos: los nodos de tipo 1 y los nodos de tipo 2 (106, 193).

Los nodos de tipo 1 están presentes en la zona media durante la interfase y en los cuales se encuentran las quinasas Cdr1, Cdr2 y Wee1; y la anillina Mid1. En los nodos de tipo 2 se encuentra Blt1, una proteína de anclaje con la capacidad de autoensamblarse y que interacciona con Gef2, Klp8 y Nod1, que localizan en el polo celular procedente de la división anterior (193). La organización de los nodos de tipo 1 depende de Cdr2, con capacidad de autoensamblarse y de interaccionar con otras proteínas para formar los nodos (193). Así, Cdr2 interacciona con Mid1 y la recluta a la zona media de la célula, anclándose en el córtex celular por medio de su extremo carboxilo terminal (194, 195), y promoviendo el reclutamiento de Wee1 junto con Cdr1, que junto con Cdr2, inhiben y fosforilan a Wee1, favoreciendo la desfosforilación de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) Cdc2 y la entrada en mitosis. Por tanto, la presencia en los nodos de estas quinasas determina que estos se comporten como centros de señalización que regulan la progresión del ciclo celular (183).

## INTRODUCCIÓN

Los nodos de tipo 1 en interfase localizan fundamentalmente en la zona ecuatorial y depende de la quinasa DYRK (Dual-specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated Kinase) Pom1 (196, 197). Pom1 establece impone un punto adicional de regulación del sitio de división puesto ya que en su ausencia Mid1 se extiende hacia el polo, lo que implica que el CAR no sea capaz de ensamblarse correctamente en la zona media (196, 197). De esta forma, la localización bipolar de Pom1 define la localización de los nodos en la zona media de la célula. La inhibición de Wee1 incrementa la actividad de la CDK Cdc2 permitiendo el inicio de la mitosis (198, 199). Al final de la fase G2 la polo quinasa Plo1 fosforila a Mid1 en el núcleo favoreciendo su exporte y activándose en el citoplasma. Estos cambios en el estatus de Mid1 son necesarios para la maduración de los nodos precursores del anillo además del reclutamiento de otras proteínas (200, 201). A su vez, la posición del núcleo viene determinada por los microtúbulos interfásicos, que generan fuerzas de empuje derivadas de su propia dinámica de polimerización. Dichas fuerzas se transmiten hacia la envuelta nuclear y mantienen el núcleo en el centro celular (76, 202) (**Figura 13**).



**Figura 13.**  
**Posicionamiento del**

**plano de división y dinámica de llegada de los nodos tipo 1 y tipo 2.** En interfase Mid1 presenta dos localizaciones diferenciales, una nuclear y una citoplasmática asociada a Cdr2. Una vez iniciada la mitosis la fracción nuclear de Mid1 se activa y trasloca al citoplasma, promoviendo la maduración de los nodos corticales hasta que el CAR finaliza su ensamblado. Por otro lado, Pom1 impide que los nodos de Cdr2 localicen fuera de la zona ecuatorial gracias a la formación de un gradiente que comienza en los polos. Adaptado de (183).

## INTRODUCCIÓN

A diferencia de *S. pombe*, *S. japonicus* no ensambla el CAR hasta que los cromosomas no han segregado completamente por lo que no existe relación entre la posición del núcleo y la selección del sitio de división (**Figura 3**) (9, 135). En *S. japonicus* Mid1 y Cdr2 regulan la formación de los nodos precursores del anillo reclutando a la proteína de tipo F-BAR Cdc15 a la zona media, sirviendo de anclaje principal para los componentes del CAR (135). Cdc15 se trata de una proteína esencial fundadora de la familia PCH (Pombe Cdc15 Homology), que presenta en su extremo amino terminal un dominio F-BAR de unión a la membrana plasmática, y en su extremo carboxilo un dominio SH3 de unión a otras proteínas. Las proteínas de tipo PCH sirven como nexo de unión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, participando en distintos procesos celulares como la citocinesis (203-205).

Contrariamente a *S. pombe*, en *S. japonicus* Cdc15 también puede localizarse en la zona media en ausencia de Mid1 debido a la existencia de un mecanismo de señalización mediado por Pom1 (9, 16, 135). Además, Mid1 se encuentra en el citoplasma a diferencia de *S. pombe*, lo que permite la localización de los nodos de citocinesis en células interfásicas (135).

### 1.5.2 Maduración de los precursores del CAR

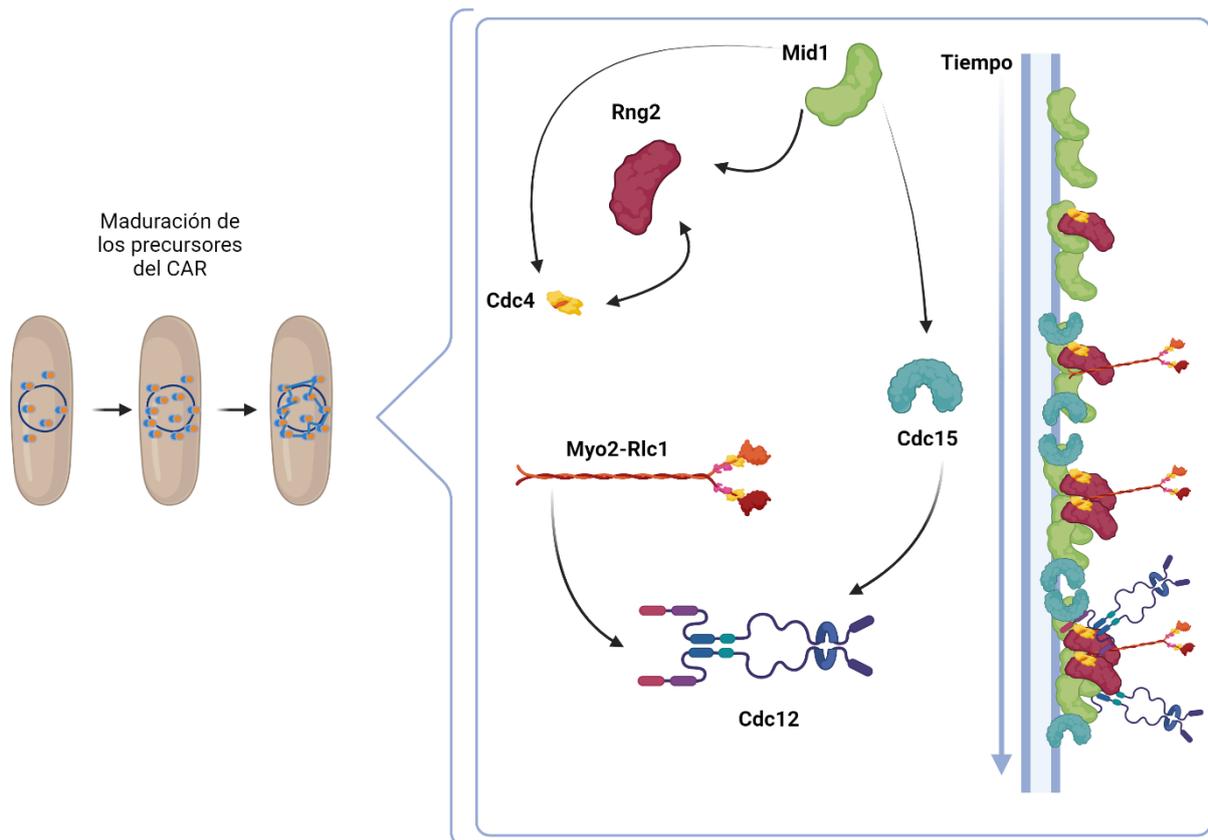
El proceso de ensamblaje del CAR comienza con la maduración de los nodos durante la entrada en mitosis, considerándose la separación de los SPBs como referencia del inicio de la mitosis en *S. pombe* (165). La polo quinasa Plo1 fosforila a Mid1 en su secuencia de exporte nuclear (NES) situada en su extremo amino terminal, desencadenando su exportación masiva del núcleo (200). Una vez en el citoplasma, Mid1 se une a la membrana plasmática sirviendo de plataforma de anclaje de diversos componentes esenciales para la formación del CAR (206). Además, Mid1 también es fosforilada en su extremo amino por la PAK quinasa de polaridad Pak1, cuya activación depende de Cdc42. Dicha fosforilación promueve la asociación de Mid1 con los nodos precursores del CAR permitiendo el correcto ensamblaje del CAR (186). Durante esta etapa Cdr2 se disocia gradualmente de los nodos en maduración y pasa a tener una localización citoplasmática gracias a su interacción con Rad24 (proteína de tipo 14-3-3 con capacidad de secuestrar a otras proteínas), siendo este proceso resultado de su fosforilación previa por la quinasa Sid2 perteneciente a la ruta de inicio de la septación (SIN) (207).

Mid1 recluta en primer lugar a Rng2, ortólogo esencial de la proteína IQGAP1 de mamíferos. Dicha interacción se establece entre el dominio amino terminal de Mid1, p, y el extremo carboxilo terminal de Rng2 precedido de la fosforilación por Plo1 y Pak1 (208, 209). Simultáneamente se reclutan Cdc4, la cadena ligera esencial de la miosina II, asociándose con los motivos IQ de Rng2, de manera que Cdc4 y Rng2 se pueden asociándose y disociándose de Mid1 (15, 157, 162, 210). La llegada de los complejos Rng2-Cdc4 a los nodos desencadena la activación de un bucle de retroalimentación

## INTRODUCCIÓN

positiva que favorece la acumulación de más moléculas de Mid1 en la zona ecuatorial durante la mitosis (15). El ensamblaje de este complejo promueve el reclutamiento de la cadena pesada de la miosina II Myo2 y de Rlc1, su cadena ligera reguladora (15, 160, 163).

Rng2 y Myo2 constituyen módulo funcional I implicado en la maduración de los nodos. 5 minutos antes de la separación de los SPBs, Mid1 recluta directamente a Cdc15 a los nodos, constituyéndose el módulo funcional II (15). La localización y función de Cdc15 son reguladas por fosforilación dependiente del ciclo celular. Así, su hiperfosforilación durante la interfase induce un cambio conformacional inactivándola, mientras que durante la mitosis favorece la transición hacia una conformación abierta que favorece su oligomerización y asociación con la membrana a través del dominio F-BAR (205). La fosforilación de Cdc15 es regulada espacialmente y depende de Pom1, inhibiendo su unión a la membrana plasmática en los polos celulares. Por el contrario, Cdc15 es parcialmente desfosforilada por acción de la fosfatasa Clp1 (serín treonín fosfatasa perteneciente a la familia de Cdc14), que a su vez interacciona con Mid1 (211) (Figura 14).



**Figura 14. Maduración de los precursores del CAR.** Una vez Mid1 llega a los nodos precursores “estos maduran para formar los nodos citocinéticos debido al reclutamiento de diversas proteínas. En primer lugar, Mid1 recluta a Cdc4, y Rng2 y, ésta a su vez al complejo Myo2-Rlc1. Posteriormente, Mid1 recluta a Cdc15 que, a su vez, junto con Myo2 reclutarán a la formina Cdc12 para nuclear los filamentos de actina del CAR. Adaptado de (15) y (18).

### 1.5.3 Formación del CAR

Instantes antes de entrar en metafase, tanto Cdc15 como el complejo Rng2-miosina II (Myo2) reclutan a la formina esencial Cdc12 (15, 212) (**Figura 14**). El ensamblaje de los filamentos de actina del CAR comienza 2 minutos después del inicio de la mitosis (118, 213). Cdc12 se encarga de la nucleación de los monómeros de actina mientras que la profilina Cdc3 se une a los dominios ricos en prolina de Cdc12 (FH1/2) participando en la elongación de estos filamentos lo que permite su anclaje a los nodos (203, 214, 215). Por otro lado, la tropomiosina Cdc8 también se une a los filamentos de actina regulando la actividad de Cdc12 (216). Paralelamente, la formina For3 es reclutada a la zona de división mediante un mecanismo dependiente de Cdc15, y ensambla cables de actina unidos a la tropomiosina desacetilada sirviendo como refuerzo para el reclutamiento de Cdc12 a la zona de división (117, 217 2015 2015). Sin embargo, la localización de Cdc12 no se restringe exclusivamente a la zona ecuatorial localizando también en menor medida en el citoplasma de manera desorganizada (218). Durante la mitosis la parte de Cdc12 no ecuatorial también puede nuclear cables de actina que posteriormente son transportados hasta el CAR por medio de las miosinas Myo2 y Myo51. Sin embargo, estos cables no son tan eficientes para el ensamblaje del CAR (117, 219).

La actividad de Cdc12 es regulada por fosforilación ciclo-dependiente, hiperfosforilándose durante la mitosis (220). Durante la mitosis Sid2, la quinasa terminal de la ruta SIN, fosforila a Cdc12 en cuatro residuos de serina situados en su extremo C-terminal, bloqueando la capacidad de la formina de agregarse. Dichas fosforilaciones favorecen la nucleación de actina y el ensamblaje del CAR (220). Paralelamente, Cdc2 fosforila a Cdc12 en seis residuos de su extremo N-terminal, inhibiendo su interacción con el dominio F-BAR de Cdc15 y evitando de esta forma el ensamblaje prematuro del CAR (221).

En *S. pombe* el ensamblaje de cables de actina empieza después del reclutamiento de la miosina II hacia la zona media al inicio de la mitosis (**Figura 3**). En cambio, en *S. japonicus* los filamentos de actina no son nucleados hasta el final de la mitosis, tras la ruptura parcial de la envuelta nuclear (135). Aunque se sabe que el núcleo anafásico regula espacialmente la nucleación de actina, se desconoce si la señal que promueve su polimerización procede del compartimento nuclear o de una estructura asociada al núcleo (135).

Una vez generada la red de filamentos de F-actina se produce la coalescencia de los nodos, que se compactan rápidamente y maduran, formándose un anillo contráctil gracias a la acción de la miosina de tipo II Myo2. Existen dos modelos principales que explican el proceso de ensamblaje del CAR en *S. pombe* (**Figura 15**).

#### 1.5.3.1 Modelo SCPR (Búsqueda, Captura, empuje y liberación)

## INTRODUCCIÓN

La teoría de los "múltiples nodos" o SCPR (*Search, Capture, Pull, and Release*), sostiene que la formina Cdc12 presente en los nodos maduros promueve la nucleación de filamentos de actina orientándose de forma aleatoria en la zona media. Dichos filamentos de actina serían capturados por la miosina II de los nodos adyacentes. La miosina II de un nodo se desplaza a lo largo del filamento que ha capturado hasta su extremo barbado, el cual está anclado al primer nodo a través de Cdc12, generando fuerzas que permiten el acercamiento de ambos nodos dando como resultado la compactación gradual de la red de filamentos de actina y nodos en un cinturón que constituye el CAR (18, 222) (**Figura 15**).

La fuerza generada por Myo2 sobre los filamentos de actina unidos a Cdc12 provoca la inhibición mecánica reversible de la formina, necesaria para la adecuada condensación de los nodos precursores del CAR, permitiendo así una citocinesis eficaz (223). Las simulaciones realizadas sobre este modelo muestran que la interacción permanente entre los nodos conduciría a la formación de aglomerados en lugar de al ensamblaje de un anillo en la zona ecuatorial siendo esencial que su interacción sea transitoria, consiguiéndose mediante diversos mecanismos. Entre ellos se encuentra el mediado por la cofilina Adf1, que corta de forma aleatoria y libera los filamentos próximos a la miosina II (103, 222). Rng2 también se incluye en este modelo, al contribuir a la condensación de los nodos empaquetando filamentos de actina (224). A su vez, las proteínas Ain1 (a-actinina) y Fim1 (fimbrina) localizan en la zona media y son críticas para el ensamblaje del CAR cooperando con Myo2 para estabilizar los filamentos de actina (225).

La regulación de Myo2 constituye un punto de control esencial durante la etapa de compactación de nodos. La actividad motora de Myo2 es regulada positivamente por la chaperona Rng3 (226), y también se encuentra sometida a regulación por fosforilación. Adicionalmente, la miosina de tipo V Myo51 contribuye a la fusión de los nodos aunque de manera más lenta que Myo2, y su actividad es esencial cuando Myo2 no se une correctamente a la actina (153).

### 1.5.3.2 Modelo de cable líder

Los filamentos de actina se ensamblan inicialmente a partir de un punto localizado en el centro de la célula donde se acumula Cdc12 junto con Cdc15. Desde este punto se extienden dos cables en direcciones opuestas alrededor de la zona media hasta que llegan a constituir el CAR (227-229). Sin embargo, posteriormente se demostró que Cdc12 no se localiza en un único punto denso, sino que se localiza en los nodos precursores del anillo (106, 218), y promueve el ensamblaje del CAR de acuerdo con el modelo SCPR (222). A pesar de que el modelo SCPR es el que mejor explica el ensamblaje del anillo en células silvestres, el mecanismo del cable líder podría participar en la formación del CAR en aquellas células que no forman nodos, como en células *mid1Δ*

## INTRODUCCIÓN

(230), o en aquellas en las que la ruta SCPR no es capaz de funcionar adecuadamente, como en protoplastos o en mutantes “orb” (18, 231) (**Figura 15**).

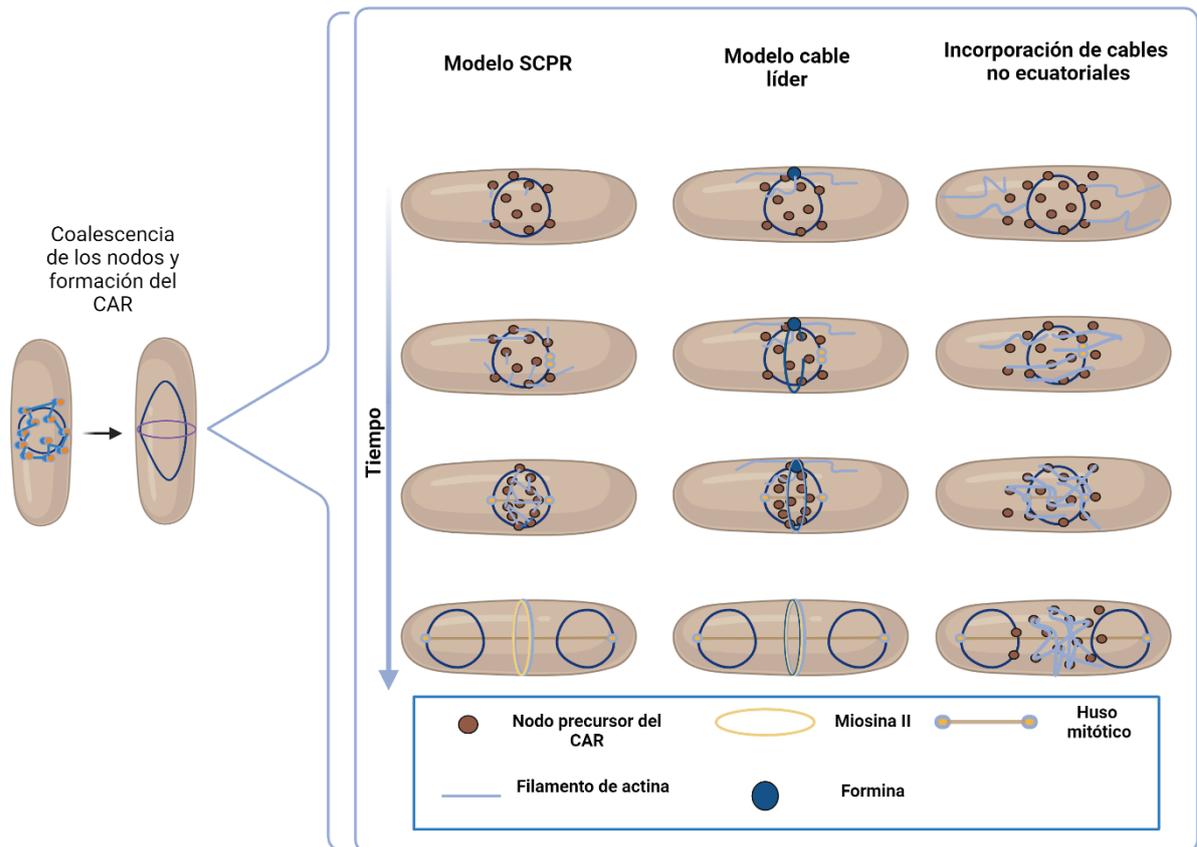
El ensamblaje del CAR no puede producirse mediante la ruta canónica a partir de los nodos precursores del anillo en ausencia de Mid1. En estas células la formación del CAR sigue el modelo del cable líder, y es totalmente dependiente de la señalización por la ruta SIN y de la proteína F-BAR Cdc15 (230, 232).

### 1.5.3.2.1 La ruta SIN (Septation Initiation Network)

La ruta de oclusión de los polos celulares es particularmente relevante ya que evita que el ensamblaje del CAR se produzca en un lugar diferente al plano de división (232). La ruta SIN, ortóloga a la ruta MEN (*Mitotic Exit Network*) de *S. cerevisiae* y a la ruta *Hippo* de metazoos, consiste en una ruta de trasducciones una de quinasas que se encuentran asociadas al SPB en su lado citoplasmático. Su función principal consiste en la coordinación de la constricción del CAR con la septación, aunque también presenta un papel relevante en el ensamblaje del CAR. Al inicio de la mitosis la ruta SIN se activa, y la quinasa terminal Sid2 se localiza en la zona ecuatorial para fosforilar a distintos sustratos entre los que se encuentra la fosfatasa Clp1. A su vez, Clp1 desfosforila a Cdc15 y promueve su transición hacia una conformación abierta, favoreciendo su asociación con Cdc12 (205, 211). Además, la propia Cdc12 es fosforilada directamente por Sid2 en el motivo de oligomerización, evitando que la formina forme agregados, y promoviendo su actividad nucleadora de cables y el ensamblaje del CAR (220).

## INTRODUCCIÓN

Los cables de actina no ecuatoriales nucleados por Cdc12 y For3 pueden ser transportados al sitio de división e incorporarse directamente al CAR (218). Este mecanismo coopera con la vía SCPR, ya que no es lo suficientemente robusto para ensamblar un anillo en su ausencia, aunque los cables no ecuatoriales que son transportados hasta la zona de división favorecen la compactación y el adecuado funcionamiento del CAR (18, 117, 219) (**Figura 15**).



**Figura 15. Modelos de ensamblaje del CAR.** En el modelo SCPR la formina Cdc12 presente en los nodos citocinéticos es la encargada de nuclear los filamentos de actina que eventualmente serán capturados por la miosina presente en otros nodos generando una fuerza que permitirá la coalescencia progresiva de los mismos. En cuanto al modelo de cable líder, los filamentos de actina se nuclean a partir de un único punto donde localiza Cdc12 y desde ahí se formará un anillo al cual se unirá la miosina. Finalmente, el modelo de incorporación de cables no ecuatoriales colabora con el modelo SCPR aunque por sí solo es incapaz de formar el CAR. Adaptado de (12) y (18).

### 1.5.4. Maduración del CAR

Pasados entre 15 y 20 minutos tras la separación del SPB, cuando el CAR está completamente ensamblado, se produce la maduración del CAR (119). Aquí, el CAR se compone de aproximadamente 150 dímeros de Cdc12, 3000 de Myo2 y unos 2000 filamentos de actina (233, 234). El diámetro del CAR permanece constante y sus componentes se renuevan continuamente (119, 211). En este sentido, mutantes de Cdc12 que cuya capacidad nucleadora de actina se ve reducida, también presentan un

## INTRODUCCIÓN

menor recambio de estos filamentos (213). Además, Clp1 es reclutada por Mid1 a la zona media regulando también la dinámica del CAR (211).

En esta etapa llegan al CAR proteínas como Myp2 o Imp2 debido a la desaparición paulatina de Mid1. Gracias a los dominios F-BAR de Cdc15 e Imp2 también llegan en esta etapa proteínas como Pxl1 y la proteína con dominios C2 Fic1 (235). La proteína encargada del anclaje del anillo a la membrana una vez ha salido Mid1 es Cdc15. En este momento Myp2 se acumula en el CAR y actúa como uno de los principales motores de la constricción del anillo (153). Myp2 recluta hacia la zona de división a Mto1, que regula el ensamblaje del MTOC post-anafásico y que recientemente se ha demostrado que participa durante la citocinesis (86, 236). Además, Imp2 recluta a Rgf3, un GEF de la Rho GTPasa Rho1 que es esencial para la síntesis de glucano y a Pxl1 la cual coopera con Bgs1 en el anclaje del CAR a la membrana además de en la formación del surco de división al inicio de la septación. Por otro lado, Rga7 participa en la translocación de la glucán-sintasa Bgs4 desde el Golgi hasta la membrana plasmática de la zona media (183). Recientemente se ha descrito que la formación del septo ocurre durante la anafase temprana de forma independiente a la finalización de la mitosis, es decir, durante la etapa de maduración del CAR. (237).

### 1.5.5. Constricción del CAR

La constricción del CAR y posterior síntesis del septo de división finalmente conducen a la separación celular siendo un proceso estrictamente controlado a nivel espacio-temporal con la salida de mitosis, siendo la ruta SIN la encargada de regular estos procesos en *S. pombe* (238). La mayor parte de las proteínas que conforman esta ruta son esenciales, y los mutantes que portan alelos hipomorfos de sus componentes suelen formar anillos descentrados que terminan desensamblándose incapaces de iniciar la síntesis del septo de división, presentando células alargadas y multinucleadas, dando lugar a un fenotipo conocido como fenotipo SIN (239).

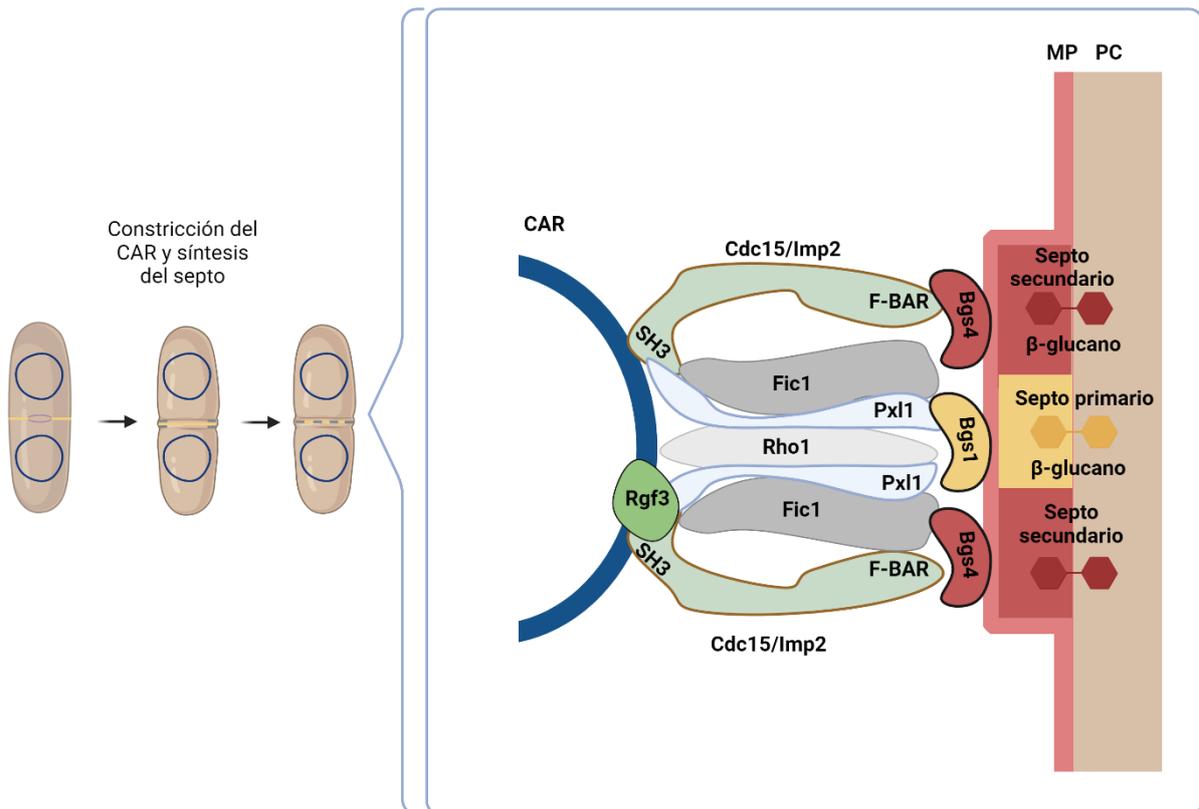
Durante esta etapa disminuye la concentración de numerosas proteínas en el CAR como Ain1, Cdc15 o Rng2, proporcionalmente al diámetro celular (234). La constricción del anillo depende principalmente de Myp2, sin embargo, el papel de Myo2 también resulta esencial en esta etapa. Aunque Myo51 no es suficiente para promover la constricción del CAR por sí misma, actúa como refuerzo de la actividad de Myo2 y Myp2 cuando su actividad se encuentra comprometida (153, 231, 240). Además, los factores que facilitan la actividad motora de las miosinas, como Rng3 y Cdc8, resultan fundamentales para que se produzca una correcta constricción (231). Por otro lado, la cofilina participa cortando filamentos de actina del anillo de forma estocástica, de manera que el CAR se va desensamblando a la vez que se contrae (183, 241). Durante la fase de constricción Cdc12 localiza alrededor del anillo y monitoriza la tensión generada (240). Sin embargo, la fuerza producida por las miosinas durante la contracción del CAR no es suficiente para superar la presión de turgencia que existe en

*S. pombe* para iniciar la formación del surco de división siendo necesario que la formación del septo de división se produzca paralelamente a la constricción del CAR, cuyo inicio viene determinado por la actividad de la ruta SIN (242, 243).

### 1.5.6 Síntesis del septo

En la última etapa de la citocinesis se forma el septo de división seguido de la deposición de nueva membrana plasmática, constituyendo la barrera física que separará a las dos células hijas, estando este proceso íntegramente coordinado con la constricción del CAR. El septo de división es una estructura formada por tres capas, el septo primario flanqueado por dos septos secundarios (244, 245). Bgs1 se encarga de la síntesis del  $\beta$ -glucano lineal que es el componente fundamental del septo primario (246). Por otro lado, Ags1 y Bgs4 se encargan de la síntesis del septo secundario (247, 248) (**Figura 16**). Todo este proceso se encuentra coordinado por la tensión producida por la contracción del CAR, lo que indica que la actividad Bgs1 pueda estar regulada por alguno de los elementos que conforman el CAR (243, 249). En este sentido, el mutante hipomorfo *cps1-191* es incapaz de anclar correctamente el CAR a la membrana por lo que no puede contraerse de contraerse, lo que sugiere que la actividad de Bgs1 es esencial para la contracción y estabilidad del CAR (250-252).

El CAR no tiene suficiente fuerza como para poder oponerse a la presión de turgencia y separar las células hijas, de tal manera que un posible modelo sugiere que tanto el CAR como el septo ejercen la fuerza necesaria para la formación del surco de división (242). Pxl1 es una de las proteínas que participan en el anclaje del CAR a la membrana y que, junto con Bgs1, promueven la síntesis del septo durante la constricción y separación de las células hijas (253). Rho1 es capaz de aliviar los defectos de diferentes mutantes de la ruta SIN (254). En este sentido, diversos trabajos sugieren que la ruta SIN participa en la activación de Rho1 durante la división celular, activando a su vez a las glucán-sintasas conectando ambos procesos (8) (**Figura 16**). Por otro lado, Cdc15 a través de su dominio SH3 es capaz de reclutar a Pxl1 y Rgf3 las cuales colaboran con Bgs1 para la síntesis del septo, lo que refuerza la interconexión del CAR con este proceso (235, 251, 255) (**Figura 16**).



**Figura 16. Constricción del CAR y síntesis del septo.** La formación del septo de división se encuentra perfectamente coordinada con el cierre del CAR. Este septo está formado por una pared de  $\beta$ -glucano lineal sintetizada por Bgs1 denominada septo primario. Sobre éste se van acumulando sucesivas capas de  $\beta$ -glucano ramificado sintetizado por Bgs4 conformando el septo secundario. Por otra parte, en el CAR localizan Cdc15 e Imp2 que reclutan a Bgs1 y mantienen estable la localización de Fic1, Pxl1 y Rgf3, la cual se encargará de activar a Rho1 promoviendo la activación de Bgs1 y Bgs4 y, por tanto, la síntesis del septo. Todas estas proteínas en conjunto anclan al CAR a la membrana plasmática. Adaptado de (8).

La proteína F-BAR Rga7 se ha descrito como importante para la localización de Bgs4 en el sitio de división de Bgs4 (256). Así, la síntesis del septo es esencial para la deposición de la membrana plasmática y la invaginación del surco de división, mientras que el CAR es necesario para coordinar espacio-temporalmente la síntesis del septo, debido a su alta sensibilidad a los estímulos mecánicos generados por el CAR durante la constricción (243, 249). Sin embargo, una vez que la síntesis del septo ha avanzado, la contracción del CAR no impide que éste complete su formación, sin embargo, la velocidad del proceso se ve ralentizada de forma considerable (242). Pese a que se conoce que la contracción del CAR y posterior síntesis del septo son procesos interconectados, todavía se desconocen los mecanismos moleculares precisos que regulan coordinadamente ambos procesos y la citocinesis en *S. pombe*.

## 1.5.7. Separación celular

La separación celular constituye la etapa más crítica del ciclo celular, ya que de ella depende la integridad y mantenimiento de las nuevas células hijas. En metazoos este proceso se denomina abscisión y requiere la participación de los microtúbulos y de un complejo multiproteico denominado GTD (*Endosomal Sorting complex Required for Transport*). En los hongos dimórficos y filamentosos no se produce separación celular, de forma que al finalizar cada ciclo de división se sintetiza un septo que forma y determina los diferentes compartimentos que formarán la hifa (8).

Tras finalizar la septación, comienza la disolución del septo primario. Este paso no es esencial para la viabilidad celular ya que mutantes implicados en este proceso presentan células multiseptadas capaces de crecer (245). Para la correcta separación celular, debe formarse en primer lugar un anillo de septinas que se divide en dos a medida que el septo se va formando (257, 258) que localiza al exocisto permitiendo la secreción localizada de enzimas hidrolíticas implicadas en la disolución del septo primario (259, 260).

La separación de las células hijas comienza con la secreción de la  $\alpha$ -glucanasa Agn1, la cual localiza en el septo durante la septación, que digiere el septo primario (259, 261). La  $\beta$ -glucanasa Eng1 degrada el  $\beta$ -glucano lineal actuando cuando se ha digerido la pared lateral finalizando la disolución del septo primario. Por otro lado, el septo secundario se separa y curva gradualmente debido a la presión de turgencia permitiendo la formación del polo nuevo (262-264). La falta de Agn1 impide la disolución del septo primario (259, 261). Sin embargo, la sobreexpresión de Eng1 no implica una degradación del septo primario más rápida (260) lo que sugiere que Eng1 no se activa completamente mientras el septo primario siga presente. La expresión conjunta de estas glucanasas es mediada por el factor transcripcional Ace2 (265, 266). Además, las GTPasas Rho3 y Rho4 también participan en la regulación de Agn1 y Eng1 (245). Por un lado, Rho3 se encarga de la secreción general en la célula (267) mientras que Rho4 participa en la secreción específica de ambas glucanasas (268, 269).

## 2. Señalización y respuesta frente a estímulos nutricionales

El ambiente influye de manera crítica sobre el desarrollo de los procesos biológicos en los seres vivos. Por ello, la evolución ha dotado a las células con mecanismos capaces de detectar cambios en el ambiente extracelular y desencadenar la consiguiente respuesta adaptativa. Estas respuestas requieren una red compleja de detección y transducción de señales que conducen a la regulación del crecimiento y la proliferación celular, así como a distintos ajustes en diferentes programas de expresión génica, siendo especialmente relevantes cuando los organismos se exponen a condiciones ambientales adversas, frente a las han de adaptarse para poder sobrevivir (6, 270, 271).

La falta repentina o la disminución gradual de un nutriente normalmente utilizado por las células como fuente de energía se puede considerar una condición de estrés. Los nutrientes que pueden llegar a faltar pueden ser muy distintos (glucosa, nitrógeno, fósforo, azufre por ejemplo). Además, tendremos diferentes respuestas dependiendo del mecanismo de señalización del nutriente en cuestión, de la interconexión entre diferentes mecanismos de respuesta sobre el mismo nutriente, de si las células que sufren el estrés están organizadas en tejidos u órganos o son cultivos unicelulares y, en ese caso, si son células haploides, de sexos distintos o no, o diploides (272).

La glucosa es una fuente de energía común para las células. Su metabolismo comienza con la glucólisis en la que se produce piruvato. Durante la fermentación, el piruvato se convierte en ácidos orgánicos, gases o etanol. Alternativamente, el piruvato puede metabolizarse en la respiración a través del ciclo de Krebs. La fermentación y la respiración son vías metabólicas que, en cierta manera, se pueden considerar antagónicas, y que son moduladas de forma precisa en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas (273). En medio rico, *S. cerevisiae* fermenta la glucosa liberando etanol al medio ("Efecto Crabtree") (274). Cuando la glucosa es limitante, las células transitan del crecimiento fermentativo al respiratorio consumiendo el etanol producido (cambio diaúxico) (275). Por su parte, *S. pombe* no puede utilizar el etanol como única fuente de carbono al carecer de las enzimas del ciclo del glioxilato necesarias para el cambio diaúxico (276). Por esta razón, la privación total de glucosa es un estrés nutricional muy drástico para *S. pombe* que desencadena la entrada en un estado de quiescencia (21). *S. pombe* tampoco puede crecer en medios cuya única fuente de carbono sea el glicerol, aunque es capaz de iniciar el crecimiento si esos medios se suplementan con concentraciones mínimas de glucosa (277).

La correcta regulación de la transición de un metabolismo fermentativo a respiratorio es crucial para que los requerimientos energéticos de la célula queden cubiertos (278). Este cambio adaptativo depende de las condiciones fisiológicas o nutricionales, y de rutas que actúan como sensores nutricionales como la ruta AMPc-PKA (Adenosín monofosfato cíclico-proteína kinasa A) y diversas rutas de proteínas

# INTRODUCCIÓN

quinasas activadas por mitógenos o MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*). A través de la fosforilación de diferentes dianas estas vías regulan numerosos procesos, destacando su papel durante el control de la expresión de génica (279, 280).

## 2.1. La ruta AMPc-PKA

La ruta AMPc-PKA es la principal encargada de la señalización de la presencia de glucosa en esta levadura. De hecho, cepas con una actividad reducida en la misma imitan el comportamiento de células crecidas en condiciones de limitación de glucosa. La ruta AMPc-PKA presenta una elevada homología con sus ortólogas en mamíferos y levaduras (281), pero no ocurre así en todos los organismos (282).

### 2.1.1 Organización de la ruta AMPc-PKA

Los componentes de la ruta AMPc-PKA se organiza en tres grandes grupos proteicos que se organizan de forma modular y que se encuentran altamente conservados, éstos son los siguientes:

#### 2.1.1.1. Sensores

La señalización de glucosa en la ruta AMPc-PKA comienza con la unión de las moléculas presentes en el medio a una proteína integral con 7 hélices transmembrana (7TM). Al tratarse de un receptor acoplado a proteína G (GPCR), interacciona en su región intracelular con una proteína G heterotrimérica compuesta por subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ , respectivamente (281). La unión del ligando al receptor provoca el intercambio de GDP (guanosín difosfato) por GTP (guanosín trifosfato) en la subunidad  $G\alpha$ . La activación de la misma determina un cambio conformacional y su disociación del dímero  $G\beta\gamma$ , siendo capaz de unirse a la adenilato ciclasa (AC) activándola (283). Esta enzima ejerce su función catalizando la conversión de ATP en AMPc (adenosín monofosfato cíclico) (283).

#### 2.1.1.2. La proteína quinasa A

La PKA es una holoenzima tetramérica que consta de un dímero de subunidad reguladora (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad R es el receptor de cAMP y compartimenta las señales de AMPc mediante la unión a proteínas de anclaje de quinasa A (AKAP) expresadas específicamente en células y tejidos (284).

# INTRODUCCIÓN

El dogma actual dice que en presencia de AMPc, la PKA se disocia en un dímero de subunidad R y dos subunidades C que están libres para fosforilar sustratos relevantes en el citosol y el núcleo. La liberación de la subunidad C ha planteado la cuestión de cómo se mantiene la especificidad de la vía de señalización de AMPc y PKA cuando la subunidad C ya no está unida al complejo subunidad R-AKAP (284). Diversas evidencias sugieren un papel regulador de la ruta AMPc-PKA al dirigir las subunidades C a varias proteínas de unión a subunidades C en el citosol y el núcleo. Gracias a la identificación reciente de motivos e isoformas han proporcionado nuevos conocimientos sobre cómo la PKA a nivel de la subunidad C puede actuar de una manera altamente específica de isoformas (284).

## 2.1.1.3 Efectores

La activación de la PKA por la unión de AMPc en dos sitios en cada subunidad reguladora inicia la liberación de las subunidades catalíticas, activando así las subunidades catalíticas. Existen fundamentalmente dos modos mecanismos de regulación en función del sustrato a fosforilar.

Por un lado, ocurre la fosforilación citoplasmática de diversas dianas cuya función depende del tipo celular y organismo y, por otro, la translocación de la propia subunidad catalítica al núcleo donde ejerce una regulación transcripcional (281), fundamentalmente a través de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB).

## 2.1.2 La ruta AMPc-PKA en *S. pombe*

La ruta AMPc-PKA es la principal encargada de la señalización de la presencia de glucosa en esta levadura. De hecho, cepas con una actividad reducida en la misma imitan el comportamiento de células crecidas en condiciones de limitación de glucosa (281). Además, gracias a su papel como sensor de glucosa, esta ruta es la principal encargada de la correcta regulación de la transición de un metabolismo fermentativo a respiratorio es crucial para que los requerimientos energéticos de la célula queden cubiertos (278). Los principales elementos de esta ruta se describen a continuación (**Figura 17**).

### 2.1.2.1. Sensores

La ruta comienza con la detección de la glucosa extracelular se hace a través del receptor 7tm denominado Git3 el cual interacciona en su región intracelular con Gpa2,

## INTRODUCCIÓN

Git5 y Git11, subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ , de la proteína G respectivamente (281). La unión del ligando al receptor Git3 provoca el intercambio de GDP (guanósín difosfato) por GTP (guanósín trifosfato) en la subunidad  $G\alpha$ . La activación de la misma determina un cambio conformacional y su disociación del dímero  $G\beta\gamma$ , siendo capaz de unirse al extremo N-terminal de la adenilato ciclasa (AC) Cyr1 activándola. Esta enzima ejerce su función catalizando la conversión de ATP en AMPc (adenosín monofosfato cíclico) (283) (**Figura 17**).

### 2.1.2.2. La PKA en *S. pombe*

El aumento transitorio de AMPc desencadena la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc o proteína quinasa A (285) al actuar como segundo mensajero. La PKA es un heterotetrámero constituido por dos subunidades catalíticas codificadas por el gen *pka1+*, perteneciente a la familia AGC de serín/treonín quinasas, y dos subunidades reguladoras codificadas por *cgs1+*, y se activa en presencia de AMPc tras la unión de este a las subunidades reguladoras lo que provoca su disociación de las subunidades catalíticas (1). Además, *pka1* es activada por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos Pdk1 en un residuo altamente conservado de su bucle de activación (286). En *S. pombe* Pka1 es fosforilada por Ksg1, ortóloga a PDK1, en el residuo de Thr356, siendo dicha modificación esencial para su actividad catalítica (287) (**Figura 17**).

### 2.1.2.3. Efectores

Una vez liberadas las subunidades catalíticas, éstas se encargan de fosforilar diferentes sustratos. En *S. pombe*, el principal sustrato fosforilado por *pka1* es el factor transcripcional Rst2. Rst2 es un factor transcripcional que presenta dos motivos de dedo de zinc tipo Cys2His2 (C2H2) en su extremo amino terminal que reconocen secuencias reguladoras que presentan motivos STREP («*Stress Response Element in S. pombe*») con secuencia CCCCTC (288-290). Pka1 fosforila a Rst2 en los residuos Ser139, Thr140, Thr141, y Thr253, lo que promueve su exclusión nuclear e inactivación (288, 289, 291).

Cuando el crecimiento se lleva a cabo en un medio rico en glucosa se produce la inhibición de la expresión de genes implicados en el metabolismo de glúcidos alternativos, el ciclo de Krebs, la ruta de las pentosas fosfato, la gluconeogénesis, la respiración, y las funciones mitocondriales (289); proceso conocido como Represión Catabólica por fuente de Carbono («*Carbon Catabolite Repression*») (292). En concreto, se ha descrito que la ruta PKA inhibe la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis como *fbp1+* (fructosa-1,6-bisfosfatasa), y en la diferenciación sexual (*ste11+*) a través de Rst2. Por otro lado, durante la privación de glucosa, Rst2 es capaz de activarse de forma independiente de PKA. Esta activación ocurriría en principio de

# INTRODUCCIÓN

forma específica en respuesta al déficit de glucosa, ya que no se ha observado en otras situaciones de estrés (oxidativo, osmótico, metales pesados) (289, 290). (Figura 17).

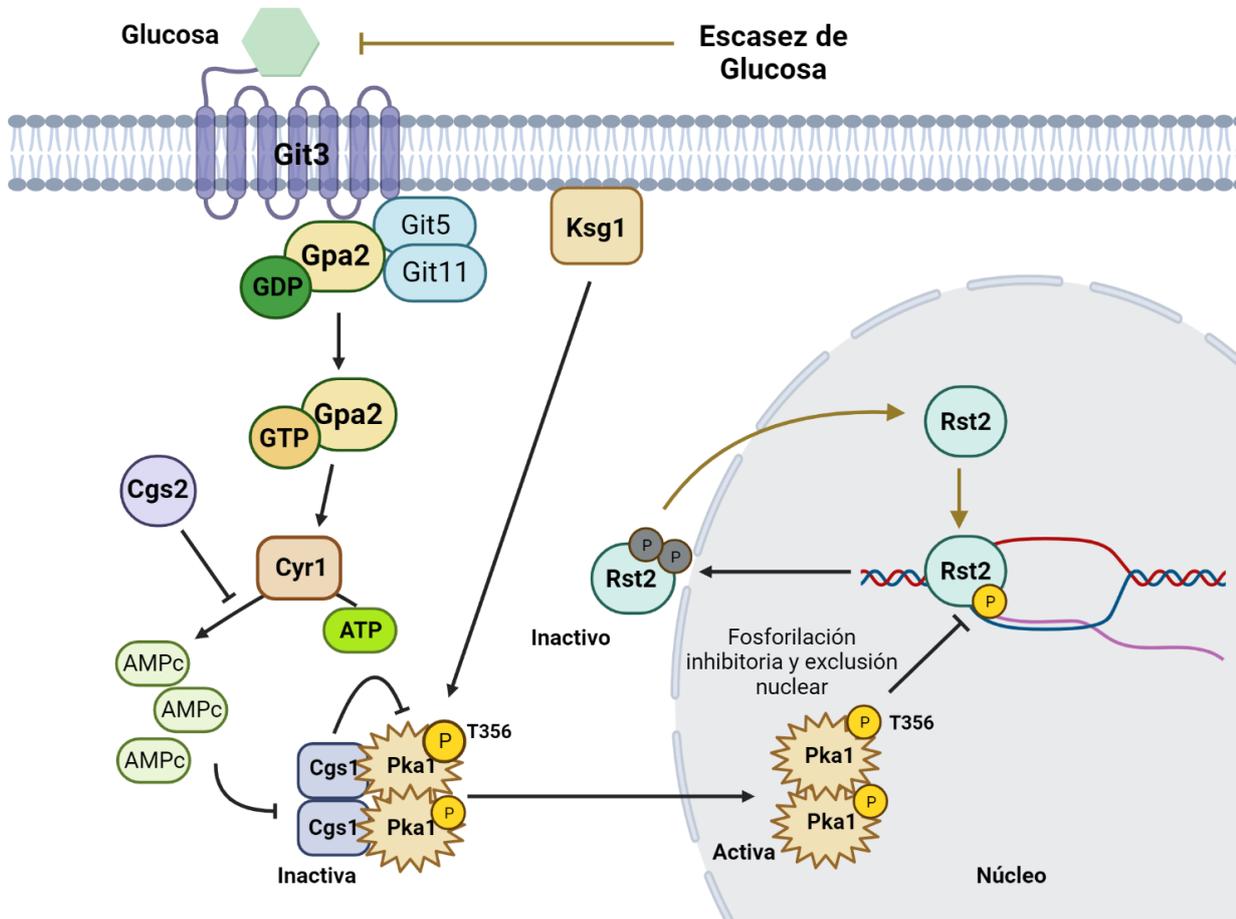


Figura 17. La ruta AMPc-PKA en *S. pombe*. Adaptado de (1).

## 2.2. Las rutas de MAPKs

Diversos estudios ponen de manifiesto la importancia de las rutas de señalización mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *Mitogen Activated Protein Kinases*) en la respuesta general frente al estrés. Se encuentran altamente conservadas en toda la línea evolutiva de eucariotas jugando un papel fundamental en la transducción de las señales generadas en el medio extracelular hasta el núcleo, dando lugar a cambios en la expresión génica (293, 294).

### 2.2.1 Sensores

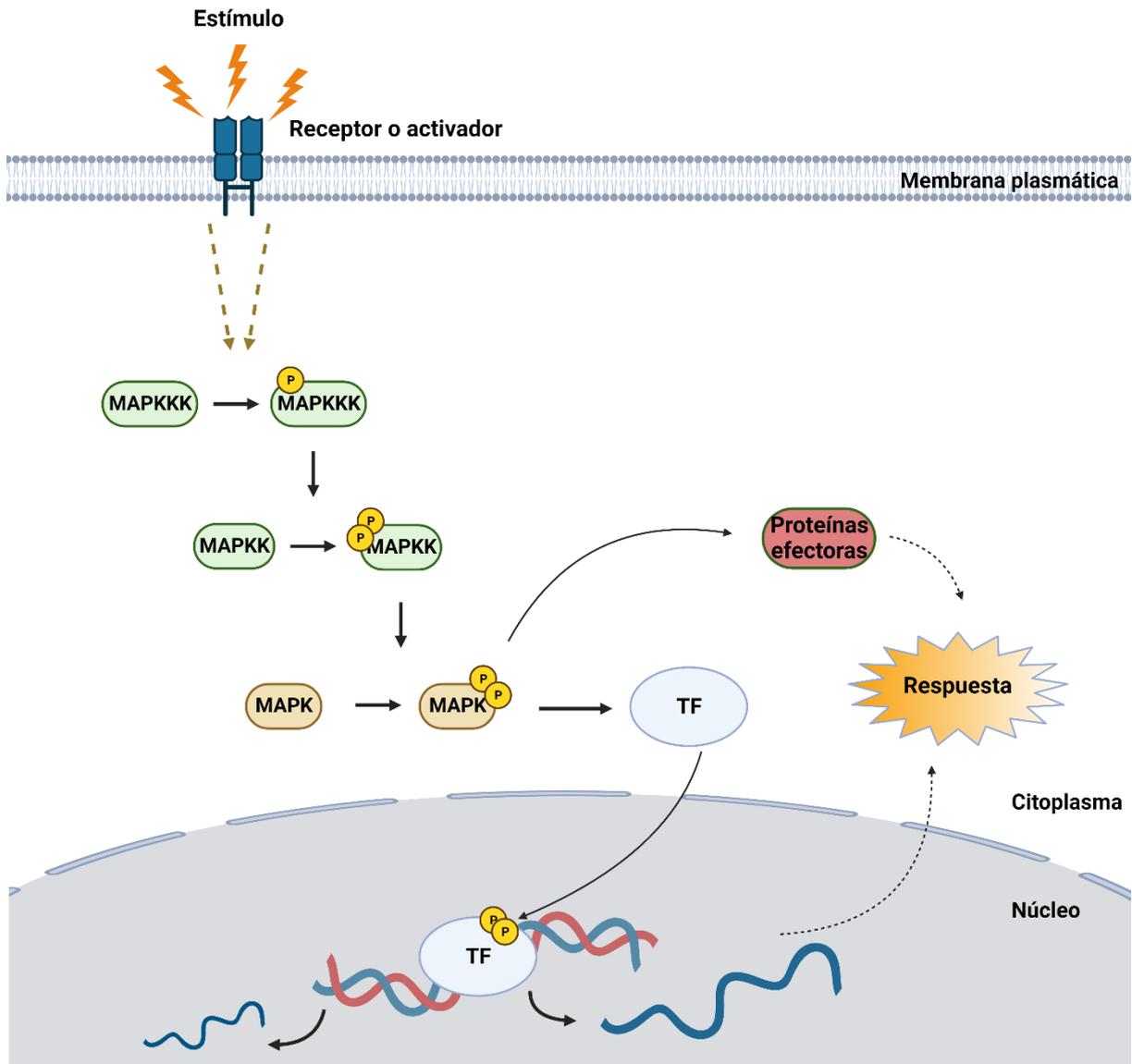
## INTRODUCCIÓN

Según del estímulo recibido los receptores de la señal pueden ser proteínas transmembranales acopladas a proteínas G, sistemas de regulación de dos componentes, receptores de tipo tirosina quinasa, o proteínas integrales de membrana. En las levaduras se han identificado todos los sensores anteriormente citados con excepción de los receptores del tipo tirosina quinasa (6).

### 2.2.2. Módulo de MAPKs

Se trata del módulo encargado de la transmisión de la señal conformado por un sistema de tres proteínas altamente conservadas cuya estructura básica es muy similar, y son activadas por fosforilación secuencial: la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), la MAPK quinasa (MAPKK) y la MAP quinasa (MAPK), siendo esta última el elemento central de la ruta. Dependiendo del estímulo, la MAPKKK es generalmente activada por fosforilación dependiente de proteínas como quinasas o GTPasas de las familias Ras y Rho, aunque también puede activarse por oligomerización o relocalización subcelular. Una vez activada, la MAPKKK fosforila a la MAPKK (295) en residuos de Ser o Thr conservados del bucle de activación. A continuación, la MAPKK fosforila a la MAPK en residuos de Thr y Tyr del motivo conservado TXY del bucle de activación (siendo el aminoácido X Gly o Glu), que tiene como consecuencia un cambio conformacional promoviendo su activación. Por último, la MAPK activa fosforila diversos sustratos en residuos de Ser o Thr seguidos de Pro (secuencia consenso SITP) (270) (**Figura 18**).

### 2.2.3. Reguladores de MAPKs



**Figura 18. Módulo de MAPKs y transducción de la señal.** Todas las rutas de MAPKs se componen de un receptor de señales extracelulares y un módulo de transmisión formado por tres proteínas quinasas (MAPKKK, MAPKK y MAPK) activadas por fosforilación secuencial. Una vez activada la MAPK central ésta fosforila a diferentes sustratos induciendo una reprogramación en la expresión génica permitiendo a las células adaptarse a las nuevas condiciones ambientales.

El principal elemento regulador de la actividad de las MAPKs es la fosforilación dual en residuos de Thr y Tyr de su bucle de activación, mediada por la MAPKK. Inicialmente se creía que la fosforilación en ambos residuos fosfoaceptores era un requisito indispensable para la activación catalítica de las MAPKs (296, 297), aunque estudios posteriores sugieren que cada uno de estos residuos por separado presentan cierta funcionalidad y especificidad (298).

Una de las principales características de la respuesta mediada por las rutas de MAPKs frente al estrés es su elevado grado de plasticidad y especificidad, el cual es

## INTRODUCCIÓN

determinado por diversos estímulos. El más importante es la interacción física secuencial entre los diferentes componentes de la cascada, aunque también existen proteínas adaptadoras que permiten la asociación de los tres componentes de la cascada en un módulo específico. También, la localización subcelular diferencial de los componentes de la ruta también modula su función, constituyendo otro mecanismo esencial de regulación de su actividad biológica (6, 299).

Además, una vez que las células se han adaptado a la nueva condición ambiental impuesta, la actividad de la MAPK debe atenuarse mediante la acción de reguladores negativos que modulan la intensidad y la duración de la señal (300). Los principales reguladores negativos son las fosfatasas de MAPKs (MAPKPs), que suelen presentar especificidad dual o desfosforilar específicamente residuos de Tyr (fosfatasas de tirosina), o de Ser y Thr (fosfatasas de serina y treonina) (301). Estas fosfatasas a su vez pueden estar siendo reguladas por los propios efectores de las MAPKs, como factores de transcripción o proteínas de unión a ARN (6) (**Figura 18**).

### 2.2.4. Efectores de MAPKs

Los principales efectores de las rutas de MAPKs suelen ser factores de transcripción que inducen diversos cambios en la expresión génica requeridos para responder frente al estímulo activador. De todas formas, las MAPKs poseen muchos otros efectores, entre los que se encuentran proteínas reguladoras del ciclo celular, chaperonas, proteínas de unión al ARN, proteínas del citoesqueleto, y una gran variedad de sustratos citoplasmáticos (6) (**Figura 18**).

#### 2.2.4.1 Las proteínas de unión a ARN

Las proteínas de unión a ARN (RBPs, "*RNA Binding Proteins*") constituyen una amplia familia de proteínas con diferentes funciones o actividades catalíticas entre las que se encuentran la RNasa III o la proteína de unión a colas de poliA Pabp ("*Poli-A Binding Protein*"). Estas proteínas se unen a moléculas de ARN, y normalmente localizan en el núcleo y citoplasma de células eucariotas. Están formadas por varios módulos de unión a ARN, lo que podría sugerir una escasa variabilidad funcional. Sin embargo, reconocen sustratos muy diversos debido a la presencia de múltiples copias de dominios de unión a RNA (RBDs, "*RNA Binding Domains*") que pueden encontrarse combinados o no con dominios enzimáticos. Su asociación dinámica determina la vida media del ARN así como su localización celular, procesamiento y tasa de traducción (302).

## 2.2.4.1.1. Dominios de unión a ARN

Muchos procesos celulares, incluidos los implicados en señalización intracelular y matriz extracelular, dependen de proteínas que se construyen a través de múltiples repeticiones de algunas unidades modulares básicas. Las ventajas para surgen la construcción de una proteína con una arquitectura modular de la versatilidad resultante. Al existir en múltiples copias, estos módulos dotan a una proteína de la capacidad de unirse al ARN con mayor especificidad y afinidad de lo que sería posible con dominios individuales, que a menudo se unen a tramos cortos de ARN con afinidad débil. Por lo tanto, al construir una superficie de interacción a través de múltiples módulos, alta afinidad y especificidad por un Se puede obtener un objetivo particular combinando múltiples interacciones débiles. Estas interacciones débiles hacen que sea más fácil regular la formación de estos complejos (302).

La especificidad de los dominios individuales en una proteína es funcionalmente importante, pero también lo es la forma en que los dominios están ordenados uno respecto al otro. Este se refleja en la evolución: los niveles más altos de conservación son a menudo se encuentra entre dominios que ocupan la misma posición en proteínas ortólogas, a diferencia de los dominios en la misma proteína, pero en diferente posición (302). A continuación, se muestran los dominios de unión más importantes:

### Motivos de reconocimiento de ARN

El motivo de reconocimiento de ARN (RRM de *RNA Recognition Motifs*) es el más común y mejor caracterizado de los Módulos de unión a ARN. El RRM se compone de 80-90 aminoácidos que forman una hoja  $\beta$  antiparalela de cuatro hebras con dos hélices empaquetadas contra él, dando al dominio de topología dividida  $\alpha\beta$  ( $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ) (303). Más de 10.000 Se han identificado RRM que funcionan en la mayoría, si no todos, procesos de expresión génica postranscripcionales; en humanos,  $\sim 0.5$ -1% de los genes contienen un RRM, a menudo en múltiples copias en el mismo polipéptido (302).

En las aproximadamente 20 estructuras conocidas de complejos RRM-RNA, el reconocimiento de ARN generalmente ocurre en la superficie de la hoja  $\beta$ 13–16,18,20–28 (304). La unión está mediada en la mayoría de los casos por tres residuos conservados: un residuo de Arg o Lys que forma un puente salino con el enlace fosfodiéster de la estructura carbonada y dos residuos aromáticos que interactúan con las bases nitrogenadas (305) (Tabla 1).

Estos tres aminoácidos residen en dos motivos altamente conservados, RNP motivo-1 (RNP1) y RNP2, y se ubican en dos láminas  $\beta$  centrales (303). Esta plataforma conservada permite el reconocimiento de dos nucleótidos en el centro de la hoja  $\beta$  y de dos nucleótidos adicionales a cada lado. Sin embargo, un solo RRM puede reconocer

## INTRODUCCIÓN

desde cuatro a ocho nucleótidos mediante el uso de bucles expuestos y adicionalmente elementos de estructura secundaria que no están presentes en su estructura canónica (303, 305). Este mecanismo general de reconocimiento se encuentra en muchos RRM, pero no en todos (306, 307); alguno de estos dominios también puede interactuar exclusivamente con proteínas y no con ARN (308). Por lo tanto, algunos RRM pueden unir ARN con gran especificidad, pero a menudo necesitan de múltiples dominios para definir la especificidad porque el número de nucleótidos que son reconocidos por un solo RRM generalmente es demasiado pequeño para definir una secuencia de unión única (305).

### Motivo de unión por dedos de Zinc

Los dedos de zinc son motivos altamente estudiados de unión al ADN presentes en proteínas que también pueden unirse al ARN (309, 310). Se suelen clasificar en función de los residuos que se utilizan para unir zinc (Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup> (CCHH), CCCH o CCHC) y generalmente están presentes en múltiples repeticiones en factores transcripcionales y también en proteínas de unión a ARN (311) (Tabla 1). En este sentido, los dedos de zinc pueden usar algunos de los mismos residuos para reconocer tanto ADN como ARN. En función de si su unión es a un ácido nucléico o a otro desempeñarán bien una función meramente transcripcional, si unen a ADN, o traduccional, mediante su unión a determinadas secuencias en el ARN (311).

### Motivos KH de unión a ARN

El dominio de homología K (hn)RNP (dominio KH) es un dominio ubicuo en eucariotas, eubacterias y arqueas (312). El dominio está compuesto por unos 70 aminoácidos con una secuencia característica funcionalmente importante de (I/L/V)IGXXGXX(I/L/V) cerca del centro del motivo. Todos los motivos KH forman una hoja  $\beta$  de tres cadenas enfrentada a tres hélices  $\alpha$ , pero los dominios KH se pueden separar en dos subfamilias sobre la base de su topología (tipo I tiene topología  $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ ; el tipo II tiene topología  $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ) (313) (Tabla 1). Para ambas clases, reconocen cuatro nucleótidos en un surco que está formado por el bucle GXXG, las hélices flanqueantes, la cadena  $\beta$  que sigue a  $\alpha_2$  (tipo I) o  $\alpha_3$  (tipo II) y una región de bucle variable entre  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (tipo I) o entre  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  (tipo II). A diferencia del RRM, este enlace no presenta aminoácidos aromáticos, donde el reconocimiento se logra por enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y complementariedad de formas (302).

#### 2.2.4.1.2. Secuencias de unión a ARN

**Tabla 1. Principales motivos de reconocimiento de ARN.**

Motivo de reconocimiento	Estructura	Secuencia consenso de reconocimiento de ARN	Referencia
<b>RRM</b>	Cuatro hebras con dos hélices $\alpha$ internas ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ )	RNP1:(R/K)-G-(F/Y)-(G/A)-(F/Y)-V-X-(F/Y) RNP2:(L/I)-(F/Y)-(V/I)-X-(N/G)-L	(304)
<b>Dedos de Zinc</b>	Una hélice $\alpha$ plegada sobre una lámina $\beta$	-CCHH -CCCH -CCHC	(311)
<b>Motivo KH</b>	-Tipo I: $\beta\alpha\beta\alpha$ -Tipo II: $\alpha\beta\beta\alpha\beta$	-Para ambos tipos: GXXG	(313)

Existen múltiples dominios de unión a ARN que permiten desempeñar diversas funciones dentro de la célula (302). Lo que realmente lleva a la especificidad de la función de las RBPs viene dado por la secuencia del ARNm al que se unen. Mientras que el control global de la síntesis de proteínas se ejerce principalmente a través de cambios en el estado de fosforilación de factores traduccionales, el reclutamiento de RBPs que actúan tiene un impacto importante en múltiples aspectos del metabolismo del ARNm, incluida la poliadenilación, el exporte nuclear, la localización de la transcripción, la estabilidad y, en consecuencia, la síntesis proteica (314). A continuación, comentaremos algunos de los motivos de ARN más comunes (Tabla 2).

## Motivos TOP

Los ARNm que contienen elementos de oligopirimidina terminal (TOP) presentan una secuencia rica de pirimidinas de 4 a 15 bases que contiene una proporción similar de Cs y Us (315). Muchos ARNm presentan además una región rica en CG que, a menudo se encuentra inmediatamente aguas abajo del motivo TOP y se cree que son necesarios para la traducción completa de diversas proteínas (316, 317 1994 1994, 318) (Tabla 2).

## Secuencias poli(U) y cola poli(A)

## INTRODUCCIÓN

En los ARNm es común encontrar secuencias repetidas bien en el extremo 5' o en el 3' secuencias ricas en uracilo o adenina (319). Si bien las secuencias poli(U) se encuentran fundamentalmente en el extremo 5' no son exclusivas de ésta (320). A estas secuencias poli(U) se unen preferentemente RBPs que presentan motivos RRM siendo generalmente proteínas cuya función regula la estabilidad del ARNm al que se unen (321).

Por otro lado, el inicio de la traducción es estimulado por la presencia de una cola poli(A) y se ha demostrado que la longitud de la cola poli(A) la cola afecta directamente las tasas de traducción del ARNm. Por lo tanto, la regulación de la longitud de la cola de poli(A) proporciona un control global y específico de la traducción (319). Las proteínas que se unen a las colas de poli(A) controlan la traducción favoreciendo el reclutamiento de factores de liberación durante el proceso de terminación (322) (Tabla 2).

### Elementos ricos en secuencias AU

Uno de los motivos UTR más estudiados son los elementos ricos en AU (ARE). Éstos participan activamente en el control postranscripcional, a través de la cooperación o competencia entre factores que se unen a pentámeros AUUUA. Numerosos genes, incluidos los que codifican ciclinas, factores de transcripción, supresores de tumores y oncogenes, están regulados por ARE (323 2007 2007). Por lo tanto, cualquier mutación en los elementos que actúan tanto en cis como en trans tiene un impacto negativo en el crecimiento y desarrollo celular. Las proteínas de unión a ARE (ARE-BP) se dividen en las responsables de estabilización del ARNm y mejora de la traducción y aquellas que aumentan la degradación del ARN y la represión de la traducción (319) (Tabla 2).

**Tabla 2. Principales secuencias de unión a ARN.**

Secuencia de unión a ARN	Secuencia de nucleótidos	Localización en el ARN	Referencia
<b>TOP</b>	Secuencia de 4 a 15 bases de C y U en la misma proporción	5' UTR	(318)
<b>Poli (U)</b>	Secuencia enriquecida en U	5' UTR	(320)

<b>Cola Poli (A)</b>	Secuencia enriquecida en A	3' UTR	(322)
<b>ARE</b>	Secuencia formada por un pentámero de AUUUA	3' UTR	(319)

### 2.2.4.1.3. Las RBPs en *S. pombe*

Existen numerosas proteínas de unión a ARN en *S. pombe*. Las funciones que cumplen son muy diversas, aunque fundamentalmente estas proteínas son reguladores postranscripcionales otorgando estabilidad o inestabilidad a los ARNm a los que se unen (324).

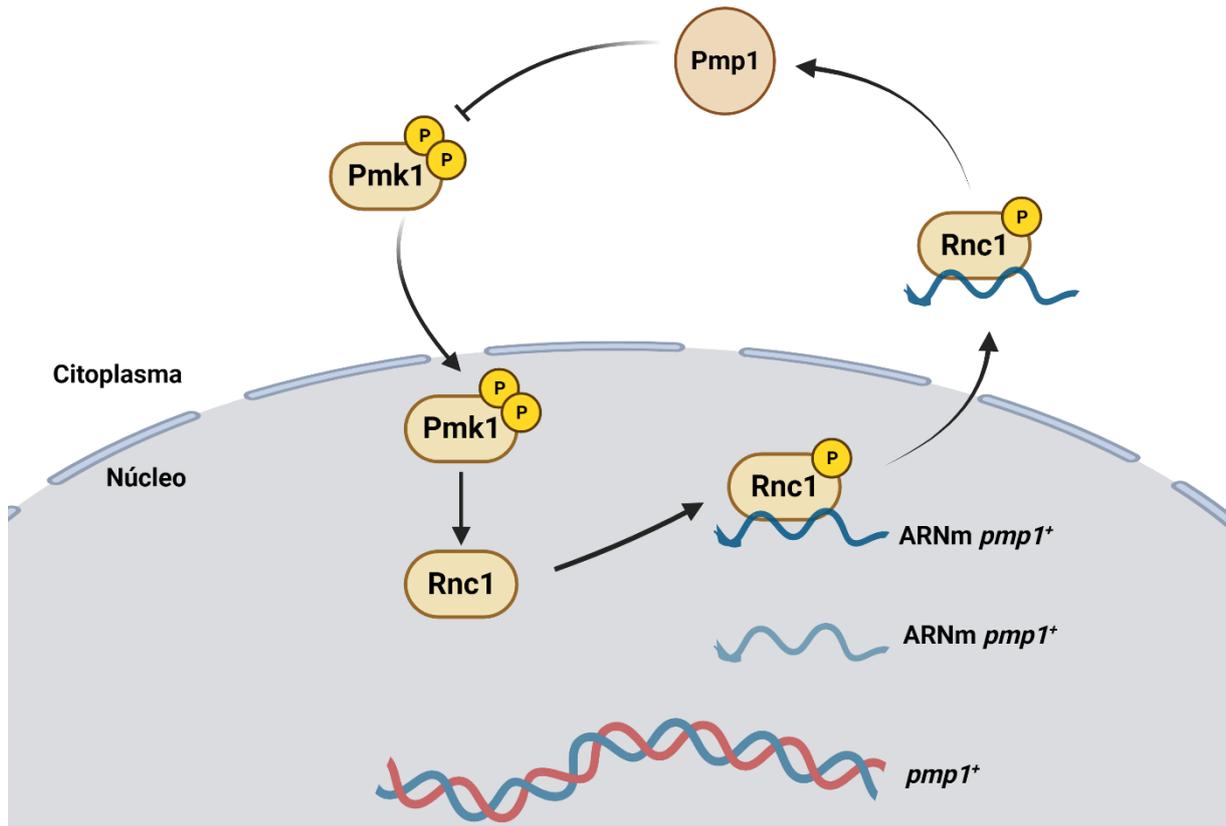
Durante el crecimiento vegetativo, diversos ARNm implicados en meiosis se unen a Mmi1, que los dirige para degradación por el exosoma nuclear en un proceso que requiere Pab2 (una proteína de unión a poli(A) nuclear) y Red1 (una proteína que contiene dedos de zinc) (325, 326). Esto sugiere que ambas proteínas regulan el mismo grupo de ARNm, aunque la función de Red1 parece ser más importante (324).

Otro de los procesos que se encuentran también regulados por RBPs en *S. pombe* es el control postranscripcional de proteínas implicadas en citocinesis y que a su vez están siendo reguladas por MAP kinasas. Nrd1 se une a motivos poli(U) de Cdc4 gracias a sus dominios RRM regulando negativamente su estabilidad (321). Además, la unión de Nrd1 al ARNm está regulada por fosforilación directa de la MAP kinasa Pmk1, que fosforila a Nrd1 en el residuo Thr40 y en el residuo Thr126 que se encuentra en el primer dominio RRM reduciendo su capacidad de unir ARNs (320, 321).

#### 2.2.4.1.3.1. La proteína Rnc1

Rnc1 es una RBP no esencial del dominio KH que se ha caracterizado funcionalmente en este organismo (7, 327). Presenta 3 motivos KH en su estructura los cuales le permite la unión a secuencias AREs presentes en el extremo 3'UTR del ARNm (Apartado 2.2.4.1.3.).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 19. Modelo de regulación de Rnc1.** La MAP quinasa Pmk1 es fosforilada y se trasloca al núcleo para fosforilar a Rnc1 en T50. La forma fosforilada de Rnc1 es capaz de unir y estabilizar el ARNm de la fosfatasa Pmp1, favoreciendo su traducción. Una vez expresada Pmp1, ésta desfosforila específicamente a Pmk1, estableciendo un bucle de retroalimentación negativa. Adaptado de (7).

La principal diana descrita para Rnc1 es el ARNm de *pmp1*, que codifica la fosfatasa de especificidad dual Pmp1, que desfosforila e inactiva específicamente a Pmk1, el miembro central de la ruta de integridad celular (CIP) en la levadura de fisión (328, 329). Rnc1 negativamente regula la señalización de CIP a través de la estabilización del ARNm de *pmp1*; en consecuencia, combinando la mutación de los bucles GXXG dentro de cada uno de sus tres dominios KH da como resultado la anulación de la unión de ARNm y un fenotipo de falta de función similar a la delección de Rnc1 (302). Es más, Pmk1 activado se une y fosforila Rnc1 *in vivo* en un fosfotio de consenso de MAPK Thr50, y esta modificación postraduccional mejora la actividad de Rnc1 para unirse y estabilizar el ARNm de Pmp1, lo que plantea a Rnc1 como un circuito de retroalimentación negativa de señalización MAPK (6, 7) (**Figura 19**).

Estudios posteriores confirmaron la presencia de Rnc1 en gránulos de estrés cuando se produce la activación de Pmk1, lo que sugiere un papel positivo en la regulación de la actividad de la ruta CIP en condiciones de estrés (327, 330).

Curiosamente, un análisis transcriptómico comparativo ha revelado que, con respecto a células silvestres, el número de genes cuya expresión incrementa en células *rnc1Δ* en crecimiento vegetativo es mucho más grande que aquellos cuya expresión

disminuye (77 frente a 27, respectivamente), lo que sugiere que Rnc1 también puede regular negativamente la vida media/estabilidad del ARNm de otros ARNs (324).

### 2.2.5 La ruta de MAPK de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*

La ruta de respuesta a estrés o SAPK juega un papel fundamental durante el ciclo de vida de *S. pombe*, regulando el ciclo celular y la respuesta general adaptativa frente al estrés (331, 332). El elemento central de esta ruta es la MAPK Sty1, ortóloga a p38 en eucariotas superiores, activándose en respuesta a numerosos estímulos como el estrés osmótico, el choque térmico, el estrés oxidativo, o la privación de glucosa o nitrógeno (333-337). Los principales componentes de esta ruta se describen a continuación.

#### 2.2.5.1 Sensores

Actualmente desconocemos la mayor parte de los mecanismos implicados en la detección y transducción de los estímulos que activan la SAPK, salvo el caso de la activación por estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno ya que la señal se transmite a Sty1 gracias a un sistema fosfotransferasa análogo al sistema de dos componentes bacterianos. Este módulo se conforma por dos proteínas histidina quinasa homólogas, Mak2 y Mak3, una proteína fosfotransferasa con histidina, Mpr1/Spy1, y el regulador de respuesta Mcs4 (338-340). Mak2 y Mak3 son proteínas citoplásmicas que no presentan dominios transmembrana. En respuesta a peróxido de hidrógeno, Mak2 y Mak3 se autofosforilan en un residuo de His conservado, y a continuación Spy1 transfiere el grupo fosfato a un residuo de aspártico (Asp) conservado en Mcs4 permitiendo la activación de la ruta de MAPKs, donde Mcs4 es el elemento común en la respuesta frente a las diversas situaciones de estrés que activan esta ruta (341, 342). Junto a Mcs4, *S. pombe* encontramos a Prr1, otro regulador de respuesta que actúa como un factor transcripcional que induce la expresión de genes en respuesta al estrés oxidativo de forma independiente a Sty1 (339, 343). Por su parte, la activación de Sty1 en respuesta al estrés térmico no depende de la existencia de sensores específicos, si no que se produce como consecuencia de la inhibición transitoria de la unión a la MAPK de las fosfatasa Pyp1 y Pyp2 (344) (**Figura 20**).

##### 2.2.5.1.1 Regulador de respuesta Mcs4

## INTRODUCCIÓN

Mcs4 se trata de una proteína de 522 aminoácidos que contiene un dominio receptor que presenta un residuo de Asp altamente conservado. En *S. pombe*, Mcs4 está implicado en la detección del estrés oxidativo y su transmisión a través del sistema de dos componentes, aunque su presencia también es necesaria para la activación de Sty1 en respuesta a todos los estreses que activan esta ruta de señalización (337, 345). Mcs4 se encuentra estructural y funcionalmente relacionada con el regulador de respuesta Ssk1 de *S. cerevisiae*, que forma parte de un sistema de dos componentes detectando cambios en la osmolaridad del medio (339, 345, 346). Mcs4 está implicado en la regulación del ciclo celular, ya que, de igual manera que el resto de mutantes de la ruta, su ausencia presenta una morfología alargada típica de un retraso en la transición G2/M (339, 340, 346). También, estos mutantes presentan un grave defecto en la diferenciación sexual, sugiriendo que Mcs4 regula además este proceso en *S. pombe* (347). Mcs4 interacciona físicamente con Mpr1, Tdh1 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y las MAPKKKs Wak1 y Win1. Mcs4 presenta dos papeles en la respuesta de la ruta SAPK frente al estrés. Por un lado, recibe la señalización en respuesta al estrés oxidativo a través del sistema de dos componentes activando a las MAPKKKs Wak1 y Win1. Por otro lado, estabiliza el complejo que se forma entre ambas MAPKKKs promoviendo su interacción con la MAPKK Wis1, que, consecuentemente, facilitará la activación de la MAPK Sty1. Algunos autores sugieren que el heterotrímero Mcs4-Wak1-Win1 actúa como una "plataforma estabilizadora" que permite la adecuada señalización de la ruta SAPK en respuesta al estrés (348) (**Figura 20**).

### 2.2.5.3. Módulo de MAPKs

#### 2.2.5.3.1. MAPKKKs Wak1 y Win1

Wak1 (también denominada Wis4) y Win1 son las dos MAPKKK que forman parte de la ruta SAPK de *S. pombe*. En respuesta a estrés, Mcs4 se une y activa a Wak1 y Win1, que a su vez fosforilan y activan a la MAPKK Wis1, y ésta a Sty1 (339, 348, 349). Wak1 y Win1 pueden complementarse en la activación de Sty1 en respuesta a bajas dosis de peróxido de hidrógeno, mientras que la actividad de ambas es necesaria para la respuesta frente a altas concentraciones de este compuesto (338). Sin embargo, Wak1 es la principal encargada de la activación de Sty1 durante el estrés osmótico, el choque térmico, o las bajas temperaturas (337, 350) (**Figura 20**).

#### 2.2.5.3.2. MAPKK Wis1

## INTRODUCCIÓN

Wis1, MAPKK de la ruta, resulta ser crítica para la activación de Sty1 en respuesta a todos los estímulos ambientales que activan esta ruta (350), aunque algunos autores sostienen que en el caso del estrés térmico y el tratamiento con arsenito no es necesaria (344, 351). Wis1 se une y fosforila a Sty1 en el citoplasma en respuesta a estrés, lo que promueve su activación y posterior translocación al núcleo de la MAPK (352) (**Figura 20**).

### 2.2.5.3.3. MAPK Sty1

El elemento central de la ruta SAPK es la MAPK Sty1/Spc1/Phh1 (331, 335, 353). Wis1 fosforilado y activado se une a Sty1 fosforilándola en los residuos Thr171 y Tyr173 del motivo conservado TGY del bucle de activación en respuesta a múltiples estreses, como el estrés osmótico, el tratamiento con arsenito, el estrés térmico por altas y bajas temperaturas, el estrés oxidativo, la radiación UV, las fuerzas de gravedad, la elevada presión hidrostática, la limitación de nutrientes o el daño en el citoesqueleto de actina (331, 334, 335, 338, 351, 353-356). La activación de Sty1 durante estas situaciones de estrés es transitoria y la respuesta depende de la naturaleza y la magnitud del propio estímulo. En condiciones de crecimiento vegetativo Sty1 se localiza fundamentalmente en el citoplasma, aunque existe una pequeña fracción nuclear, pero una vez fosforilada se transloca al núcleo, donde ejerce su función sobre efectores específicos (357) (**Figura 20**).

### 2.2.5.3.4. Efectores de la ruta SAPK

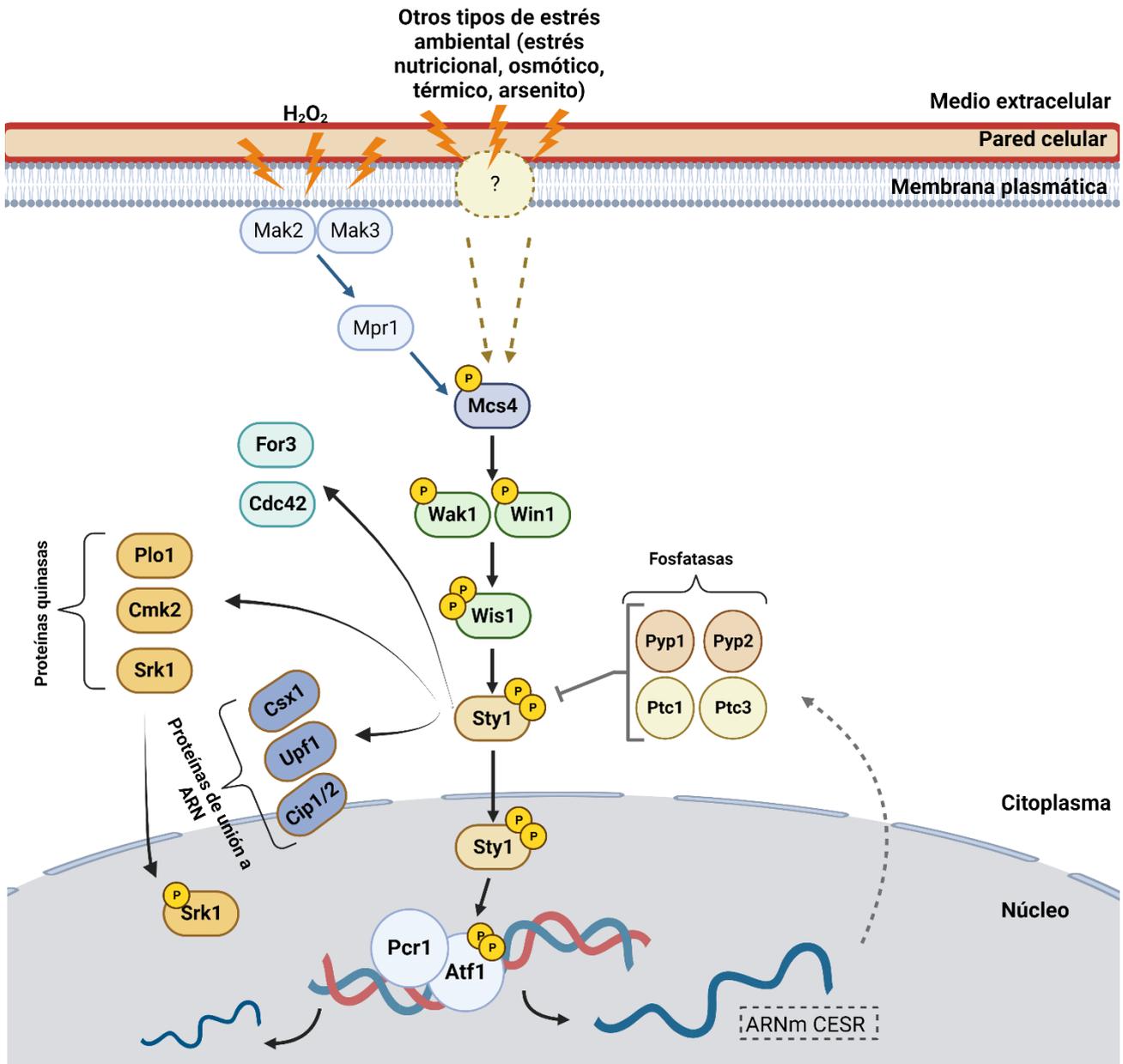


Figura 20. La ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*. Adaptado de (6).

Uno de los principales efectores de la ruta SAPK es Atf1, factor de transcripción con un dominio de cremallera de leucina (bZIP) ortólogo a ATF-2 en eucariotas superiores (336). Análogamente a los mutantes carentes de Sty1, los mutantes *atf1Δ* muestran una clara sensibilidad frente al estrés osmótico y oxidativo, además de fuertes defectos durante la diferenciación sexual (332). Sin embargo, contrariamente a los mutantes nulos en Sty1, la ausencia de Atf1 presenta alteraciones en el ciclo celular, sugiriendo que participa exclusivamente en la respuesta celular frente al estrés (332, 336). La forma activa de Sty1, fosforilada dualmente por Wis1, se transloca al núcleo, donde se asocia y fosforila a Atf1. Una vez activo, Atf1 regula la expresión de

## INTRODUCCIÓN

un gran número de genes necesarios para que se produzca la respuesta adaptativa frente al estrés y la entrada en meiosis, los denominados genes "CESR" (*Core Environmental Stress Response*) (358). También, la fosforilación de Atf1 por Sty1 aumenta la estabilidad de esta proteína y alarga su vida media (359). Atf1 forma heterodímeros en el núcleo con otro factor de transcripción denominado Pcr1, sin embargo, su presencia no es necesaria para la expresión de la mayoría de genes de respuesta a estrés dependientes de Atf1 (360) (**Figura 20**).

Otras dianas relevantes de Sty1 son las proteínas de unión a ARNm Csx1 y Cip1/2, que están implicadas en la estabilización del ARNm en respuesta a estrés, las proteínas quinasas activadas por MAPKs Cmk2 y Srk1, y la polo quinasa reguladora del ciclo celular Plo1 (6). Por otro lado, se ha descrito que Sty1 regula negativamente la localización de la Rho GTPasa esencial Cdc42 en los polos celulares, participando en la regulación del crecimiento polarizado en *S. pombe* (355). Además, estudios recientes muestran que la ruta SAPK regula negativamente la estabilidad de la formina For3, aunque todavía se desconoce el mecanismo regulador preciso (361) (**Figura 20**).

### 2.2.5.3.5. Reguladores negativos de la ruta SAPK

La magnitud y duración de la activación de las rutas de MAPKs debe estar regulada de manera precisa con el fin de que se produzca una respuesta adecuada frente al agente estresante. En este sentido, las fosfatasa de MAPKs son reguladores negativos esenciales y específicos que desfosforilan a las MAPKs activas en residuos de Thr, Tyr, o ambos. En eucariotas se han descrito tres tipos de fosfatasa de MAPKs: fosfatasa de tirosina (PTPs), fosfatasa de serina y treonina (PP2Cs) y fosfatasa de especificidad dual (DSPs) (362) (**Figura 20**).

La MAPK Sty1 se encuentra regulada negativamente por las fosfatasa específicas de residuos de tirosina Pyp1 y Pyp2, y por las serín/treonín fosfatasa Ptc1 y Ptc3. Pyp1 y Pyp2 localizan en el citoplasma, donde se unen a Sty1 y la desfosforilan en el residuo Tyr173 *in vivo* (333, 335, 363). Pyp1 se trata de la fosfatasa principal implicada en la regulación negativa de Sty1 durante el crecimiento vegetativo (333, 349), mientras que la desfosforilación de Sty1 en respuesta a estrés es llevada a cabo por ambas fosfatasa, aunque Pyp2 juega un papel más crítico en esta fase (331, 335). Por su parte, Ptc1 y Ptc3 desfosforilan a Sty1 en el residuo de Thr171 tras el estrés térmico. En estas condiciones, la activación de Sty1 se produce por la inhibición de la unión de Pyp1 a Sty1, donde la acción conjunta de Ptc1 y Ptc3 permite recuperar el nivel basal de fosforilación de la MAPK (344). A su vez, la expresión de Pyp1, Pyp2 y Ptc1 está regulada por el bucle Sty1-Atf1 mediante un bucle de retroalimentación negativa (332, 333, 336, 363) (**Figura 20**).

## 2.2.6. Interacción funcional entre la ruta de MAPK de respuesta a estrés y la ruta

### AMPC-PKA

La limitación en la disponibilidad de glucosa genera una situación de estrés que, al igual que el ayuno de nitrógeno, el estrés osmótico, oxidativo y térmico, activa a la ruta SAPK (336, 364). Una vez activada, Sty1 se acumula en el núcleo donde fosforila a diversos sustratos, entre los que destaca Atf1 que regula la expresión de genes cuyos productos determinan la respuesta adaptativa de *S. pombe* frente a diversas condiciones de estrés (336). Por otro lado, la ruta AMPC-PKA se inactiva en respuesta al déficit de glucosa, permitiendo la transcripción de genes implicados en el cambio diaúxico (1). Esta activación de la ruta SAPK e inactivación de PKA en *S. pombe* sugiere una conexión funcional donde el balance de la señal que desencadena estos procesos resulta crítico para el control exquisito de la reprogramación metabólica (365).

La unión de Atf1 a los elementos CRE de determinados promotores está regulada positivamente por la ruta SAPK y negativamente por la ruta PKA (288, 289, 364). En lo que respecta a la señalización por fuente de carbono en *S. pombe*, se ha descrito que Atf1 controla la expresión de genes (entre los que destaca *fbp1+*) y mRNAs largos no codificantes inducidos por estrés metabólico («metabolic stress-induced long ncRNAs»), permitiendo la adaptación celular frente al estrés producido por déficit de glucosa (366, 367). Además, la falta de Rst2 provoca una disminución en la cantidad de Atf1 que se une al promotor de *fbp1+* en condiciones limitantes de glucosa (366, 367). También, la propia inactivación de *pka1* provoca la expresión de genes implicados en la respiración mitocondrial, lo que resulta en un aumento del estrés oxidativo endógeno que lleva a la activación de la ruta SAPK (272). Precisamente el correcto funcionamiento de la función mitocondrial regulado por las rutas PKA y SAPK promueven la correcta inducción de la autofagia que resulta clave para un cambio diaúxico eficaz (365).

## 2.3. Control de la citocinesis por estímulos nutricionales

La citocinesis constituye el último paso en el ciclo celular tras la mitosis. Los mecanismos de control de la citocinesis han de ser robustos, pero a la vez lo suficientemente flexibles para responder de manera eficiente frente a los cambios ambientales, ya que estos cambios determinan en último término si se dan las condiciones adecuadas para la proliferación celular. Con este fin las células han desarrollado elaborados mecanismos regulatorios entre las diferentes rutas de señalización que participan en la citocinesis, y que incluyen múltiples mecanismos de interacción funcional y circuitos de retroalimentación (189).

## INTRODUCCIÓN

La percepción de los cambios ambientales influye críticamente en el desarrollo del ciclo celular, permitiendo a la célula adaptarse a un entorno en continuo cambio (6). Uno de los estímulos ambientales más importante es la detección de nutrientes en el medio, siendo la glucosa la principal fuente de carbono en eucariotas (281). En este sentido, las rutas de transducción de señales juegan un papel crítico en la detección y respuesta a cambios en la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo, por lo que es necesario la existencia de una exquisita regulación de las mismas (6). Existen diferentes mecanismos de control de las rutas de MAPKs, uno de los puntos de regulación más importantes es la desfosforilación por fosfatasa (328). Sin embargo, existen otros mecanismos que permiten ejercer un control adicional sobre estas rutas, como factores transcripcionales o proteínas de unión a ARN (7).

En células eucariotas superiores se han descrito diferentes RBPs que son reguladas por rutas de MAPKs. Más en concreto, la fosforilación de KSRP, HuR y Tis11b por p38 MAPKs regula negativamente la estabilidad de ARNms permitiendo atenuar la respuesta frente a diferentes situaciones de estrés (368). También se ha descrito la importancia de estas RBPs en el desarrollo de procesos tumorales, donde MAPKAPK2, kinasa activada por p38 en metazoos, supone el regulador clave para la transcripción o no de diferentes ARNms para actuar sobre procesos celulares como el control del ciclo celular o la percepción de la respuesta inflamatoria (369). En el caso de levaduras, en *S. pombe* Nrd1 regula negativamente la estabilidad de diferentes ARNms implicados en procesos como la meiosis o la citocinesis, ya que favorece la traducción de Ste11 y Cdc4 respectivamente (321). Además, Nrd1 es regulado negativamente por Pmk1 por fosforilación en dos residuos de treonina, siendo la Thr126 crítica para la unión de sus motivos RRM al ARNm (321). Sin embargo, en estos organismos no se han descrito ningún mecanismo de regulación de RBPs sobre MAPKs, hecho que sí se conoce en levaduras (6). En *S. pombe*, Rnc1 controla positivamente la estabilidad del ARNm de Pmp1, fosfatasa específica de Pmk1, lo que sugiere un circuito regulatorio que permite modular adecuadamente la respuesta frente al estrés (7). Además, la propia presencia de Rnc1 en gránulos de estrés postula a esta proteína como crítica para el control de otros ARNms implicados en la respuesta frente a estímulos ambientales, lo que sugiere que Rnc1 y otras RBPs puedan estar regulando a su vez otros ARNms implicados en la respuesta a estrés (330).

La cantidad de glucosa disponible en el medio condiciona críticamente el metabolismo celular, debiendo someter a la célula a una profunda remodelación morfogénica para poder adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. En levaduras como *S. cerevisiae* o *S. pombe*, la presencia de abundante glucosa en el medio promueve fundamentalmente su metabolización vía glucólisis liberando etanol como producto final en un metabolismo fermentativo (281). Sin embargo, en ausencia de glucosa o en cantidades limitantes de la misma las células deben transicionar a un metabolismo respiratorio con el objetivo de obtener el mayor rendimiento de la misma en lo que se conoce como cambio diáuxico (281, 365).

## INTRODUCCIÓN

En *S. pombe*, la vía PKA constituye uno de los principales sensores del nivel de glucosa extracelular, la cual se detecta a través de un receptor transmembrana (Git3). Esta señal se transmite a través de una proteína-G heterotrimérica compuesta por tres subunidades: Gpa2 ( $G\alpha$ ), Git5 ( $G\beta$ ) y Git11 ( $G\gamma$ ) (281). A continuación, Gpa2 se une a GTP y activa la adenilciclase Cyr1, produciendo así un aumento transitorio de cAMP en la célula (370). Este metabolito en altas concentraciones intracelulares se une a la subunidad reguladora Cgs1 liberando así la subunidad catalítica Pka1. Una vez activa, Pka1 fosforila a Rst2 en los residuos Ser139, Thr140, Thr141, y Thr253, lo que promueve su exclusión nuclear e inactivación (288, 289, 291). En concreto, se ha descrito que la ruta PKA inhibe la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis, diferenciación sexual y proteínas mitocondriales a través de Rst2. En *S. cerevisiae* se ha descrito que los factores de transcripción Msn2 y Msn4, que también presentan motivos STRE, están regulados positivamente por la MAPK Hog1 (ortóloga a Sty1 en la levadura con fisión) y negativamente por PKA (272).

Gracias a la rápida respuesta adaptativa de las células, éstas pueden obtener energía para poder adaptarse y proliferar en los diferentes ambientes y situaciones en las que se encuentran (6). Uno de los múltiples procesos que se ven implicados en estos cambios es el citoesqueleto de actina. La disponibilidad de ATP es fundamental para el correcto remodelado del citoesqueleto en diversas situaciones como la contracción muscular, la migración celular o la citocinesis (371). Diferentes trabajos sugieren que la reprogramación metabólica induce cambios en el citoesqueleto de actina que ocurren durante la respuesta de las células a fuerzas externas, a la transición epitelio-mesénquima y la migración celular. Todos estos cambios en el citoesqueleto requieren necesariamente de la energía proporcionada, entre otros elementos, de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa durante la respiración mitocondrial (372, 373). Sin embargo, la pregunta es cómo los cambios en el metabolismo celular provocan la remodelación del citoesqueleto de actina (373).

Recientemente se ha descrito que la actividad de la ruta SAPK regula negativamente la integridad del citoesqueleto de actina y, en última instancia, la citocinesis. La activación de Sty1 por diversos estímulos ambientales provoca la reducción del nivel total de For3 lo que ocasiona en una detención de la citocinesis (361). Además, otros autores sugieren que la ruta PKA tiene también un papel en el citoesqueleto de actina, pues el mutante nulo *pka1Δ* presenta sensibilidad a la droga latrunculina A, macrólido que secuestra monómeros de actina e inhibe el ensamblaje de las diferentes estructuras del citoesqueleto, además de acelerar la despolimerización de los filamentos de actina (374, 375), lo que sugiere un papel en citocinesis (376). Pese a todas estas evidencias, no se han realizado estudios en profundidad sobre si el citoesqueleto de actina y, en consecuencia, la citocinesis se ve afectada también por cambios en el metabolismo celular.

En eucariotas simples como las levaduras también existen diferentes puntos de interconexión entre las rutas de señalización ambiental y el citoesqueleto de actina. En

## INTRODUCCIÓN

*C. albicans*, la ruta de MAPKs mediada por Cek, ortóloga a ERK en eucariotas superiores, regula la expresión de genes que favorecen el desarrollo hifal (47). Se ha descrito que las proteínas transmembrana Opy2, Sho1 y Msb2, elementos aguas arriba de dicha ruta, forman un complejo con la Rho GTPasa Cdc42 que promueve la activación de la MAPK Cekl, reclutando a los elementos requeridos para la remodelación del citoesqueleto de actina y otras estructuras relacionadas. Todo ello permite la adaptación de *C. albicans* frente a los cambios osmóticos que se producen en el entorno extracelular (377). En cuanto a *S. japonicus*, se trata de un organismo modelo relativamente reciente, por lo que hay muchos aspectos de su biología que actualmente se desconocen. Existen evidencias que conectan funcionalmente las rutas de MAPKs y el citoesqueleto de actina con la morfogénesis y el cambio dimórfico. En esta levadura, la transición dimórfica es regulada negativamente por la actividad de la ruta SAPK junto con un mecanismo de percepción de quórum (61). Por el contrario, la ruta CIP controla de manera positiva el desarrollo filamentoso en esta levadura (63). En esta levadura está descrito que la presencia de un medio rico en RGE sólido induce el desarrollo hifal, siendo éste totalmente dependiente del citoesqueleto de actina (9).

El desarrollo filamentoso requiere de una intensa reprogramación celular induciendo cambios morfogénéticos importantes, que llevan a la detención del ciclo celular con el fin de conseguir el crecimiento filamentoso (9). Uno de los procesos que debe estar perfectamente regulado durante esta transición dimórfica es la citocinesis. En diferentes levaduras dimórficas se ha descrito que mutantes en la miosina citocinética provocan un desarrollo filamentoso pobre e ineficiente (64). Por otro lado, en *S. japonicus*, si bien es cierto que se han descrito que estímulos ambientales como la luz o la temperatura resultan relevantes para la miceliación y que ésta se debe a alteraciones en la dinámica de citocinesis en presencia de estos estreses (378), no existen evidencias claras que relacionen el desarrollo hifal con la citocinesis.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Nishida I, Yokomi K, Hosono K, Hayashi K, Matsuo YA-O, Kaino T, et al. CoQ(10) production in *Schizosaccharomyces pombe* is increased by reduction of glucose levels or deletion of *pka1*. (1432-0614 (Electronic)).
2. Liu SL, Fewkes N, Ricketson D, Penkert RR, Prehoda KE. Filament-dependent and -independent localization modes of *Drosophila* non-muscle myosin II. *J Biol Chem*. 2008;283(1):380-7.
3. Rhind N, Chen Z, Yassour M, Thompson DA, Haas BJ, Habib N, et al. Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6032):930-6.
4. Pollard LW, Bookwalter CS, Tang Q, Kremetsova EB, Trybus KM, Lowey S. Fission yeast myosin Myo2 is down-regulated in actin affinity by light chain phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(35):E7236-E44.
5. Cruz S, Muñoz S, Manjón E, García P, Sanchez Y. The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *MicrobiologyOpen*. 2013;2(5):778-94.
6. Perez P, Cansado J. Cell Integrity Signaling and Response to Stress in Fission Yeast. *Current Protein & Peptide Science*. 2010;11(8):680-92.
7. Sugiura R, Kita A, Shimizu Y, Shuntoh H, Sio SO, Kuno T. Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature*. 2003;424(6951):961-5.
8. Pérez P, Cortés JCG, Martín-García R, Ribas JC. Overview of fission yeast septation. *Cellular Microbiology*. 2016;18(9):1201-7.
9. Kinnaer C, Dudin O, Martin SG. Yeast-to-hypha transition of *Schizosaccharomyces japonicus* in response to environmental stimuli. *Molecular biology of the cell*. 2019;30(8):975-91.
10. Kovar DR, Sirotkin V, Lord M. Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends in cell biology*. 2011;21(3):177-87.
11. Fischer R, Zekert N, Takeshita N. Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol*. 2008;68(4):813-26.
12. Bathe M, Chang F. Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast: towards a systems-level understanding. *Trends in microbiology*. 2010;18(1):38-45.

13. Steinberg G, Peñalva MA, Riquelme M, Wösten HA, Harris SD. Cell Biology of Hyphal Growth. *Microbiol Spectr*. 2017;5(2).
14. East DA, Mulvihill DP. Regulation and function of the fission yeast myosins. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 9):1383-90.
15. Laporte D, Coffman VC, Lee IJ, Wu J-Q. Assembly and architecture of precursor nodes during fission yeast cytokinesis. *The Journal of cell biology*. 2011;192(6):1005-21.
16. Gu Y, Oliferenko S. Comparative biology of cell division in the fission yeast clade. *Current opinion in microbiology*. 2015;28:18-25.
17. Vicente-Soler J, Soto T, Franco A, Cansado J, Madrid M. The Multiple Functions of Rho GTPases in Fission Yeasts. *Cells*. 2021;10(6):1422.
18. Cheffings Thomas H, Burroughs Nigel J, Balasubramanian Mohan K. Actomyosin Ring Formation and Tension Generation in Eukaryotic Cytokinesis. *Current Biology*. 2016;26(15):R719-R37.
19. Sipiczki M. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome biology*. 2000;1(2):REVIEWS1011-REVIEWS.
20. Yuan C-C, Muthu P, Kazmierczak K, Liang J, Huang W, Irving TC, et al. Constitutive phosphorylation of cardiac myosin regulatory light chain prevents development of hypertrophic cardiomyopathy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(30):E4138-E46.
21. Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB. Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science*. 2001;293(5532):1129-33.
22. Nakaseko Y, Yanagida M. Genetic analysis of the genes involved in mitosis in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Anatomy of Cellular Systems*: Elsevier; 2002. p. 87-103.
23. Klar AJS. *Schizosaccharomyces japonicus* yeast poised to become a favorite experimental organism for eukaryotic research. *G3 (Bethesda, Md)*. 2013;3(10):1869-73.
24. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. 2002;415(6874):871-80.
25. Leupold U. *Methodisches zur Genetik von Schizosaccharomyces pombe*. *Pathobiology*. 1955;18(5):1141-6.
26. Yamamoto M, Imai Y, Watanabe YJCSHMA. 12 Mating and Sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. 1997:1037-106.

27. Mitchison JM, Creanor J. Induction synchrony in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research*. 1971;67(2):368-74.
28. MacNeill SA, Fantes PA. Genetic and physiological analysis of DNA replication in fission yeast. *Methods in Enzymology*: Elsevier; 1997. p. 440-59.
29. Martin SG, Chang F. New End Take Off: Regulating Cell Polarity during the Fission. *Cell Cycle*. 2005;4(8):4046-9.
30. Hagan IM. Commentary: the fission yeast microtubule cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 1998;111(12):1603-12.
31. Wickerham LJ, Duprat E. A Remarkable Fission Yeast, *Schizosaccharomyces versatilis* NOV. SP. *Journal of Bacteriology*. 1945;50(5):597-607.
32. Bulder CJE. Anaerobic growth, ergosterol content and sensitivity to a polyene antibiotic, of the yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1971;37(1):353-8.
33. Sazer S. Nuclear Envelope: Nuclear Pore Complexity. *Current Biology*. 2005;15(1):R23-R6.
34. Aoki K, Hayashi H, Furuya K, Sato M, Takagi T, Osumi M, et al. Breakage of the nuclear envelope by an extending mitotic nucleus occurs during anaphase in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Genes to Cells*. 2011;16(9):911-26.
35. Yam C, He Y, Zhang D, Chiam K-H, Oliferenko S. Divergent Strategies for Controlling the Nuclear Membrane Satisfy Geometric Constraints during Nuclear Division. *Current Biology*. 2011;21(15):1314-9.
36. Harris SD. Hyphal morphogenesis: an evolutionary perspective. *Fungal Biology*. 2011;115(6):475-84.
37. Arkowitz RA, Bassilana M. Polarized growth in fungi: Symmetry breaking and hyphal formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2011;22(8):806-15.
38. Riquelme M. Tip Growth in Filamentous Fungi: A Road Trip to the Apex. *Annual Review of Microbiology*. 2013;67(1):587-609.
39. Riquelme M, Sánchez-León E. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 2014;20:27-33.
40. Harris SD. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*. 2008;100(6):823-32.
41. Klein BS, Tebbets B. Dimorphism and virulence in fungi. *Current opinion in microbiology*. 2007;10(4):314-9.

42. Boyce KJ, Andrianopoulos A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015;39(6):797-811.
43. Nadal M, García-Pedrajas MaD, Gold SE. Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;284(2):127-34.
44. Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiology*. 2005;7(11):1546-54.
45. Braun BR, Kadosh D, Johnson AD. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *The EMBO journal*. 2001;20(17):4753-61.
46. Murad AM, Leng P, Straffon M, Wishart J, Macaskill S, MacCallum D, et al. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *The EMBO journal*. 2001;20(17):4742-52.
47. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(10):737-48.
48. Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020;11(1):337-48.
49. Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell*. 1992;68(6):1077-90.
50. Amoah-Buahin E, Bone N, Armstrong J. Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*. 2005;4(7):1287-97.
51. Dodgson J, Avula H, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, et al. Functional genomics of adhesion, invasion, and mycelial formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(8):1298-306.
52. Dodgson J, Brown W, Rosa CA, Armstrong J. Reorganization of the growth pattern of *Schizosaccharomyces pombe* in invasive filament formation. *Eukaryotic cell*. 2010;9(11):1788-97.
53. Bohnert KA, Gould KL. Cytokinesis-based constraints on polarized cell growth in fission yeast. *PLoS genetics*. 2012;8(10):e1003004-e.
54. Sipiczki M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I. Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology*. 1998;144(5):1319-30.
55. Sipiczki M, Takeo K, Grallert A. Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology*. 1998;144(12):3475-85.

56. Niki H. Induction of Hyphal Growth in *Schizosaccharomyces japonicus*. Cold Spring Harbor Protocols. 2017;2017(12):pdb.prot091868.
57. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. Journal of Biological Chemistry. 1985;260(27):14873-8.
58. Wan S, Capasso H, Walworth NC. The topoisomerase I poison camptothecin generates a Chk1-dependent DNA damage checkpoint signal in fission yeast. Yeast. 1999;15(10A):821-8.
59. Furuya K, Niki H. The DNA damage checkpoint regulates a transition between yeast and hyphal growth in *Schizosaccharomyces japonicus*. Molecular and cellular biology. 2010;30(12):2909-17.
60. Furuya K, Niki H. Hyphal differentiation induced via a DNA damage checkpoint-dependent pathway engaged in crosstalk with nutrient stress signaling in *Schizosaccharomyces japonicus*. Current genetics. 2012;58(5-6):291-303.
61. Gómez-Gil E, Franco A, Madrid M, Vázquez-Marín B, Gacto M, Fernández-Breis J, et al. Quorum sensing and stress-activated MAPK signaling repress yeast to hypha transition in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. PLoS Genet. 2019;15(5):e1008192.
62. Mösch HU, Roberts RL, Fink GR. Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(11):5352-6.
63. Gómez-Gil E, Franco A, Vázquez-Marín B, Prieto-Ruiz F, Pérez-Díaz A, Vicente-Soler J, et al. Specific Functional Features of the Cell Integrity MAP Kinase Pathway in the Dimorphic Fission Yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. J Fungi (Basel). 2021;7(6).
64. Cánovas D, Boyce KJ, Andrianopoulos A. The fungal type II myosin in *Penicillium marneffei*, MyoB, is essential for chitin deposition at nascent septation sites but not actin localization. Eukaryot Cell. 2011;10(3):302-12.
65. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature. 2010;463(7280):485-92.
66. Goodson HV, Jonasson EM. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2018;10(6):a022608.
67. Wickstead B, Gull K. The evolution of the cytoskeleton. The Journal of cell biology. 2011;194(4):513-25.
68. Pollard TD, Goldman RD. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2018;10(7):a030288.

69. Desai A, Mitchison TJ. MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997;13(1):83-117.
70. Janke C, Magiera MM. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(6):307-26.
71. Howard J, Hyman AA. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*. 2003;422(6933):753-8.
72. Tovey CA, Conduit PT. Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes and beyond. *Essays in biochemistry*. 2018;62(6):765-80.
73. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 1984;312(5991):237-42.
74. Drummond DR, Cross RA. Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Biology*. 2000;10(13):766-75.
75. Gallardo P, Barrales RR, Daga RR, Salas-Pino S. Nuclear Mechanics in the Fission Yeast. *Cells*. 2019;8(10):1285.
76. Tran PT, Marsh L, Doye V, Inoué S, Chang F. A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *The Journal of cell biology*. 2001;153(2):397-411.
77. Daga RR, Chang F. Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(23):8228-32.
78. Mata J, Nurse P. tea1 and the Microtubular Cytoskeleton Are Important for Generating Global Spatial Order within the Fission Yeast Cell. *Cell*. 1997;89(6):939-49.
79. Snaith HA, Sawin KE. Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature*. 2003;423(6940):647-51.
80. Snaith HA, Sawin KE. Tea for three: control of fission yeast polarity. *Nature Cell Biology*. 2005;7(5):450-1.
81. Makushok T, Alves P, Huisman Stephen M, Kijowski Adam R, Brunner D. Sterol-Rich Membrane Domains Define Fission Yeast Cell Polarity. *Cell*. 2016;165(5):1182-96.
82. Alvarez-Tabarés I, Grallert A, Ortiz JM, Hagan IM. *Schizosaccharomyces pombe* protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 20):3589-601.
83. Hachet O, Berthelot-Grosjean M, Kokkoris K, Vincenzetti V, Moosbrugger J, Martin Sophie G. A Phosphorylation Cycle Shapes Gradients of the DYRK Family Kinase Pom1 at the Plasma Membrane. *Cell*. 2011;145(7):1116-28.

84. Hagan I, Yanagida M. Evidence for cell cycle-specific, spindle pole body-mediated, nuclear positioning in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*. 1997;110(16):1851-66.
85. Hagan IM, Hyams JS. Forces acting on the fission yeast anaphase spindle. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1996;34(1):69-75.
86. Dundon SER, Pollard TD. Microtubule nucleation promoters Mto1 and Mto2 regulate cytokinesis in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2020;31(17):1846-56.
87. Davidson AJ, Wood W. Unravelling the Actin Cytoskeleton: A New Competitive Edge? *Trends in cell biology*. 2016;26(8):569-76.
88. Pollard TD. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016;8(8):a018226.
89. Mishra M, Huang J, Balasubramanian MK. The yeast actin cytoskeleton. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014;38(2):213-27.
90. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews*. 2014;94(1):235-63.
91. Chhabra ES, Higgs HN. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology*. 2007;9(10):1110-21.
92. Mishra M, Karagiannis J, Trautmann S, Wang H, McCollum D, Balasubramanian MK. The Clp1p/Flp1p phosphatase ensures completion of cytokinesis in response to minor perturbation of the cell division machinery in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*. 2004;117(17):3897-910.
93. Subramanian D, Huang J, Sevugan M, Robinson RC, Balasubramanian MK, Tang X. Insight into actin organization and function in cytokinesis from analysis of fission yeast mutants. *Genetics*. 2013;194(2):435-46.
94. Moseley JB, Goode BL. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2006;70(3):605-45.
95. Berro J, Sirotkin V, Pollard TD. Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Molecular biology of the cell*. 2010;21(16):2905-15.
96. Sirotkin V, Berro J, Macmillan K, Zhao L, Pollard TD. Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2010;21(16):2894-904.

97. McCollum D, Feoktistova A, Morpew M, Balasubramanian M, Gould KL. The Schizosaccharomyces pombe actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *The EMBO Journal*. 1996;15(23):6438-46.
98. Morrell JL, Morpew M, Gould KL. A mutant of Arp2p causes partial disassembly of the Arp2/3 complex and loss of cortical actin function in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(12):4201-15.
99. Espinoza-Sanchez S, Metskas LA, Chou SZ, Rhoades E, Pollard TD. Conformational changes in Arp2/3 complex induced by ATP, WASp-VCA and actin filaments. Cold Spring Harbor Laboratory; 2017.
100. Lee WL, Bezanilla M, Pollard TD. Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *The Journal of cell biology*. 2000;151(4):789-800.
101. Sirotkin V, Beltzner CC, Marchand J-B, Pollard TD. Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *The Journal of cell biology*. 2005;170(4):637-48.
102. Skau CT, Kovar DR. Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. *Current biology : CB*. 2010;20(16):1415-22.
103. Chen Q, Pollard TD. Actin filament severing by cofilin dismantles actin patches and produces mother filaments for new patches. *Current biology : CB*. 2013;23(13):1154-62.
104. Gachet Y, Hyams JS. Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *Journal of Cell Science*. 2005;118(18):4231-42.
105. Carnahan RH, Gould KL. The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in Schizosaccharomyces pombe. *The Journal of cell biology*. 2003;162(5):851-62.
106. Wu J-Q, Sirotkin V, Kovar DR, Lord M, Beltzner CC, Kuhn JR, et al. Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *The Journal of cell biology*. 2006;174(3):391-402.
107. Martin SG. Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends in Cell Biology*. 2009;19(9):447-54.
108. Minc N, Bratman SV, Basu R, Chang F. Establishing new sites of polarization by microtubules. *Current biology : CB*. 2009;19(2):83-94.
109. Tay YD, Leda M, Goryachev AB, Sawin KE. Local and global Cdc42 GEFs for fission yeast cell polarity are coordinated by microtubules and the Tea1/Tea4/Pom1 axis. Cold Spring Harbor Laboratory; 2017.

110. Feierbach B, Chang F. Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Current Biology*. 2001;11(21):1656-65.
111. Martin SG, Chang F. Dynamics of the Formin For3p in Actin Cable Assembly. *Current Biology*. 2006;16(12):1161-70.
112. Martin SG, Rincón SA, Basu R, Pérez P, Chang F. Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(10):4155-67.
113. Balasubramanian MK, Helfman DM, Hemmingsen SM. A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast *S. pombe*. *Nature*. 1992;360(6399):84-7.
114. Pelham RJ, Chang F. Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Cell Biology*. 2001;3(3):235-44.
115. Motegi F, Arai R, Mabuchi I. Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(5):1367-80.
116. Mulvihill DP, Edwards SR, Hyams JS. A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2006;63(3):149-61.
117. Coffman VC, Sees JA, Kovar DR, Wu J-Q. The formins Cdc12 and For3 cooperate during contractile ring assembly in cytokinesis. *The Journal of cell biology*. 2013;203(1):101-14.
118. Kovar DR, Kuhn JR, Tichy AL, Pollard TD. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *The Journal of cell biology*. 2003;161(5):875-87.
119. Pelham RJ, Chang F. Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature*. 2002;419(6902):82-6.
120. Pollard TD, Wu J-Q. Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(2):149-55.
121. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1496(1):3-22.
122. Shutova MS, Svitkina TM. Common and Specific Functions of Nonmuscle Myosin II Paralogs in Cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(12):1459-68.
123. Berg JS, Powell BC, Cheney RE. A millennial myosin census. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(4):780-94.
124. Baker JP, Titus MA. Myosins: matching functions with motors. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(1):80-6.

125. Mooseker MS, Cheney RE. Unconventional Myosins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1995;11(1):633-75.
126. Sellers JR, Knight PJ. Folding and regulation in myosins II and V. *J Muscle Res Cell Motil*. 2007;28(7-8):363-70.
127. Thirumurugan K, Sakamoto T, Hammer JA, 3rd, Sellers JR, Knight PJ. The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5. *Nature*. 2006;442(7099):212-5.
128. Guhathakurta P, Prochniewicz E, Grant BD, Peterson KC, Thomas DD. High-throughput screen, using time-resolved FRET, yields actin-binding compounds that modulate actin-myosin structure and function. *J Biol Chem*. 2018;293(31):12288-98.
129. Coluccio LM, Geeves MA. Transient kinetic analysis of the 130-kDa myosin I (MYR-1 gene product) from rat liver. A myosin I designed for maintenance of tension? *J Biol Chem*. 1999;274(31):21575-80.
130. De La Cruz EM, Ostap EM. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(1):61-7.
131. Krendel M, Mooseker MS. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:239-51.
132. Odrionitz F, Kollmar M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol*. 2007;8(9):R196.
133. Wang K, Okada H, Bi E. Comparative Analysis of the Roles of Non-muscle Myosin-IIs in Cytokinesis in Budding Yeast, Fission Yeast, and Mammalian Cells. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:593400-.
134. Chung S, Takizawa PA. Multiple Myo4 motors enhance ASH1 mRNA transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2010;189(4):755-67.
135. Gu Y, Yam C, Oliferenko S. Rewiring of cellular division site selection in evolution of fission yeasts. *Current biology : CB*. 2015;25(9):1187-94.
136. Yasuda T, Takaine M, Numata O, Nakano K. Anillin-related protein Mid1 regulates timely formation of the contractile ring in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Genes Cells*. 2016;21(6):594-607.
137. Clayton JE, Sammons MR, Stark BC, Hodges AR, Lord M. Differential Regulation of Unconventional Fission Yeast Myosins via the Actin Track. *Current Biology*. 2010;20(16):1423-31.
138. Gachet Y, Mulvihill DP, Hyams JS. The Fission Yeast Actomyosin Cytoskeleton. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 225-42.

139. Toya M, Motegi F, Nakano K, Mabuchi I, Yamamoto M. Identification and functional analysis of the gene for type I myosin in fission yeast. *Genes to Cells*. 2001;6(3):187-99.
140. Attanapola SL, Alexander CJ, Mulvihill DP. Ste20-kinase-dependent TEDS-site phosphorylation modulates the dynamic localisation and endocytic function of the fission yeast class I myosin, Myo1. *Journal of Cell Science*. 2009;122(21):3856-61.
141. Codlin S, Haines RL, Mole SE. btn1 affects endocytosis, polarization of sterol-rich membrane domains and polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Traffic*. 2008;9(6):936-50.
142. Itadani A, Nakamura T, Hirata A, Shimoda C. *Schizosaccharomyces pombe* calmodulin, Cam1, plays a crucial role in sporulation by recruiting and stabilizing the spindle pole body components responsible for assembly of the forespore membrane. *Eukaryotic cell*. 2010;9(12):1925-35.
143. Takeda T, Chang F. Role of Fission Yeast Myosin I in Organization of Sterol-Rich Membrane Domains. *Current Biology*. 2005;15(14):1331-6.
144. Adamek N, Coluccio LM, Geeves MA. Calcium sensitivity of the cross-bridge cycle of Myo1c, the adaptation motor in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5710-5.
145. Wilson-Grady JT, Villén J, Gygi SP. Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res*. 2008;7(3):1088-97.
146. Bement WM, Mooseker MS. TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1995;31(2):87-92.
147. Win TZ, Gachet Y, Mulvihill DP, May KM, Hyams JS. Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring. *Journal of Cell Science*. 2001;114(1):69-79.
148. Lo Presti L, Chang F, Martin SG. Myosin Vs organize actin cables in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2012;23(23):4579-91.
149. Hodges AR, Bookwalter CS, Kremontsova EB, Trybus KM. A nonprocessive class V myosin drives cargo processively when a kinesin-related protein is a passenger. *Curr Biol*. 2009;19(24):2121-5.
150. Reck-Peterson SL, Tyska MJ, Novick PJ, Mooseker MS. The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *J Cell Biol*. 2001;153(5):1121-6.

151. Taft MH, Hartmann FK, Rump A, Keller H, Chizhov I, Manstein DJ, et al. Dictyostelium myosin-5b is a conditional processive motor. *J Biol Chem.* 2008;283(40):26902-10.
152. Tóth J, Kovács M, Wang F, Nyitray L, Sellers JR. Myosin V from *Drosophila* reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *J Biol Chem.* 2005;280(34):30594-603.
153. Laplante C, Berro J, Karatekin E, Hernandez-Leyva A, Lee R, Pollard TD. Three myosins contribute uniquely to the assembly and constriction of the fission yeast cytokinetic contractile ring. *Current biology : CB.* 2015;25(15):1955-65.
154. Mata J, Lyne R, Burns G, Bähler J. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet.* 2002;32(1):143-7.
155. Doyle A, Martín-García R, Coulton AT, Bagley S, Mulvihill DP. Fission yeast Myo51 is a meiotic spindle pole body component with discrete roles during cell fusion and spore formation. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 23):4330-40.
156. Grallert A, Martín-García R, Bagley S, Mulvihill DP. In vivo movement of the type V myosin Myo52 requires dimerisation but is independent of the neck domain. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 23):4093-8.
157. D'Souza VM, Naqvi NI, Wang H, Balasubramanian MK. Advances in Cytokinesis Research. Interactions of Cdc4p, a Myosin Light Chain, with IQ-domain Containing Proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Structure and Function.* 2001;26(6):555-65.
158. Coulton AT, East DA, Galinska-Rakoczy A, Lehman W, Mulvihill DP. The recruitment of acetylated and unacetylated tropomyosin to distinct actin polymers permits the discrete regulation of specific myosins in fission yeast. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 19):3235-43.
159. Bezanilla M, Forsburg SL, Pollard TD. Identification of a second myosin-II in *Schizosaccharomyces pombe*: Myp2p is conditionally required for cytokinesis. *Molecular biology of the cell.* 1997;8(12):2693-705.
160. Kitayama C, Sugimoto A, Yamamoto M. Type II myosin heavy chain encoded by the myo2 gene composes the contractile ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of cell biology.* 1997;137(6):1309-19.
161. Motegi F, Nakano K, Kitayama C, Yamamoto M, Mabuchi I. Identification of Myo3, a second type-II myosin heavy chain in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters.* 1997;420(2-3):161-6.
162. McCollum D, Balasubramanian MK, Pelcher LE, Hemmingsen SM, Gould KL. *Schizosaccharomyces pombe* cdc4+ gene encodes a novel EF-hand protein essential for cytokinesis. *The Journal of cell biology.* 1995;130(3):651-60.

163. Goff XL, Motegi F, Salimova E, Mabuchi I, Simanis V. The *S. pombe rlc1* gene encodes a putative myosin regulatory light chain that binds the type II myosins myo3p and myo2p. *Journal of Cell Science*. 2000;113(23):4157-63.
164. May KM, Watts FZ, Jones N, Hyams JS. Type II myosin involved in cytokinesis in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1997;38(4):385-96.
165. Wu J-Q, Kuhn JR, Kovar DR, Pollard TD. Spatial and Temporal Pathway for Assembly and Constriction of the Contractile Ring in Fission Yeast Cytokinesis. *Developmental Cell*. 2003;5(5):723-34.
166. Bezanilla M, Pollard TD. Myosin-II tails confer unique functions in *Schizosaccharomyces pombe*: characterization of a novel myosin-II tail. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(1):79-91.
167. Fujita M, Sugiura R, Lu Y, Xu L, Xia Y, Shuntoh H, et al. Genetic interaction between calcineurin and type 2 myosin and their involvement in the regulation of cytokinesis and chloride ion homeostasis in fission yeast. *Genetics*. 2002;161(3):971-81.
168. Mulvihill DP, Win TZ, Pack TP, Hyams JS. Cytokinesis in fission yeast: A myosin pas de deux. *Microscopy Research and Technique*. 2000;49(2):152-60.
169. Okada H, Wloka C, Wu J-Q, Bi E. Distinct Roles of Myosin-II Isoforms in Cytokinesis under Normal and Stressed Conditions. *iScience*. 2019;14:69-87.
170. Palani S, Chew TG, Ramanujam S, Kamnev A, Harne S, Chapa-Y-Lazo B, et al. Motor Activity Dependent and Independent Functions of Myosin II Contribute to Actomyosin Ring Assembly and Contraction in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current biology : CB*. 2017;27(5):751-7.
171. Zambon P, Palani S, Kamnev A, Balasubramanian MK. Myo2p is the major motor involved in actomyosin ring contraction in fission yeast. *Current biology : CB*. 2017;27(3):R99-R100.
172. Wang K, Wloka C, Bi E. Non-muscle Myosin-II Is Required for the Generation of a Constriction Site for Subsequent Abscission. *iScience*. 2019;13:69-81.
173. Trybus KM. Filamentous smooth muscle myosin is regulated by phosphorylation. *The Journal of cell biology*. 1989;109(6 Pt 1):2887-94.
174. Tan JL, Ravid S, Spudich JA. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:721-59.
175. Ronen D, Ravid S. Myosin II tailpiece determines its paracrystal structure, filament assembly properties, and cellular localization. *J Biol Chem*. 2009;284(37):24948-57.

176. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(11):778-90.
177. Pecci A, Ma X, Savoia A, Adelstein RS. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene.* 2018;664:152-67.
178. Garrido-Casado M, Asensio-Juárez G, Vicente-Manzanares M. Nonmuscle Myosin II Regulation Directs Its Multiple Roles in Cell Migration and Division. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2021;37(1):285-310.
179. Komatsu S, Yano T, Shibata M, Tuft RA, Ikebe M. Effects of the Regulatory Light Chain Phosphorylation of Myosin II on Mitosis and Cytokinesis of Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(44):34512-20.
180. Jordan P, Karess R. Myosin light chain-activating phosphorylation sites are required for oogenesis in *Drosophila*. *The Journal of cell biology.* 1997;139(7):1805-19.
181. Ostrow BD, Chen P, Chisholm RL. Expression of a myosin regulatory light chain phosphorylation site mutant complements the cytokinesis and developmental defects of *Dictyostelium* RMLC null cells. *The Journal of cell biology.* 1994;127(6 Pt 2):1945-55.
182. Naqvi NI, Wong KCY, Tang X, Balasubramanian MK. Type II myosin regulatory light chain relieves auto-inhibition of myosin-heavy-chain function. *Nature Cell Biology.* 2000;2(11):855-8.
183. Rincon SA, Paoletti A. Molecular control of fission yeast cytokinesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2016;53:28-38.
184. Sladewski TE, Previs MJ, Lord M. Regulation of fission yeast myosin-II function and contractile ring dynamics by regulatory light-chain and heavy-chain phosphorylation. *Molecular biology of the cell.* 2009;20(17):3941-52.
185. Loo T-H, Balasubramanian M. *Schizosaccharomyces pombe* Pak-related protein, Pak1p/Orb2p, phosphorylates myosin regulatory light chain to inhibit cytokinesis. *The Journal of cell biology.* 2008;183(5):785-93.
186. Magliozzi JO, Sears J, Cressey L, Brady M, Opalko HE, Kettenbach AN, et al. Fission yeast Pak1 phosphorylates anillin-like Mid1 for spatial control of cytokinesis. *Cold Spring Harbor Laboratory;* 2019.
187. Lens SMA, Medema RH. Cytokinesis defects and cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2018;19(1):32-45.
188. Normand G, King RW. Understanding cytokinesis failure. *Advances in experimental medicine and biology.* 2010;676:27-55.

189. Srivastava V, Iglesias PA, Robinson DN. Cytokinesis: Robust cell shape regulation. *Seminars in cell & developmental biology*. 2016;53:39-44.
190. Glotzer M. Cytokinesis in Metazoa and Fungi. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(10):a022343.
191. Oliferenko S, Chew TG, Balasubramanian MK. Positioning cytokinesis. *Genes & Development*. 2009;23(6):660-74.
192. Sohrmann M, Fankhauser C, Brodbeck C, Simanis V. The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes & Development*. 1996;10(21):2707-19.
193. Akamatsu M, Berro J, Pu K-M, Tebbs IR, Pollard TD. Cytokinetic nodes in fission yeast arise from two distinct types of nodes that merge during interphase. *The Journal of cell biology*. 2014;204(6):977-88.
194. Morrell JL, Nichols CB, Gould KL. The GIN4 family kinase, Cdr2p, acts independently of septins in fission yeast. *Journal of Cell Science*. 2004;117(22):5293-302.
195. Moseley JB, Mayeux A, Paoletti A, Nurse P. A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature*. 2009;459(7248):857-60.
196. Celton-Morizur Sv, Racine V, Sibarita J-B, Paoletti A. Pom1 kinase links division plane position to cell polarity by regulating Mid1p cortical distribution. *Journal of Cell Science*. 2006;119(22):4710-8.
197. Padte NN, Martin SG, Howard M, Chang F. The Cell-End Factor Pom1p Inhibits Mid1p in Specification of the Cell Division Plane in Fission Yeast. *Current Biology*. 2006;16(24):2480-7.
198. Martin SG, Berthelot-Grosjean M. Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature*. 2009;459(7248):852-6.
199. Rincón SA, Ye Y, Villar-Tajadura MA, Santos B, Martin SG, Pérez P. Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(20):4390-9.
200. Almonacid M, Celton-Morizur S, Jakubowski JL, Dingli F, Loew D, Mayeux A, et al. Temporal control of contractile ring assembly by Plo1 regulation of myosin II recruitment by Mid1/anillin. *Current biology : CB*. 2011;21(6):473-9.
201. Bähler J, Pringle JR. Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes & development*. 1998;12(9):1356-70.
202. Daga RR, Yonetani A, Chang F. Asymmetric Microtubule Pushing Forces in Nuclear Centering. *Current Biology*. 2006;16(15):1544-50.

203. Chang F, Drubin D, Nurse P. *cdc12p*, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *The Journal of cell biology*. 1997;137(1):169-82.
204. Fankhauser C, Reymond A, Cerutti L, Utzig S, Hofmann K, Simanis V. The *S. pombe cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell*. 1995;82(3):435-44.
205. Roberts-Galbraith RH, Gould KL. Setting the F-BAR: Functions and regulation of the F-BAR protein family. *Cell Cycle*. 2010;9(20):4091-7.
206. Celton-Morizur S, Bordes N, Fraisier V, Tran PT, Paoletti A. C-terminal anchoring of *mid1p* to membranes stabilizes cytokinetic ring position in early mitosis in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(24):10621-35.
207. Rincon SA, Estravis M, Dingli F, Loew D, Tran PT, Paoletti A. SIN-Dependent Dissociation of the SAD Kinase *Cdr2* from the Cell Cortex Resets the Division Plane. *Current Biology*. 2017;27(4):534-42.
208. Eng K, Naqvi NI, Wong KCY, Balasubramanian MK. *Rng2p*, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the actomyosin ring and the spindle pole body. *Current Biology*. 1998;8(11):611-21.
209. Padmanabhan A, Bakka K, Sevugan M, Naqvi Naweed I, D'Souza V, Tang X, et al. IQGAP-Related *Rng2p* Organizes Cortical Nodes and Ensures Position of Cell Division in Fission Yeast. *Current Biology*. 2011;21(6):467-72.
210. Tebbs IR, Pollard TD. Separate roles of IQGAP *Rng2p* in forming and constricting the *Schizosaccharomyces pombe* cytokinetic contractile ring. *Molecular biology of the cell*. 2013;24(12):1904-17.
211. Clifford DM, Wolfe BA, Roberts-Galbraith RH, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Gould KL. The *Clp1/Cdc14* phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related *Mid1*. *The Journal of cell biology*. 2008;181(1):79-88.
212. Willet AH, McDonald NA, Bohnert KA, Baird MA, Allen JR, Davidson MW, et al. The F-BAR *Cdc15* promotes contractile ring formation through the direct recruitment of the formin *Cdc12*. *The Journal of cell biology*. 2015;208(4):391-9.
213. Yonetani A, Lustig RJ, Moseley JB, Takeda T, Goode BL, Chang F. Regulation and targeting of the fission yeast formin *cdc12p* in cytokinesis. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(5):2208-19.
214. Lu J, Pollard TD. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(4):1161-75.

215. Paul AS, Pollard TD. The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. *Current biology : CB*. 2008;18(1):9-19.
216. Skau CT, Neidt EM, Kovar DR. Role of tropomyosin in formin-mediated contractile ring assembly in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(8):2160-73.
217. Willet AH, McDonald NA, Gould KL. Regulation of contractile ring formation and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current opinion in microbiology*. 2015;28:46-52.
218. Coffman VC, Nile AH, Lee IJ, Liu H, Wu J-Q. Roles of formin nodes and myosin motor activity in Mid1p-dependent contractile-ring assembly during fission yeast cytokinesis. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(24):5195-210.
219. Huang J, Huang Y, Yu H, Subramanian D, Padmanabhan A, Thadani R, et al. Nonmedially assembled F-actin cables incorporate into the actomyosin ring in fission yeast. *The Journal of cell biology*. 2012;199(5):831-47.
220. Bohnert KA, Grzegorzewska AP, Willet AH, Vander Kooi CW, Kovar DR, Gould KL. SIN-dependent phosphoinhibition of formin multimerization controls fission yeast cytokinesis. *Genes & development*. 2013;27(19):2164-77.
221. Willet AH, Bohnert KA, Gould KL. Cdk1-dependent phosphoinhibition of a formin-F-BAR interaction opposes cytokinetic contractile ring formation. *Molecular biology of the cell*. 2018;29(6):713-21.
222. Vavylonis D, Wu J-Q, Hao S, O'Shaughnessy B, Pollard TD. Assembly Mechanism of the Contractile Ring for Cytokinesis by Fission Yeast. *Science*. 2008;319(5859):97-100.
223. Zimmermann D, Homa KE, Hocky GM, Pollard LW, De La Cruz EM, Voth GA, et al. Mechanoregulated inhibition of formin facilitates contractile actomyosin ring assembly. *Nature communications*. 2017;8(1):703-.
224. Takaine M, Numata O, Nakano K. Fission yeast IQGAP arranges actin filaments into the cytokinetic contractile ring. *The EMBO Journal*. 2009;28(20):3117-31.
225. Laporte D, Ojkic N, Vavylonis D, Wu J-Q.  $\alpha$ -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Molecular biology of the cell*. 2012;23(16):3094-110.
226. Lord M, Pollard TD. UCS protein Rng3p activates actin filament gliding by fission yeast myosin-II. *The Journal of cell biology*. 2004;167(2):315-25.
227. Arai R, Mabuchi I. F-actin ring formation and the role of F-actin cables in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*. 2002;115(5):887-98.

228. Chang F. Movement of a cytokinesis factor cdc12p to the site of cell division. *Current Biology*. 1999;9(15):849-S2.
229. Kamasaki T, Arai R, Osumi M, Mabuchi I. Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nature Cell Biology*. 2005;7(9):916-7.
230. Hachet O, Simanis V. Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes & development*. 2008;22(22):3205-16.
231. Mishra M, Kashiwazaki J, Takagi T, Srinivasan R, Huang Y, Balasubramanian MK, et al. In vitro contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics. *Nature Cell Biology*. 2013;15(7):853-9.
232. Huang Y, Yan H, Balasubramanian MK. Assembly of normal actomyosin rings in the absence of Mid1p and cortical nodes in fission yeast. *The Journal of cell biology*. 2008;183(6):979-88.
233. Kamasaki T, Osumi M, Mabuchi I. Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *The Journal of cell biology*. 2007;178(5):765-71.
234. Wu J-Q, Pollard TD. Counting Cytokinesis Proteins Globally and Locally in Fission Yeast. *Science*. 2005;310(5746):310-4.
235. Roberts-Galbraith RH, Chen J-S, Wang J, Gould KL. The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *The Journal of cell biology*. 2009;184(1):113-27.
236. Samejima I, Miller VJ, Rincon SA, Sawin KE. Fission yeast Mto1 regulates diversity of cytoplasmic microtubule organizing centers. *Current biology : CB*. 2010;20(21):1959-65.
237. G Cortés JC, Ramos M, Konomi M, Barragán I, Moreno MB, Alcaide-Gavilán M, et al. Specific detection of fission yeast primary septum reveals septum and cleavage furrow ingression during early anaphase independent of mitosis completion. *PLoS genetics*. 2018;14(5):e1007388-e.
238. Johnson AE, McCollum D, Gould KL. Polar opposites: Fine-tuning cytokinesis through SIN asymmetry. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 2012;69(10):686-99.
239. Simanis V. *Pombe's thirteen – control of fission yeast cell division by the septation initiation network*. *Journal of Cell Science*. 2015.
240. Stachowiak MR, Laplante C, Chin HF, Guirao B, Karatekin E, Pollard TD, et al. Mechanism of cytokinetic contractile ring constriction in fission yeast. *Developmental cell*. 2014;29(5):547-61.

241. Michelot A, Berro J, Guérin C, Boujemaa-Paterski R, Staiger CJ, Martiel J-L, et al. Actin-Filament Stochastic Dynamics Mediated by ADF/Cofilin. *Current Biology*. 2007;17(10):825-33.
242. Proctor SA, Minc N, Boudaoud A, Chang F. Contributions of turgor pressure, the contractile ring, and septum assembly to forces in cytokinesis in fission yeast. *Current biology : CB*. 2012;22(17):1601-8.
243. Thiyagarajan S, Munteanu EL, Arasada R, Pollard TD, O'Shaughnessy B. The fission yeast cytokinetic contractile ring regulates septum shape and closure. *Journal of cell science*. 2015;128(19):3672-81.
244. García Cortés JC, Ramos M, Osumi M, Pérez P, Ribas JC. The Cell Biology of Fission Yeast Septation. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2016;80(3):779-91.
245. Sipiczki M. Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Research*. 2007;7(6):761-70.
246. Cortés JCG, Konomi M, Martins IM, Muñoz J, Moreno MB, Osumi M, et al. The (1,3) $\beta$ -d-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Molecular Microbiology*. 2007;65(1):201-17.
247. Cortés JCG, Katoh-Fukui R, Moto K, Ribas JC, Ishiguro J. *Schizosaccharomyces pombe* Pmr1p is essential for cell wall integrity and is required for polarized cell growth and cytokinesis. *Eukaryotic cell*. 2004;3(5):1124-35.
248. Vos A, Dekker N, Distel B, Leunissen JAM, Hochstenbach F. Role of the Synthase Domain of Ags1p in Cell Wall  $\alpha$ -Glucan Biosynthesis in Fission Yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(26):18969-79.
249. Zhou Z, Munteanu EL, He J, Ursell T, Bathe M, Huang KC, et al. The contractile ring coordinates curvature-dependent septum assembly during fission yeast cytokinesis. *Molecular biology of the cell*. 2015;26(1):78-90.
250. Arasada R, Pollard TD. Contractile ring stability in *S. pombe* depends on F-BAR protein Cdc15p and Bgs1p transport from the Golgi complex. *Cell reports*. 2014;8(5):1533-44.
251. Cortés JCG, Pujol N, Sato M, Pinar M, Ramos M, Moreno B, et al. Cooperation between Paxillin-like Protein Pxl1 and Glucan Synthase Bgs1 Is Essential for Actomyosin Ring Stability and Septum Formation in Fission Yeast. *PLoS genetics*. 2015;11(7):e1005358-e.
252. Liu J, Wang H, McCollum D, Balasubramanian MK. Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 1999;153(3):1193-203.

253. Cortés JCG, Ramos M, Osumi M, Pérez P, Ribas JC. Fission yeast septation. *Communicative & integrative biology*. 2016;9(4):e1189045-e.
254. Jin Q-W, Zhou M, Bimbo A, Balasubramanian MK, McCollum D. A role for the septation initiation network in septum assembly revealed by genetic analysis of *sid2-250* suppressors. *Genetics*. 2006;172(4):2101-12.
255. Ren L, Willet AH, Roberts-Galbraith RH, McDonald NA, Feoktistova A, Chen J-S, et al. The Cdc15 and Imp2 SH3 domains cooperatively scaffold a network of proteins that redundantly ensure efficient cell division in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2015;26(2):256-69.
256. Arasada R, Pollard TD. A role for F-BAR protein Rga7p during cytokinesis in *S. pombe*. *Journal of cell science*. 2015;128(13):2259-68.
257. Berlin A, Paoletti A, Chang F. Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *The Journal of Cell Biology*. 2003;160(7):1083-92.
258. Tasto JJ, Morrell JL, Gould KL. An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *The Journal of cell biology*. 2003;160(7):1093-103.
259. Dekker N, Speijer D, Grün CH, van den Berg M, de Haan A, Hochstenbach F. Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(8):3903-14.
260. Martín-Cuadrado AB, Morrell JL, Konomi M, An H, Petit C, Osumi M, et al. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(10):4867-81.
261. García I, Jiménez D, Martín V, Durán A, Sánchez Y. The  $\alpha$ -glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biology of the Cell*. 2005;97(7):569-76.
262. Atilgan E, Magidson V, Khodjakov A, Chang F. Morphogenesis of the Fission Yeast Cell through Cell Wall Expansion. *Current biology : CB*. 2015;25(16):2150-7.
263. Cortés JCG, Sato M, Muñoz J, Moreno MB, Clemente-Ramos JA, Ramos M, et al. Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *The Journal of cell biology*. 2012;198(4):637-56.
264. Sipiczki M, Bozsik A. The use of morphomutants to investigate septum formation and cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Archives of Microbiology*. 2000;174(6):386-92.
265. Alonso-Nuñez ML, An H, Martín-Cuadrado AB, Mehta S, Petit C, Sipiczki M, et al. Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(4):2003-17.

266. Dekker N, de Haan A, Hochstenbach F. Transcription regulation of the  $\alpha$ -glucanase gene *agn1* by cell separation transcription factor Ace2p in fission yeast. *FEBS Letters*. 2006;580(13):3099-106.
267. Perez P, Rincón Sergio A. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochemical Journal*. 2010;426(3):243-53.
268. Pérez P, Portales E, Santos B. Rho4 interaction with exocyst and septins regulates cell separation in fission yeast. *Microbiology*. 2015;161(5):948-59.
269. Santos B, Martín-Cuadrado AB, Vázquez de Aldana CR, del Rey F, Pérez P. Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryotic cell*. 2005;4(10):1639-45.
270. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2011;75(1):50-83.
271. Hohmann S, Mager WH. Introduction. *Topics in Current Genetics*: Springer Berlin Heidelberg. p. 1-9.
272. Zuin A, Castellano-Esteve D Fau - Ayté J, Ayté J Fau - Hidalgo E, Hidalgo E. Living on the edge: stress and activation of stress responses promote lifespan extension. (1945-4589 (Electronic)).
273. Molenaar D, van Berlo R, de Ridder D, Teusink B. Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Molecular systems biology*. 2009;5:323-.
274. De Deken RH. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology*. 1966;44(2):149-56.
275. Galdieri L, Mehrotra S, Yu S, Vancura A. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omics : a journal of integrative biology*. 2010;14(6):629-38.
276. Takeda K, Yanagida M. In quiescence of fission yeast, autophagy and the proteasome collaborate for mitochondrial maintenance and longevity. *Autophagy*. 2010;6(4):564-5.
277. Takeda K, Starzynski C, Mori A, Yanagida M. The critical glucose concentration for respiration-independent proliferation of fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mitochondrion*. 2015;22:91-5.
278. Malecki M, Bähler J. Identifying genes required for respiratory growth of fission yeast. *Wellcome open research*. 2016;1:12-.

279. Roux AE, Leroux A, Alaamery MA, Hoffman CS, Chartrand P, Ferbeyre G, et al. Probing effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS genetics*. 2009;5(3):e1000408-e.
280. Stephan JS, Yeh Y-Y, Ramachandran V, Deminoff SJ, Herman PK. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(40):17049-54.
281. Hoffman CS. Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 1):257-60.
282. Welton RM, Hoffman CS. Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics*. 2000;156(2):513-21.
283. Ivey FD, Hoffman CS. Direct activation of fission yeast adenylate cyclase by the Gpa2 Galpha of the glucose signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):6108-13.
284. Sjøberg K, Skålhegg BS. The Molecular Basis for Specificity at the Level of the Protein Kinase a Catalytic Subunit. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:538.
285. Hall RA, Turner KJ, Chaloupka J, Cottier F, De Sordi L, Sanglard D, et al. The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*. 2011;10(8):1034-42.
286. Tang Y, McLeod M. In vivo activation of protein kinase A in *Schizosaccharomyces pombe* requires threonine phosphorylation at its activation loop and is dependent on PDK1. *Genetics*. 2004;168(4):1843-53.
287. Gupta DR, Paul SK, Oowatari Y, Matsuo Y, Kawamukai M. Multistep regulation of protein kinase A in its localization, phosphorylation and binding with a regulatory subunit in fission yeast. *Current Genetics*. 2011;57(5):353-65.
288. Kunitomo H, Higuchi T, Iino Y, Yamamoto M. 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*. 2000;11(9):3205-17.
289. Higuchi T, Watanabe Y, Yamamoto M. Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(1):1-11.
290. Kato T, Zhou X, Ma Y. Possible involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in glucose deprivation-induced activation of transcription factor *rst2*. *PloS one*. 2013;8(10):e78012-e.

291. Takenaka K, Tanabe T, Kawamukai M, Matsuo Y. Overexpression of the transcription factor Rst2 in *Schizosaccharomyces pombe* indicates growth defect, mitotic defects, and microtubule disorder. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2018;82(2):247-57.
292. Vassiliadis D, Wong KH, Andrianopoulos A, Monahan BJ. A genome-wide analysis of carbon catabolite repression in *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC genomics*. 2019;20(1):251-.
293. Blüthgen N, Legewie S. Systems analysis of MAPK signal transduction. *Essays in Biochemistry*. 2008;45(1):95.
294. Gacto M, Soto T, Vicente-Soler J, Villa TsG, Cansado J. Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *International Microbiology*. 2003;6(3):211-9.
295. Umekawa M, Ujihara M, Makishima K, Yamamoto S, Takematsu H, Wakayama M. The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of  $\alpha$ -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2016;1860(6):1192-201.
296. Gartner A, Nasmyth K, Ammerer G. Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes & Development*. 1992;6(7):1280-92.
297. Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD, et al. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(7):5097-106.
298. Vázquez B, Soto T, del Dedo JE, Franco A, Vicente J, Hidalgo E, et al. Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast. *Cellular Signalling*. 2015;27(12):2534-42.
299. Bardwell L. Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochemical Society transactions*. 2006;34(Pt 5):837-41.
300. Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*. 1995;5(7):747-57.
301. Martín H, Flández M, Nombela C, Molina M. Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Molecular Microbiology*. 2005;58(1):6-16.
302. Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(6):479-90.
303. Maris C, Dominguez C, Allain FH. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs j*. 2005;272(9):2118-31.

304. Pancevac C, Goldstone DC, Ramos A, Taylor IA. Structure of the Rna15 RRM-RNA complex reveals the molecular basis of GU specificity in transcriptional 3'-end processing factors. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(9):3119-32.
305. Auweter SD, Fasan R, Reymond L, Underwood JG, Black DL, Pitsch S, et al. Molecular basis of RNA recognition by the human alternative splicing factor Fox-1. *Embo j.* 2006;25(1):163-73.
306. Mazza C, Segref A, Mattaj JW, Cusack S. Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *Embo j.* 2002;21(20):5548-57.
307. Oberstrass FC, Auweter SD, Erat M, Hargous Y, Henning A, Wenter P, et al. Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation. *Science.* 2005;309(5743):2054-7.
308. Bono F, Ebert J, Lorentzen E, Conti E. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell.* 2006;126(4):713-25.
309. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science.* 1998;281(5379):1001-5.
310. Lee JH, Schütte D, Wulf G, Füzesi L, Radzun HJ, Schweyer S, et al. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum Mol Genet.* 2006;15(2):201-11.
311. Li W, Deng X, Chen J. RNA-binding proteins in regulating mRNA stability and translation: roles and mechanisms in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022;86(Pt 2):664-77.
312. Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(5):1193-8.
313. Grishin NV. KH domain: one motif, two folds. *Nucleic acids research.* 2001;29(3):638-43.
314. Martin KC, Ephrussi A. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell.* 2009;136(4):719-30.
315. Meyuhas O, Kahan T. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(7):801-11.
316. Avni D, Biberman Y, Meyuhas O. The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(5):995-1001.
317. Avni D, Shama S, Loreni F, Meyuhas O. Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells:

characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol Cell Biol.* 1994;14(6):3822-33.

318. Cockman E, Anderson P, Ivanov P. TOP mRNPs: Molecular Mechanisms and Principles of Regulation. *Biomolecules.* 2020;10(7).

319. Harvey RF, Smith TS, Mulrone T, Queiroz RML, Pizzinga M, Dezi V, et al. Transacting translational regulatory RNA binding proteins. *Wiley interdisciplinary reviews RNA.* 2018;9(3):e1465-e.

320. Iida T, Kobayashi T. RNA Polymerase I Activators Count and Adjust Ribosomal RNA Gene Copy Number. *Mol Cell.* 2019;73(4):645-54.e13.

321. Satoh R, Morita T, Takada H, Kita A, Ishiwata S, Doi A, et al. Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Molecular biology of the cell.* 2009;20(9):2473-85.

322. Ivanov A, Mikhailova T, Eliseev B, Yeramala L, Sokolova E, Susorov D, et al. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(16):7766-76.

323. Eberhardt W, Doller A, Akool el S, Pfeilschifter J. Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther.* 2007;114(1):56-73.

324. Hasan A, Cotobal C, Duncan CDS, Mata J. Systematic analysis of the role of RNA-binding proteins in the regulation of RNA stability. *PLoS genetics.* 2014;10(11):e1004684-e.

325. Harigaya Y, Tanaka H, Yamanaka S, Tanaka K, Watanabe Y, Tsutsumi C, et al. Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature.* 2006;442(7098):45-50.

326. Sugiyama T, Sugioka-Sugiyama R. Red1 promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetatively growing fission yeast. *Embo j.* 2011;30(6):1027-39.

327. Satoh R, Matsumura Y, Tanaka A, Takada M, Ito Y, Hagihara K, et al. Spatial regulation of the KH domain RNA-binding protein Rnc1 mediated by a Crm1-independent nuclear export system in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Microbiology.* 2017;104(3):428-48.

328. Madrid M, Soto T, Khong HK, Franco A, Vicente J, Pérez P, et al. Stress-induced Response, Localization, and Regulation of the Pmk1 Cell Integrity Pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(4):2033-43.

329. Madrid M, Núñez A, Soto T, Vicente-Soler J, Gacto M, Cansado J. Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-

activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(11):4405-19.

330. Satoh R, Hara N, Kawasaki A, Takasaki T, Sugiura R. Distinct modes of stress granule assembly mediated by the KH-type RNA-binding protein Rnc1. *Genes Cells*. 2018;23(9):778-85.

331. Shiozaki K, Russell P. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature*. 1995;378(6558):739-43.

332. Wilkinson MG, Samuels M, Takeda T, Toone WM, Shieh JC, Toda T, et al. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & Development*. 1996;10(18):2289-301.

333. Degols G, Shiozaki K, Russell P. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(6):2870-7.

334. Degols G, Russell P. Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(6):3356-63.

335. Millar JB, Buck V, Wilkinson MG. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & Development*. 1995;9(17):2117-30.

336. Shiozaki K, Russell P. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes & Development*. 1996;10(18):2276-88.

337. Soto T, Beltrán FF, Paredes V, Madrid M, Millar JBA, Vicente-Soler J, et al. Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry*. 2002;269(20):5056-65.

338. Quinn J, Findlay VJ, Dawson K, Millar JBA, Jones N, Morgan BA, et al. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(3):805-16.

339. Shieh JC, Wilkinson MG, Buck V, Morgan BA, Makino K, Millar JB. The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes & Development*. 1997;11(8):1008-22.

340. Shiozaki K, Shiozaki M, Russell P. Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Molecular biology of the cell*. 1997;8(3):409-19.

341. Aoyama K, Mitsubayashi Y, Aiba H, Mizuno T. Spy1, a histidine-containing phosphotransfer signaling protein, regulates the fission yeast cell cycle through the Mcs4 response regulator. *Journal of bacteriology*. 2000;182(17):4868-74.
342. Nguyen AN, Lee A, Place W, Shiozaki K. Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(4):1169-81.
343. Ohmiya R, Kato C, Yamada H, Aiba H, Mizuno T. A Fission Yeast Gene (*prrl+*) That Encodes a Response Regulator Implicated in Oxidative Stress Response. *Journal of Biochemistry*. 1999;125(6):1061-6.
344. Nguyen AN, Shiozaki K. Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes & development*. 1999;13(13):1653-63.
345. Buck V, Quinn J, Soto Pino T, Martin H, Saldanha J, Makino K, et al. Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(2):407-19.
346. Cottarel G. Mcs4, a two-component system response regulator homologue, regulates the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle control. *Genetics*. 1997;147(3):1043-51.
347. Nakamichi N, Yamada H, Aoyama K, Ohmiya R, Aiba H, Mizuno T. His-to-Asp Phosphorelay Circuitry for Regulation of Sexual Development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002;66(12):2663-72.
348. Morigasaki S, Ikner A, Tatebe H, Shiozaki K. Response regulator-mediated MAPKKK heteromer promotes stress signaling to the Spc1 MAPK in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2013;24(7):1083-92.
349. Samejima I, Mackie S, Fantes PA. Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *The EMBO journal*. 1997;16(20):6162-70.
350. Shiozaki K, Shiozaki M, Russell P. Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Molecular biology of the cell*. 1998;9(6):1339-49.
351. Rodríguez-Gabriel MA, Russell P. Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*. 2005;4(8):1396-402.
352. Nguyen AN, Ikner AD, Shiozaki M, Warren SM, Shiozaki K. Cytoplasmic localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(8):2651-63.

353. Kato T, Okazaki K, Murakami H, Stettler S, Fantes PA, Okayama H. Stress signal, mediated by a Hogl-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Letters*. 1996;378(3):207-12.
354. George VT, Brooks G, Humphrey TC. Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(10):4168-79.
355. Mutavchiev DR, Leda M, Sawin KE. Remodeling of the Fission Yeast Cdc42 Cell-Polarity Module via the Sty1 p38 Stress-Activated Protein Kinase Pathway. *Current biology : CB*. 2016;26(21):2921-8.
356. Soto T, Núñez A, Madrid M, Vicente J, Gacto M, Cansado J. Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*. 2007;153(5):1519-29.
357. Gaits F, Degols G, Shiozaki K, Russell P. Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes & development*. 1998;12(10):1464-73.
358. Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, et al. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular biology of the cell*. 2003;14(1):214-29.
359. Lawrence CL, Maekawa H, Worthington JL, Reiter W, Wilkinson CRM, Jones N. Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(8):5160-70.
360. Sansó M, Gogol M, Ayté J, Seidel C, Hidalgo E. Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryotic cell*. 2008;7(5):826-35.
361. Gómez-Gil E, Martín-García R, Vicente-Soler J, Franco A, Vázquez-Marín B, Prieto-Ruiz F, et al. Stress-activated MAPK signaling controls fission yeast actomyosin ring integrity by modulating formin For3 levels. *Elife*. 2020;9.
362. Farooq A, Zhou M-M. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular Signalling*. 2004;16(7):769-79.
363. Gaits F, Russell P. Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/Sty1 in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(5):1395-407.
364. Neely LA, Hoffman CS. 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*. 2000;20(17):6426-34.

365. Pérez-Díaz AJ, Vázquez-Marín B, Vicente-Soler J, Prieto-Ruiz F, Soto T, Franco A, et al. cAMP-Protein kinase A and stress-activated MAP kinase signaling mediate transcriptional control of autophagy in fission yeast during glucose limitation or starvation. *Autophagy*. 2023;19(4):1311-31.

366. Asada R, Takemata N, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K. Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. *Molecular and cellular biology*. 2015;35(5):847-55.

367. Oda A, Takemata N, Hirata Y, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, et al. Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation. *Genes to Cells*. 2015;20(5):392-407.

368. Venigalla RK, Turner M. RNA-binding proteins as a point of convergence of the PI3K and p38 MAPK pathways. *Front Immunol*. 2012;3:398.

369. Soni S, Saroch MK, Chander B, Tirpude NV, Padwad YS. MAPKAPK2 plays a crucial role in the progression of head and neck squamous cell carcinoma by regulating transcript stability. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):175.

370. Shabb JB. Physiological Substrates of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Chemical Reviews*. 2001;101(8):2381-412.

371. DeWane G, Salvi AM, DeMali KA. Fueling the cytoskeleton - links between cell metabolism and actin remodeling. *Journal of cell science*. 2021;134(3):jcs248385.

372. Shiraishi T, Verdone JE, Huang J, Kahlert UD, Hernandez JR, Torga G, et al. Glycolysis is the primary bioenergetic pathway for cell motility and cytoskeletal remodeling in human prostate and breast cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(1):130-43.

373. Bays JL, Campbell HK, Heidema C, Sebbagh M, DeMali KA. Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK. *Nature cell biology*. 2017;19(6):724-31.

374. Fujiwara I, Zweifel ME, Courtemanche N, Pollard TD. Latrunculin A Accelerates Actin Filament Depolymerization in Addition to Sequestering Actin Monomers. *Current biology : CB*. 2018;28(19):3183-92.e2.

375. Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature Cell Biology*. 2000;2(6):376-8.

376. Asadi F, Michalski D, Karagiannis J. A Genetic Screen for Fission Yeast Gene Deletion Mutants Exhibiting Hypersensitivity to Latrunculin A. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(10):3399-408.

## BIBLIOGRAFÍA

377. Herrero-de-Dios C, Alonso-Monge R, Pla J. The lack of upstream elements of the Cek1 and Hog1 mediated pathways leads to a synthetic lethal phenotype upon osmotic stress in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 2014;69:31-42.
378. Okamoto S, Furuya K, Nozaki S, Aoki K, Niki H. Synchronous activation of cell division by light or temperature stimuli in the dimorphic yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Eukaryot Cell*. 2013;12(9):1235-43.

JUSTIFICACIÓN

Y

OBJETIVOS

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La citocinesis, permite la separación física de las células hijas una vez ha finalizado la mitosis, consiste en la formación del CAR formado por filamentos de actina y miosina tipo II, cuya actividad está finamente regulada por la fosforilación de su RLC. En eucariotas, las vías de señalización de MAPK, conservadas evolutivamente, desempeñan un papel fundamental durante la respuesta adaptativa a las señales ambientales. *S. pombe* presenta exclusivamente tres rutas de MAPK, lo que lo hace un modelo especialmente atractivo para su estudio. Por otro lado, en esta levadura la citocinesis es un proceso altamente coordinado y regulado, en el que numerosas proteínas intervienen en el proceso por lo que, de igual manera que en otros organismos eucariotas, existen numerosas rutas de señalización cuya actividad tiene un impacto significativo en el desarrollo de la citocinesis.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia regulación de la magnitud de la respuesta de las rutas de MAPKs. Tanto es así que no solamente intervienen las fosfatasa de MAP quinasa para reducir la actividad de la MAPK central si no también existen otras proteínas encargadas de modular la expresión tanto de proteínas del módulo como sus reguladores directos. Las proteínas de unión a ARNm juegan un papel clave estabilizando/desestabilizando los ARNm de diferentes proteínas. En *S. pombe*, la Rnc1 se ha descrito como un regulador negativo de la actividad de la MAPK Pmk1, al regular positivamente la estabilidad del ARNm de Pmp1. Además, en *S. pombe* existe una interconexión funcional entre la ruta CIP y la ruta de MAP quinasa de respuesta a estrés (SAPK) a través de las fosfatasa de MAP quinasa. Sin embargo, desconocemos si también la proteína Rnc1 puede actuar también regulando la estabilidad de los ARNm de elementos de la ruta SAPK y si esta unión estabiliza o desestabiliza dichos ARNm.

Por otro lado, las miosinas son una superfamilia de proteínas que se desplazan por filamentos de actina lo que deriva en diversas funciones como la endocitosis, el transporte de vesículas y la citocinesis. Su actividad motora se encuentra altamente regulada por la RLC. En *S. pombe* se ha descrito que Rlc1 es la cadena ligera reguladora tanto de Myo2 como de Myp2. Además, es fosforilado por Pak1. Sin embargo, el papel de la fosforilación de Rlc1 como regulador positivo o negativo de la actividad de Myo2/Myp2 no está del todo claro, pues algunos estudios sugieren que su papel es positivo para la actividad de la miosina mientras que otros sugieren que es negativo. Además, resultados recientes de nuestro grupo indican que la integridad del CAR se encuentra regulada negativamente por la actividad de la ruta SAPK a través de la forma nucleadora de cables interfásicos For3, lo que sugiere una colaboración estrecha entre los cables interfásicos y la citocinesis.

Finalmente, diversos estudios han puesto de manifiesto que la citocinesis influye de manera crítica en el desarrollo filamentoso en levaduras dimórficas. Mutantes nulos en miosinas tipo II no esenciales o bien mutantes de pérdida de función de la misma tienen como consecuencia una miceliación pobre y defectuosa. Sin embargo,

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

desconocemos si existe una relación funcional entre ambos procesos en *S. japonicus*. Curiosamente, podemos observar en células interfásicas de esta levadura la presencia de nodos de miosina II a diferencia de lo que ocurre en *S. pombe*, lo que sugiere una clara divergencia evolutiva con respecto a *S. pombe*, lo que podría indicar un posible papel como regulador de la transición levadura-hifa mediado por la actividad de la miosina II.

En base a estas evidencias previas, en la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en estudiar la interacción funcional entre la maquinaria que regula el crecimiento polarizado, la citocinesis y la ruta de MAPK de respuesta a estrés en levaduras con fisión con el fin de analizar la divergencia evolutiva en dos organismos modelo del género *Schizosaccharomyces*. Para ello, he abordado tres objetivos principales:

**1. Estudio de la proteína de unión a ARNm Rnc1 como posible regulador de la actividad de la ruta de MAPKs de respuesta a estrés.**

Los resultados obtenidos derivados del desarrollo de este objetivo han sido publicados en el artículo:

- RNA-Binding Protein Rnc1 Regulates Cell Length at Division and Acute Stress Response in Fission Yeast through Negative Feedback Modulation of the StressActivated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway.” *mBio* (2020). <https://doi.org/10.1128/mBio.02815-19>.

**2. Relación funcional entre la actividad de la miosina II por la fosforilación de su cadena ligera reguladora y la disponibilidad de cables de actina en respuesta a cambios en el metabolismo mediado por la actividad de la ruta SAPK.**

Los resultados derivados de este objetivo han sido publicados en el artículo:

- Myosin II regulatory light chain phosphorylation and formin availability modulate cytokinesis upon changes in carbohydrate metabolism. *eLife*, 2023. <https://doi.org/10.7554/eLife.83285>.

**3. Divergencia evolutiva del control de la citocinesis y el dimorfismo mediado por la actividad de la miosina II por la fosforilación de su cadena ligera reguladora.**

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de este objetivo han sido publicados en el siguiente artículo:

- Divergence of cytokinesis and dimorphism control by myosin II regulatory light chain in fission yeasts. *iScience*, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107611>.

PUBLICACIONES

## PUBLICACIÓN 1

**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**

Francisco Prieto-Ruiz<sup>1</sup>, Jero Vicente-Soler<sup>1</sup>, Alejandro Franco<sup>1</sup>, Elisa Gómez-Gil<sup>1</sup>, Marta Sánchez-Marinás<sup>2</sup>, Beatriz Vázquez-Marín<sup>1</sup>, Rosa Aligué<sup>2</sup>, Marisa Madrid<sup>1</sup>, Sergio Moreno<sup>3</sup>, Teresa Soto<sup>1</sup>, José Cansado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Yeast Physiology Group, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, Spain*

<sup>2</sup>*Department of Biomedical Sciences, Facultat de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain*

<sup>3</sup>*Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain*

RNA-binding proteins (RBPs) play a major role during control of mRNA localization, stability, and translation and are central to most cellular processes. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the multiple K homology (KH) domain RBP Rnc1 downregulates the activity of the cell integrity pathway (CIP) via stabilization of pmp1 mRNA, which encodes the Pmp1 phosphatase that inactivates Pmk1, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) component of this signaling cascade. However, Rnc1 likely regulates the half-life/stability of additional mRNAs. We show that Rnc1 downregulates the activity of Sty1, the MAPK of the stress-activated MAPK pathway (SAPK), during control of cell length at division and recovery in response to acute stress. Importantly, this control strictly depends on Rnc1's ability to bind mRNAs encoding activators (Wak1 MAPKKK, Wis1 MAPKK) and downregulators (Atf1 transcription factor, Pyp1 and Pyp2 phosphatases) of Sty1 phosphorylation through its KH domains. Moreover, Sty1 is responsible for Rnc1 phosphorylation in vivo at multiple phosphosites during growth and stress, and these modifications trigger Rnc1 for proper binding and destabilization of the above mRNA targets. Phosphorylation by Sty1 prompts Rnc1-dependent mRNA destabilization to negatively control SAPK signaling, thus revealing an additional feedback mechanism that allows precise tuning of MAPK activity during unperturbed cell growth and stress.

*mBio*, Enero 2020

<https://doi.org/10.1128/mBio.02815-19>.

## PUBLICACIÓN 2

**Myosin II regulatory light chain phosphorylation and formin availability modulate cytokinesis upon changes in carbohydrate metabolism**

Francisco Prieto-Ruiz<sup>1</sup>, Elisa Gómez-Gil<sup>1,2</sup>, Rebeca Martín-García<sup>3</sup>, Armando Jesús Pérez-Díaz<sup>1</sup>, Jero Vicente-Soler<sup>1</sup>, Alejandro Franco<sup>1</sup>, Teresa Soto<sup>1</sup>, Pilar Pérez<sup>3</sup>, Marisa Madrid<sup>1</sup>, José Cansado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Yeast Physiology Group, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, Spain*

<sup>2</sup>*The Francis Crick Institute, London, United Kingdom*

<sup>3</sup>*Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain*

Cytokinesis, the separation of daughter cells at the end of mitosis, relies in animal cells on a contractile actomyosin ring (CAR) composed of actin and class II myosins, whose activity is strongly influenced by regulatory light chain (RLC) phosphorylation. However, in simple eukaryotes such as the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, RLC phosphorylation appears dispensable for regulating CAR dynamics. We found that redundant phosphorylation at Ser35 of the *S. pombe* RLC homolog Rlc1 by the p21-activated kinases Pak1 and Pak2, modulates myosin II Myo2 activity and becomes essential for cytokinesis and cell growth during respiration. Previously, we showed that the stress-activated protein kinase pathway (SAPK) MAPK Sty1 controls fission yeast CAR integrity by downregulating formin For3 levels (Gómez-Gil *et al.*, 2020). Here, we report that the reduced availability of formin For3-nucleated actin filaments for the CAR is the main reason for the required control of myosin II contractile activity by RLC phosphorylation during respiration-induced oxidative stress. Thus, the restoration of For3 levels by antioxidants overrides the control of myosin II function regulated by RLC phosphorylation, allowing cytokinesis and cell proliferation during respiration. Therefore, fine-tuned interplay between myosin II function through Rlc1 phosphorylation and environmentally controlled actin filament availability is critical for a successful cytokinesis in response to a switch to a respiratory carbohydrate metabolism.

*eLife*, Febrero 2023

<https://doi.org/10.7554/eLife.83285>

## PUBLICACIÓN 3

**Divergence of cytokinesis and dimorphism control by myosin II regulatory light chain in fission yeasts**

Francisco Prieto-Ruiz<sup>1</sup>, Elisa Gómez-Gil<sup>2</sup>, Jero Vicente-Soler<sup>1</sup>, Alejandro Franco<sup>1</sup>, Teresa Soto<sup>1</sup>, Marisa Madrid<sup>1</sup>, José Cansado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Yeast Physiology Group, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, Spain*

<sup>2</sup>*The Francis Crick Institute, London, United Kingdom*

Non-muscle myosin II activation by regulatory light chain (Rlc1<sup>Sp</sup>) phosphorylation at Ser35 is crucial for cytokinesis during respiration in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We show that in the early divergent and dimorphic fission yeast *S. japonicus* non-phosphorylated Rlc1<sup>Sj</sup> regulates the activity of Myo2<sup>Sj</sup> and Myp2<sup>Sj</sup> heavy chains during cytokinesis. Intriguingly, Rlc1<sup>Sj</sup>-Myo2<sup>Sj</sup> nodes delay yeast to hyphae onset but are essential for mycelial development. Structure-function analysis revealed that phosphorylation-induced folding of Rlc1<sup>Sp</sup>  $\alpha$ 1 helix into an open conformation allows precise regulation of Myo2<sup>Sp</sup> during cytokinesis. Consistently, inclusion of bulky tryptophan residues in the adjacent  $\alpha$ 5 helix triggered Rlc1<sup>Sp</sup> shift and supported cytokinesis in absence of Ser35 phosphorylation. Remarkably, unphosphorylated Rlc1 lacking the  $\alpha$ 1 helix was competent to regulate *S. pombe* cytokinesis during respiration. Hence, early diversification resulted in two efficient phosphorylation-independent and -dependent modes of Rlc1 regulation of myosin II activity in fission yeasts, the latter being conserved through evolution.

*iScience*, Agosto, 2023

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107611>

CONCLUSIONES

## 6.1. Conclusiones específicas

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de esta Tesis Doctoral han permitido elaborar las siguientes conclusiones, agrupadas de acuerdo a los objetivos planteados inicialmente:

### **Objetivo 1: Estudio de la proteína de unión a ARNm Rnc1 como posible regulador de la actividad de la ruta de MAPKs de respuesta a estrés.**

Conclusiones:

- La ausencia de Rnc1 produce una mayor actividad basal y en respuesta a estrés de Sty1. Sin embargo, las células *rnc1Δ* presentan una menor actividad en respuesta a estrés de Pmk1.
- Las células *rnc1Δ* presentan una menor longitud en división como consecuencia del incremento en la actividad basal de Sty1.
- El mutante nulo *rnc1Δ* presenta una mayor tolerancia al estrés agudo por alta temperatura comparado con las células de una cepa silvestre.
- Rnc1 es fosforilado en respuesta a estrés térmico, estrés por arsenito y ayuno de glucosa por Sty1 en hasta 6 posibles residuos consenso de MAPK (T50, T45, T171, T177, S278, y S286), que se encuentran fuera de los motivos KH de unión al ARNm.
- La fosforilación de Rnc1 por Sty1 permite la unión específica a los ARNm de las proteínas Wak1, Wis1, Atf1, Pyp1 y Pyp2.
- La unión de Rnc1 a los ARNm mencionados provoca su desestabilización y, en consecuencia, degradación de los mismos.

### **Objetivo 2: Relación funcional entre la actividad de la miosina II por la fosforilación de su cadena ligera reguladora y la disponibilidad de cables de actina en respuesta a cambios en el metabolismo mediado por la actividad de la ruta SAPK.**

Conclusiones:

- Rlc1 es fosforilado específicamente en el residuo S35 por Pak1 y Pak2, teniendo lugar la fosforilación de esta última exclusivamente durante la respiración.
- La fosforilación de Rlc1 en S35 es esencial durante la respiración, pues tanto la falta de la proteína como la ausencia de fosforilación impiden la proliferación en estas condiciones y un claro retraso en la dinámica de citocinesis.

## CONCLUSIONES

- Pak2 se expresa en condiciones de estrés nutricional de manera dependiente de Rst2 y Ste11, provocando que Pak2 colabore con Pak1 para fosforilar a Rlc1 en estas condiciones.
- La actividad de Sty1 aumenta durante la respiración como consecuencia del incremento de ROS intracelular.
- La fosforilación de Rlc1 en S35 se vuelve esencial durante la respiración debido a la baja disponibilidad de cables de actina nucleados por For3 impuesto por el incremento en la actividad de Sty1.
- La adición de una versión constitutivamente activa de For3, de GSH o la ausencia de actividad de la ruta SAPK alivian el fenotipo de la ausencia de Rlc1.
- La fosforilación de Rlc1 en S35 en respiración regula fundamentalmente la actividad de Myo2.

**Objetivo 3: Divergencia evolutiva del control de la citocinesis y el dimorfismo mediado por la actividad de la miosina II por la fosforilación de su cadena ligera reguladora.**

Conclusiones:

- La ausencia de Rlc1<sup>Sj</sup> en *S. japonicus* presenta los mismos defectos en citocinesis que la delección en *S. pombe*.
- Rlc1<sup>Sj</sup> regula negativamente la transición levadura-hifa pero su presencia es necesaria para que las células puedan miceliar adecuadamente.
- Rlc1<sup>Sj</sup> regula la actividad tanto de Myo2<sup>Sj</sup> como Myp2<sup>Sj</sup> en *S. japonicus*.
- Rlc1<sup>Sj</sup> no es fosforilado en *S. japonicus*. La introducción de una versión fosforilable (Rlc1<sup>Sp</sup> y Rlc1<sup>Sj</sup>(N23S)) provoca fenotipos similares a la pérdida de función. Sin embargo, la introducción de una versión silvestre de Rlc1<sup>Sj</sup> en *S. pombe* es completamente funcional.
- La fosforilación de Rlc1<sup>Sp</sup> en S35 produce un cambio conformacional en la proteína adquiriendo una conformación abierta permitiendo regular la actividad de Myo2<sup>Sp</sup>. Además, la versión no fosforilable Rlc1<sup>Sj</sup> ya presenta una conformación extendida sin necesidad de fosforilación.

### 6.2. Conclusiones generales

Los resultados derivados de esta Tesis Doctoral en su conjunto nos permiten extraer las siguientes conclusiones generales:

- Las proteínas de unión a ARNm constituyen otro punto de apoyo como reguladores para modular la magnitud de la respuesta de la MAPK central de diversas rutas de MAPKs regulando positiva o negativamente la estabilidad de ARNm implicados en la activación o inhibición de la misma.

## CONCLUSIONES

- La citocinesis es un proceso que está altamente influenciado por las condiciones nutricionales. Es por ello que es un proceso perfectamente coordinado y regulado donde la regulación de la actividad de la miosina II por la fosforilación de su RLC resulta crítica para llevar a cabo la citocinesis de manera adecuada.
- La divergencia evolutiva en las especies del género *Schizosaccharomyces* ha tenido como consecuencia el desarrollo de dos mecanismos de control de la citocinesis dependientes e independientes de la fosforilación de la RLC como modulador de la actividad de la miosina II.