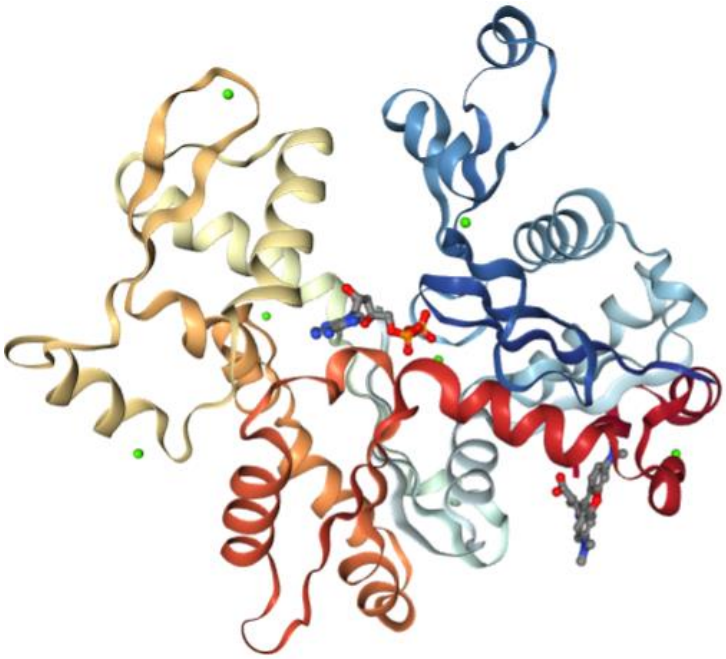

Trabajo de Fin de grado en Biotecnología:

Análisis preliminar del papel de Rho1p en el citoesqueleto de actina en *Schizosaccharomyces pombe*

The preliminary analysis of Rho1p in the yeast actin cytoskeleton

Sandra Isidro Jorge

Febrero de 2020

FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

ibfg Instituto de Biología Funcional y Genómica

Resumen

Las GTPasas de la familia Rho son proteínas clave en la organización del crecimiento, regulan el citoesqueleto de actina y están conservadas evolutivamente. Estas proteínas juegan un papel muy importante no solo en el crecimiento de las levaduras sino también en procesos como el desarrollo neuronal o el cáncer. En *S. pombe*, se sabe que la GTPasa Rho1p participa en la síntesis de la pared celular, pero se sabe muy poco de su función reguladora del citoesqueleto de actina. Se ha visto que la depleción de Rho1 va acompañada de la desaparición de la actina polimerizada y su incremento produce cúmulos de actina no polarizada. En este trabajo, hemos sobreexpresado Rho1 y sus GEFs en una serie de mutantes de proteínas de unión a actina que regulan la nucleación, la estabilidad, el intercambio de nucleósido en los monómeros, etc con el propósito de detectar posibles candidatos que puedan interaccionar con Rho1. Hemos visto que la sobreexpresión de Rho1 mejora el crecimiento en los mutantes de la formina Cdc12, de la tropomiosina Cdc8 y de la miosina Cdc4, todos ellos involucrados en la formación y estabilización del anillo de actomiosina.

Abstract

Rho GTPases are conserved molecules that control cytoskeletal dynamics. These proteins also play very important roles in processes such as neuronal development or cancer progression. Fission yeast Rho1 has been involved in cell wall biosynthesis, however little is known about its regulatory function of the actin cytoskeleton. In this sense, it has been shown that Rho1 depletion is accompanied by the disappearance of the polymerized actin, while an increase in Rho1 produces clusters of unpolarized actin.

In this work, we have overexpressed Rho1 and its GEFs (Rgf1, Rgf2 and Rgf3) in a series of mutants of actin-binding protein which regulate nucleation, stability, monomers nucleoside exchange, etc. in order to detect potential candidates that can interact with Rho1. We saw that Rho1 overexpression improves the growth of a formin mutant (*cdc12*), a tropomyosin mutant *(cdc8*) and a myosin mutant (*cdc4*). All of them are involved in the formation and the stabilization of the actomyosin ring.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Ciclo de vida 1

1.2. Ciclo celular y ciclo morfogenético 2

1.3. Regulación de la morfología y la polaridad: El citoesqueleto de actina 3

1.3.1. Los parches de actina 4

1.3.2. Los cables de actina 5

1.3.3. El anillo contráctil de actomiosina 5

1.4. GTPasas de la familia Rho 6

1.5. La GTPasa Rho1 de *S. Pombe* 7

1.5.1. Activadores de Rho1p 7

1.5.2. Rgf2 y Rgf3 8

1.5.3. Rgf1 8

2. MATERIALES Y MÉTODOS 9

2.1. Microorganismos empleados 9

2.2. Plásmidos empleados y construidos en este trabajo 10

2.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento 11

2.3.1. Medios de cultivo para *S. pombe* 11

2.3.2. Medios de cultivo para *E. coli* 12

2.4. Procedimientos generales de biología molecular 12

2.4.1. Conjugación 12

2.4.2. Obtención de cepas por "*random spores*" 12

2.4.3. Obtención de DNA 12

2.4.4. Tratamientos enzimáticos del DNA 13

2.4.5. Transformación de *E. coli* 13

2.4.6. Transformación de *S. pombe* 13

2.4.7. Reacción en cadena de polimerasa 13

2.4.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa 14

2.4.9. Ensayo de viabilidad celular en placa 14

2.5. Técnicas de microscopía 15

2.6. Presentación de datos 15

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS **16**

3.1. Antecedentes 16

3.2. Objetivos 16

4. RESULTADOS **17**

4.1. Viabilidad de mutantes de proteínas reguradoras del citoesqueleto de actina a temperaturas semi-permisivas con sobreexpresión de Rho1 y Rgf1 17

4.1.1. Sobreexpresión de Rho1 en un mutante en el gen de la actina, *cps8-188* 18

4.1.2. Sobreexpresión de Rho1 en mutantes de proteínas reguladoras de la polimerización de la actina profilina (*cdc3*-6) y cofilina (*adf1*-1) 18

4.1.3. Sobreexpresión de Rho1 en mutantes de proteínas reguladoras de los cables de actina, la formina cdc12 y la tropomiosina cdc8 20

4.1.4. Sobreexpresión de Rho1 en el mutante *arp3-c1* que forma parte de los parches de actina 21

4.1.5. Sobreexpresión de Rho1 en el mutante de la cadena ligera de la miosina de clase II Myo2, *cdc4-8* 22

4.1.6. Sobreexpresión de Rho1 en el mutante de Arp9 que forma parte del complejo remodelador de cromatina RSC 22

4.2. Sobreexpresión de Rgf1, Rgf2 y Rgf3 en mutantes de tropomiosina y de formina 24

4.3. Construcción de plásmidos pAU-*rho1*$^{+}$ 24

4.4. Visualización de actina en los mutantes *cdc8-117*, *cdc12-112* y *arp9***Δ** 25

4.5. Conclusiones 27

5. BIBLIOGRAFÍA **28**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ciclo de vida

El organismo que se utiliza en este trabajo es *Schizosaccharomyces pombe* también conocida como levadura de fisión (the fission yeast). *S. pombe* fue aislada de una cerveza de mijo africana y pertenece al phillum Ascomicota. La etimología del nombre se refiere a una levadura (-*saccharomyces*), que se divide por fisión (*Schizo*-) y el significado de *pombe* es el de cerveza en Swahili (1). *S. pombe* es un organismo modelo empleado en el estudio de procesos biológicos como polaridad, ciclo celular y morfogénesis. No es patógeno, tiene un ciclo celular corto (aprox 2,5h) y es susceptible de análisis genético clásico y molecular. Su genoma esta secuenciado desde el 2002 y tiene un tamaño de 13,8 megabases (Mb) repartido en tres cromosomas de 5'7, 4'6 y 3'5 Mb (2).

Las células de *S. pombe* presentan un ciclo de vida haplodiplonte. Las cepas que se usan en el laboratorio son normalmente haploides (heterotálicas) y pertenecen a dos tipos sexuales conocidos como h^+ y h^-. Ante la escasez de nutrientes (sobre todo de nitrógeno) se produce la conjugación entre tipos sexuales opuestos formando zigotos diploides heterocigóticos (**Figura 1**). La conjugación está mediada por feromonas y se inicia con la formación de una evaginación llamada "schmoo" en uno de los polos celulares que está orientada a la fuente de feromonas de tipo sexual opuesto. Seguidamente, las células se unen por parejas y se fusionan, formando un zigoto diploide. Los zigotos entran en meiosis y forman cuatro esporas haploides que germinan cuando las condiciones nutritivas son adecuadas (3,4). Las células silvestres suelen ser cepas homotálicas (h^{90}) y se caracterizan porque pueden cambiar su tipo sexual y cruzarse entre sí. Mutaciones en cepas h^{90} dieron lugar a las cepas heterotálicas que no se pueden revertir ni cruzarse entre sí, al ser tan estables son muy útiles en el laboratorio (5).

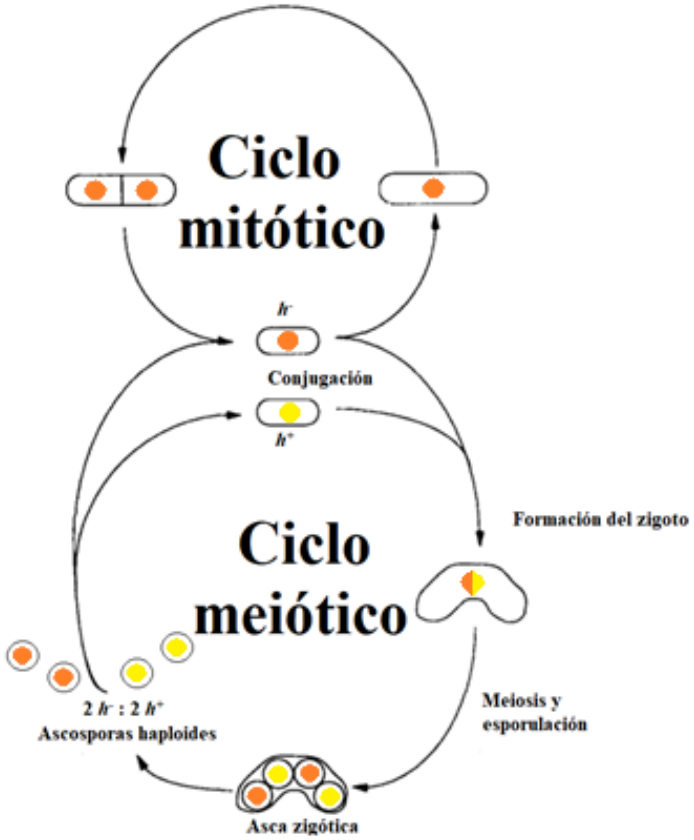

Figura 1. Ciclo de vida de *S. pombe.*

Por otro lado, *S. pombe* también se puede reproducir de forma asexual, este proceso se lleva a cabo mediante fisión transversal al eje axial de la célula y termina con la construcción de un septo que limita las dos células hijas del mismo tamaño.

Las células haploides tienen forma cilíndrica y crecen por los polos. Presentan un diámetro constante de 3-4 µm y 7-8 µm de longitud y pueden alcanzar 14 µm de longitud antes de dividirse. Las células diploides también tienen forma cilíndrica y crecen por los polos, pero suelen ser más grandes que las haploides, con un tamaño en longitud de entre 10-14 µm aunque pueden alcanzar 20-25 µm antes de dividirse.

1.2. Ciclo celular y ciclo morfogenético

El crecimiento de *S. pombe* se produce de forma polarizada y asimétrica y está coordinado con el ciclo celular (**Figura 2**). El ciclo celular consta de las fases G1, S, G2 y M y el tiempo de generación oscila entre 2-3,5 horas dependiendo de las condiciones de temperatura y nutrientes. *S. pombe* presenta una fase G_2 muy amplia que abarca aproximadamente el 70% del ciclo. Tras duplicar su material genético y alcanzar un tamaño mínimo, la célula entra en mitosis y sus núcleos se separan. En este momento comienza la formación del septo mientras las células, aun unidas, entran en una fase G_1 muy corta. Posteriormente las nuevas células duplican su material genético (fase S) coincidiendo con la septación, de forma que todas las células hijas recién separadas emergen en la fase G_2 de su ciclo celular.

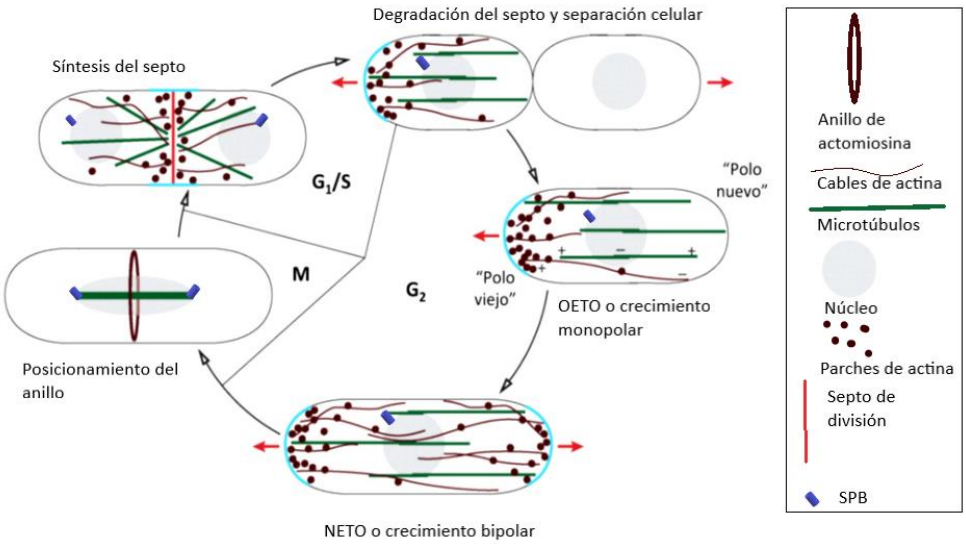

Figura 2. Ciclo morfogenético de *S. pombe.* Figura adaptada de (8)

El crecimiento polarizado está regulado por la red de interacciones entre el citoesqueleto de actina, los microtúbulos y la maquinaria del ciclo celular. Una vez finalizada la citocinesis, se produce un periodo conocido como OETO (*Old End Take Off*) en el que las células crecen de forma monopolar por el polo que ya existía en la célula madre o "polo viejo" situándose en este polo los parches de actina. El crecimiento monopolar continúa hasta un punto de la fase G2 en el que se activa el

crecimiento por el polo nuevo (que se ha formado durante la división celular). Tras esta transición conocida como NETO (*New End Take Off*) los parches de actina se sitúan en ambos polos y la célula aumenta su tamaño mediante la extensión de ambos polos (6).

En cuanto la mitosis comienza, el crecimiento celular se va pausando hasta que se para. En ese momento, la maquinaria biosintética se mueve al centro de la célula, donde se ensambla el anillo contráctil de actomiosina (CAR) y se sitúan los parches de actina (7,8). Este anillo se contrae tras la separación de los núcleos, en este punto también se adiciona nueva membrana y se depositan los polímeros de la pared celular que originará el septo de división (9).

Por otro lado, los microtúbulos se organizan en 3-5 haces que se originan desde el *Spindle Pole Body* (SPB), la membrana nuclear o el citoplasma durante la interfase. Los microtúbulos interfásicos rodean al núcleo y controlan su posición que a su vez determina la posición del sitio de división (10,11). Durante la mitosis, los microtúbulos citoplasmáticos se desacoplan y se forma el huso mitótico y los microtúbulos astrales desde el SPB (12). Durante la citoquinesis se desacopla el huso mitótico y se forma el Post-Anaphase Array (PAA), cuya misión es estabilizar el anillo de actomiosina y mantener alejados de la zona de división a los núcleos de las células hijas (13,14). El final del ciclo morfológico lo marca la degradación del septo y la separación de las células hijas.

1.3. Regulación de la morfología y la polaridad: El citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto está formado por tres familias de proteínas que se ensamblan formando tres clases de filamentos que varían en cantidad y función dependiendo del organismo eucariota en el que se encuentren. Así, en levaduras hay una red densa de filamentos que ocupa la mayor parte del citoplasma, soporta la membrana celular y nuclear y organiza el contenido celular. En *S. pombe* el citoesqueleto está constituido principalmente por los microtúbulos y las distintas formas de actina, ambos controlan el crecimiento polarizado.

La actina es una de las proteínas más abundantes y altamente conservada en células eucariotas y es esencial para su supervivencia. En *S. pombe*, la actina está codificada por el gen *act1*$^{+}$ y se puede encontrar en dos formas o estados: actina globular o G-actina, que se encuentra en mucha menos cantidad y actina polimerizada o filamentosa, F-actina.

En *S. pombe* el citoesqueleto de actina es bastante simple y se organiza en tres tipos estructuras: los parches de actina, los cables de actina y el anillo contráctil de actomiosina (**Figura 3**) (15). Además de los parches, cables y el anillo, hay una cuarta estructura de actina que aparece únicamente en la

fase de conjugación (durante la reproducción sexual), en el punto en el que la levadura se alarga formando el "schmoo" para unirse a otra de tipo sexual opuesto.

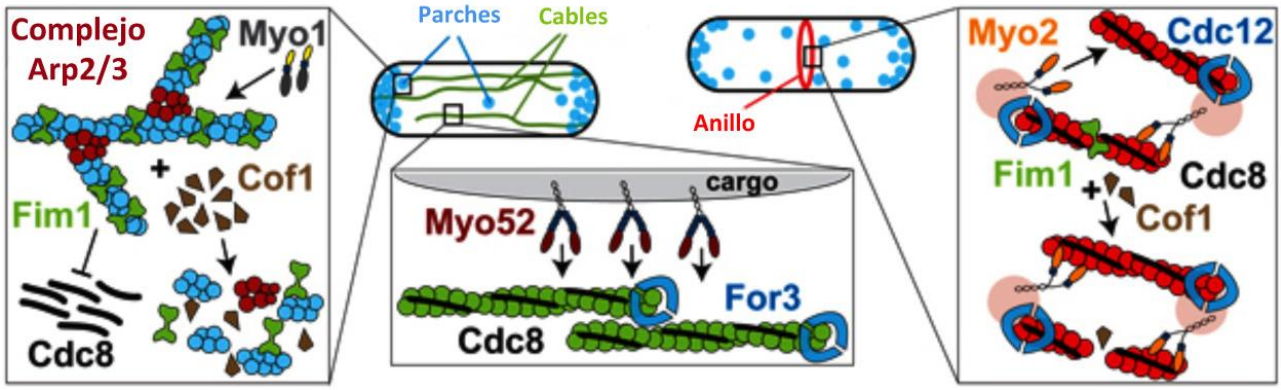

Figura 3. Proteínas asociadas a la actina en las diferentes estructuras. Figura adaptada de (16).

1.3.1. Los parches de actina

Los parches de actina son filamentos cortos y ramificados muy dinámicos que se ensamblan en los sitios de endocitosis durante el crecimiento polarizado (polos) y en el centro de células en división (17). Por ello, su función ha estado relacionada con la síntesis y remodelación de la pared celular (16).

Hoy sabemos que la nucleación de los parches de actina es llevada a cabo por el complejo Arp 2/3 (*actin related protein*) que está formado por las subunidades Arp 2 y Arp 3 que son dos proteínas muy similares a la actina y otras cinco proteínas únicas, la mayoría esenciales (18). Para que la síntesis de los parches se produzca de *novo* el complejo Arp 2/3 debe ser estimulado por factores promotores de nucleación. Los más conocidos son: Pan1 que es similar al adaptador endocítico Eps15, Wsp1 perteneciente a la familia WASP (*Wiscott-Aldrich Syndrome Protein*) y la miosina de tipo I Myo1 (19,20).

Además de los parches de actina, algunas Arps son componentes estructurales de complejos remodeladores de cromatina como es el caso de Arp7 y Arp9 que forman parte de los complejos SWI/SNF y RSC *(Remodelling the Structure of Chromatin*). Estos complejos utilizan la energía de hidrólisis del ATP para impedir las interacciones histona-DNA y alterar localmente el estado de la cromatina (21).

En los parches de actina también se encuentran proteínas responsables de la estabilidad y la regulación de la dinámica de los parches. Entre ellas destacan la fimbrina (Fim1) que da rigidez a la estructura del parche de actina; la profilina (Cdc3), es una proteína de unión a actina implicada en la nucleación y polimeración de los filamentos de actina; la coronina (Crn1) que se asocia a los parches y determina

la extensión de los filamentos de actina; y las cofilinas (Adf1 y Gmf1), que se unen a los filamentos e inducen su ruptura en fragmentos más cortos para que el parche de actina se desensamble de forma más rápida al finalizar el proceso de endocitosis asociado a la internalización del parche (16).

1.3.2. Los cables de actina

Los cables de actina se extienden a lo largo del eje longitudinal de las células en interfase orientados de tal manera que la inserción de nuevos monómeros ocurre por el extremo más cercano a los polos (22). Su orientación asegura el transporte a los polos del material necesario para el crecimiento polarizado. Los cables sirven como vías para las miosinas de tipo V, como Myo52, que dirigen el transporte de vesículas de secreción hacia las zonas de crecimiento (23).

Los cables de actina están formados de haces de filamentos cortos de actina paralelos que son ensamblados por la actividad nucleadora de la formina For3 (22,24). Aunque no se conoce el mecanismo de activación de For3, se sabe que la GTPasa de la familia Rho, Cdc42, en su estado activo se une a For3 y podría liberarlo de su autoinhibición disparando la polimerización de los cables de actina. Por otro lado, en *S. pombe* se han descrito pocas proteínas de unión a filamentos de actina que se unan a los cables, solamente la tropomiosina Cdc8 que estabiliza los filamentos de actina y la coronina, Crn1 (25).

1.3.3. El anillo contráctil de actomiosina

El anillo contráctil de actomiosina (CAR) es una estructura esencial que se ensambla en la región media de la célula durante la mitosis y funciona concentrando la secreción y la síntesis de la pared celular en el sitio de división (26). El CAR está formado por filamentos de actina y miosinas de tipo II, Myo2p y Myp2p y más de 100 proteínas.

Cdc12 es la formina responsable de la formación de los filamentos de actina que componen el anillo y es reclutada a la zona media por Cdc15p (27). Posteriormente, estos filamentos son unidos y estabilizados a través de su interacción con las miosinas, IQGAP, alfa-actinina, fimbrina y por proteínas estabilizadoras de los filamentos como la tropomiosina Cdc8p (16,26,28).

La contracción del anillo depende de la activación de la ruta SIN (*Septation Initiation Network*) y tiene lugar de forma coordinada con el depósito y la invaginación de la nueva membrana. Ambos procesos guían la deposición de material de pared celular que formará el septo de división (29,30).

1.4. GTPasas de la familia Rho

La superfamilia de GTPasas está formado por las GTPasas de la familia Rho (Ras homolgy), Ras, Rab, Arf y Ran y aparecen en todos los organismos eucariotas. Estas GTPasas están involucradas en la transducción y regulación de una gran cantidad de procesos como el control de la proliferación y diferenciación celular, la regulación del citoesqueleto de actina, el tráfico endosomal, la polaridad celular y la regulación transcripcional (31,32). Sin embargo, en levaduras solo se conocen funciones en el crecimiento polarizado, en citoquinesis, mantenimiento de la integridad celular y regulación del citoesqueleto de actina (33,34).

Las Rho GTPasas son proteínas de unión e hidrólisis de GTP y su funcionamiento consiste en cambiar de un estado activo, mientras está unido a GTP, a otro inactivo, mientras que está acoplado a GDP, por lo que funciona como un interruptor molecular. Cuando las GTPasas de la familia Rho se unen a GTP se produce un cambio conformacional a una estructura de mayor flexibilidad, de esta manera, las zonas switch I y II quedan expuestas para interaccionar con distintos efectores. Las Rho GTPasas se unen fuertemente a GDP, sin embargo, el GTP lo hidrolizan lentamente. Entonces entran en juego los reguladores, los *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) que estimulan la liberación de GDP y las *GTPase activating proteins* (GAPs) que facilitan la hidrólisis de GTP (**Figura 4**) (35,36). El intercambio de GDP por GTP es favorecido por la alta proporción de GTP/GDP que hay en el citosol.

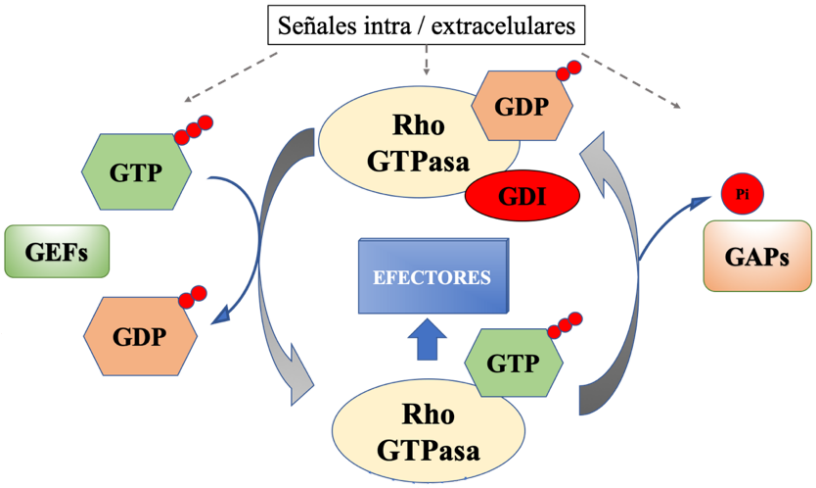

Figura 4. Esquema de la regulación de las GTPasas por GEFs, GAPs y GDIs.

Las Rho GTPasas se pueden mover del citosol a la membrana plasmática debido a la asociación de un grupo isoprenoide a una cisteína conservada en el motivo C-terminal que permite a la proteína anclarse a la membrana (37,38). Por ello dentro de la regulación subcelular, tienen un papel importante las proteínas *GDP Dissociation Inhibitors* (GDIs) que se unen a las GTPasas inactivas y las secuestran al citosol al enmascarar su secuencia de prenilación (35,36).

Aparte de la regulación subcelular y mediante GEFs y GAPs, las GTPasas están reguladas por microRNA (miRNA), palmitoilación, modificaciones postraduccionales y ubiquitinación (39).

En *S. pombe*, la familia Rho la integran: Cdc42, Rho1, Rho2, Rho3, Rho4 y Rho5p. Las fundamentales para la viabilidad celular son Cdc42 que participa en el establecimiento de la polaridad celular y Rho1 que está involucrada en el mantenimiento de la integridad y la polaridad celular (33,34,40)

1.5. La GTPasa Rho1 de *S. pombe*

La GTPasa Rho1 de *S. pombe* es el homólogo funcional de RhoA en humanos y de Rho1 en *S. cerevisiae*. Rho1 se localiza en las zonas de crecimiento celular, polos y septo y participa en el crecimiento polarizado activando la síntesis de pared celular y modulando el citoesqueleto de actina. De hecho, sus efectores más conocidos son enzimas que participan en la síntesis de la pared celular como la beta-glucan sintasa β-GS y las proteínas quinasas, Pck1 y Pck2, ortólogos de PKC. Así Rho1p actúa como subunidad reguladora de la β-GS junto al resto de subunidades catalíticas codificadas por los genes *bgs 1-4*, y también tiene un papel como activador de la cascada de MAPK de Pmk1p o ruta de integridad celular (CIP) a través de Pck2 (41,42).

Rho1p es una proteína esencial, de manera que cuando se suprime su expresión durante el crecimiento vegetativo, las células se lisan, casi siempre en el momento de separación celular y la actividad β-GS también se reduce drásticamente (40,43,44). Además, la reducción de su expresión provoca la desaparición de la actina polimerizada y su aumento, un incremento de grandes puntos de actina repartidos al azar (45), no obstante, no se conoce ninguna de las proteínas que regulan este proceso.

1.5.1. Activadores de Rho1p

Los GEFs son los principales activadores de Rho1 y se caracterizan porque presentan un dominio DH o *Dbl homology*, término que viene de *Diffuse B-cell lymphoma* que fue la primera proteína Rho-GEF descubierta en mamíferos. En *S. pombe*, Rho1p es activada por tres GEFs llamados Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, pero su genoma presenta otras 5 proteínas que poseen un dominio DH o Rho-GEF: Scd1p, Gef1p, Gef2p, Gef3p y Mug10p, algunas de las cuales han sido caracterizadas (http://www.pombase.org).

Los dominios Rho-GEF se parecen muy poco a nivel de secuencia de proteínas. De hecho, el porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos (aa) de Rgf1p y Rgf3p es menor del 20%, pero aumenta hasta el 63% al comparar los dominios Rho-GEF de Rgf1p y Rgf2p, los dos más próximos dentro de la familia. Sin embargo, los estudios cristalográficos revelan un gran parecido en su estructura tridimensional. El dominio DH tiene tres regiones: CR1, CR2 y CR3. Las dos primeras interaccionan con la GTPasa al estar situadas hacia la superficie y se ha visto que mutaciones en

determinados aas de estas regiones producen una disminución en la actividad intercambiadora de GDP por GTP (46,47).

Además del dominio DH, los tres GEFs Rgf1, 2 y 3, tienen zonas conservadas como el dominio PH (*Pleckstrin Homology*) y el dominio CNH (*Citron and NIK-like kinase Homology domain*). El dominio PH se une a los fosfolípidos de membrana regulando la localización de la proteína y se ha propuesto como modulador de la función del dominio DH a través de interacciones alostéricas (48). En cuanto al dominio CNH, su función es desconocida pero es un dominio esencial y podría estar mediando interacciones proteína-proteína (49,50). Finalmente, solo los GEFs Rgf1p y Rgf2p presentan el dominio DEP (*Dishevelled, Eg1-10 and Plekstrin*) en el extremo N-terminal (**Figura 5**). En el laboratorio se ha descrito este dominio como regulador de la localización de Rgf1p en respuesta a daño replicativo, de hecho al eliminar el dominio DEP de Rgf1p, la proteína mutada Rgf1p-*DEP*Δ-GFP se acumula en el núcleo (51).

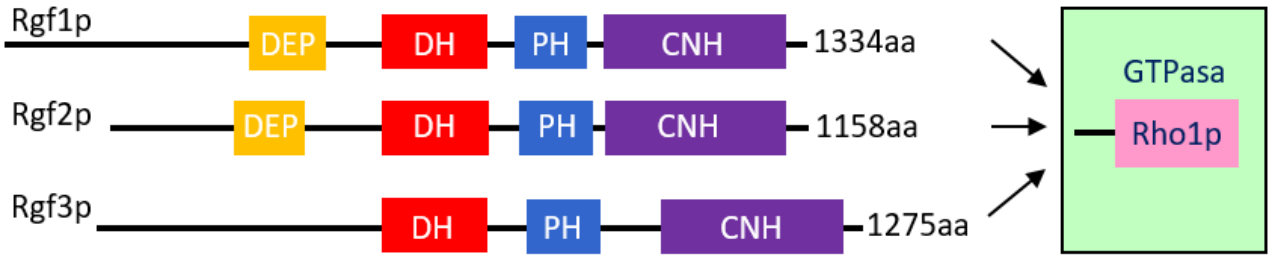

Figura 5. Imagen de los dominios de tres proteínas RhoGEF: Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p.

1.5.2. Rgf2 y Rgf3

Rgf2 es fundamental para la diferenciación sexual ya que regula a través de Rho1p, la β–GS propia de la esporulación, conocida como Bgs2p (41). Pero también desempeña una función durante el crecimiento vegetativo puesto que la a disrupción simultánea de Rgf1p y Rgf2p es letal.

Rgf3 es esencial para la integridad de la célula y se encarga de activar β–GS en la división celular, por ello su ausencia provoca la lisis de las células en parejas durante la citocinesis (47,52).

1.5.3. Rgf1, el principal GEF de Rho1

Rgf1 es una proteína de 1334 aminoácidos, no esencial, y posiblemente responsable de la mayor parte de Rho1 activo disponible en la célula. Rgf1 tiene una localización cambiante durante el ciclo celular siguiendo la distribución de los parches de actina cortical que se acumulan en los polos de crecimiento activo durante la interfase y se reubican en un anillo central en mitosis (46,53). Rgf1 se acumula en el núcleo en respuesta al daño en la replicación del DNA causado por la presencia de hidroxiurea, mientras que en interfase entra y sale de él, además de localizarse en los polos (51).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos empleados

El organismo estudiado en este trabajo ha sido la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. En la **Tabla 1** se muestran las cepas utilizadas, sus características genéticas y su origen. Las cepas se conservan en glicerol al 15% a -80ºC en criotubos. Para el almacenamiento a corto plazo hasta 2 meses, las levaduras se pueden mantener en cultivo solido en forma de patches a 4ºC.

Tabla 1. Cepas de *S. pombe* empleadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen
DC9	*pact1-LAGFP: leu h90*	Colección YSM
EM352	*pact1-LA:GFP:leu, ura$^-$, h$^-$*	Colección YSM
EM362	*pact1-LAGFP:leu, cut11:3mRFP:hyg, ura$^-$*	Colección YSM
EM363	*pact1-LAGFP:leu, cut11:3mRFP:hyg, ura$^-$*	Colección YSM
EM408	*pact1-LAGFP:NLS:leu, ura$^-$, h$^-$*	Colección YSM
EM506	*cps8, rad22-YFP-Kan, leu1-32*	Colección YSM
HC63	*wt leu1-32 h$^+$*	Colección YSM
HC64	*wt leu1-32 h$^-$*	Colección YSM
JCR439	*cdc3-6 leu1-32 h$^+$*	Colección YSM
PG129	*arp3-C1 ura4-D18 leu 1-32 ade6-210 h$^-$*	Colección YSM
SI01	*cdc8-117, leu1-32, h^{90}*	Este trabajo
SI02	*cdc8-117, leu1-32*	Este trabajo
SI03	*cdc12-112, leu1-32*	Este trabajo
SI04	*cdc12-112, leu 1-32, ura$^-$, h$^-$*	Este trabajo
SI05	*cdc8-117, pact1-LAGFP:leu1, cut11, 3mRFP:hph, ura4D18*	Este trabajo
SI06	*cdc8-117, pact1-LAGFP:leu1, cut11, 3mRFP:hph, ura4D18*	Este trabajo
SI07	*cdc12-112, pact1-LAGFP:leu1, cut11, 3mRFP:hph, ura4D18*	Este trabajo
SI08	*cdc12-112, pact-LAGFP:leu, ura-*	Este trabajo
SI09	*cdc12-112, pact-LAGFP:leu, ura-*	Este trabajo
SI10	*cdc12-112, pact-LAGFP: leu, ura-*	Este trabajo
SI11	*cdc4-8, mEGFP-myo2: Kan, sid4-mCherry: hph, ura-*	Este trabajo
SI12	*cdc4-8, mEGFP-myo2: Kan, sid4-mCherry: hph, ura-*	Este trabajo
SI13	*cdc4-8, mEGFP-myo2: Kan, sid4-mCherry: hph, ura-*	Este trabajo
SI14	*arp9::kanMX6, pact-LAGFP:NLS:leu, ura4D18*	Este trabajo
SI15	*adf1-1, pact1-LAGFP:leu, ura-*	Este trabajo
SI16	*adf1-1, pact1-LAGFP:leu, ura-*	Este trabajo
TE287	*cdc8-27, h$^+$*	Colección YSM
TE288	*cdc8-117, ade$^-$, h$^-$*	Colección YSM
TE378	*cdc4-8, rgf1::kan, leu1-32 h$^+$*	Colección YSM
TE399	*mEGFP-myo2:kan, sid4-mcherry:hph, leu$^-$, ura$^-$, h$^+$*	Colección YSM
TE400	*mEGFP-myo2:kan, sid4-mcherry:hph, leu$^-$, ura$^-$, h$^-$*	Colección YSM
YS864	*cdc4-8 leu1-32 h$^+$*	Colección YSM
YS865	*cdc12-112, leu$^+$, h$^+$*	Colección YSM
YS4056	*arp9::kanMX6, ura4D18, leu1-32, ade$^-$ h$^+$*	Colección YSM
YS4058	*arp9::kanMX6, ura4D18, leu1-32, ade$^-$ h$^+$*	Colección YSM

YS4068	*gcn5::kanMX6, ura4D18, leu1-32, ade⁻ h⁺*	Colección YSM
YS5140	*h⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 adf1-1*	Colección YSM
YS5152	*adf1-1, leu⁻, ura⁻*	Colección YSM
YS5154	*adf1-1, leu⁻, ura⁻*	Colección YSM
YS5154	*adf1-1, imp2-GFP:kan, leu:sid4-GFP, ura⁻, leu⁻*	Colección YSM

Los trabajos de clonación molecular se realizaron con la cepa DH5α *Escherichia coli*, cuyas características y origen se muestran en la **Tabla 2**. *E. coli* se utiliza como hospedador habitual de los plásmidos y se conserva en glicerol al 50% a -80ºC.

Tabla 2. Cepa de *E.coli* empleada en este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen
DH5α	*SupE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*	Stratagene

2.2. Plásmidos empleados y construidos en este trabajo

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado plásmidos pertenecientes a la colección del laboratorio y se ha construido el plásmido pAU-*rho1*⁺ a partir del plásmido pAL-*rho1*⁺ (**Tabla 3).**

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo

Nombre	Características
pAL-KS⁺	Plásmido de 6,3 kb, con origen de replicación en *S. pombe* en *ars1*⁺, con el marcador *leu2*⁺ de *S. cerevisiae* así como *MCS (Multiple Cloning Site)*
pAL-*rgf1*⁺	Plásmido pAL-KS con la ORF del gen *rgf1*⁺ y sus regiones promotora y terminadora, obtenidas del plásmido pAU-*rgf1*⁺y clonadas en los sitios *Xho*I y *Not*I de pAL-KS.
pAL-*rgf2*⁺	Plásmido pAL-KS con la ORF del gen *rgf2*⁺ y sus regiones promotora y terminadora, obtenidas del cósmido SPA1006, y clonadas entre los sitios *Apa*I y *Not*I
pAL-*rgf3*⁺	Plásmido pAL-KS con la ORF del gen *rgf3*⁺ y sus regiones promotora y terminadora, obtenidas del cósmido SPC645, y clonadas entre los sitios *Sal*I y *HinD*III
pAL-*rho1*⁺	Plásmido pAL con la ORF del gen *rho1*⁺ y sus regiones promotora y terminadora, obtenida por PCR y clonadas entre los sitios *ApaI-SacII* del sitio de clonación múltiple
pAU-KS⁺	Plásmido de 5,6 kb, con origen de replicación en *S. pombe* en *ars1*⁺, con el marcador *ura3*⁺ de *S. cerevisiae* y el *MCS*
pAU-*rgf1*⁺	Plásmido pAU-KS con la ORF del gen *rgf1*⁺ y sus regiones promotora y terminadora flanqueadas por sitios *Eco*RI, obtenidas a partir del cósmico SPC645
pAU-*rho1*⁺	Plásmido pAU-KS con la ORF del gen *rho1*⁺.

2.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo han sido descritos en (54). Todos los medios se prepararon con agua destilada (Milli-Rho) y fueron esterilizados en autoclave. En los medios sólidos además se añadió agar a una concentración final del 2%.

2.3.1. Medios de cultivo para *S. pombe*

- **YES (Yeast Extract Suplemented)**: se emplea para el crecimiento vegetativo ya que inhibe la conjugación y esporulación. Medio rico constituido por extracto de levadura 5 g/l; glucosa 30 g/l; adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina 225 mg/l.
- **EMM, MM o Medio Mínimo (Edimburgh minimal medium):** se emplea para el crecimiento vegetativo. Medio selectivo constituido por glucosa 20 g/l; biftalato monopotásico 3 g/l; Na_2HPO_4 2,2 g/l; NH_4Cl 5 g/l; además de sales, vitaminas y minerales. Las vitaminas (esterilizadas por filtración) se añaden al medio después de ser autoclavado.
- **MEA (Malt Extract Agar):** se emplea para inducir la esporulación y conjugación. Es un medio pobre en nitrógeno constituido por extracto de malta 30g/l, agar 20g/l y suplementos de adenina, histidina, leucina y uracilo 225 mg/l.

Para seleccionar cepas auxótrofas transformadas con plásmidos se utilizó MM suplementado con mezclas esterilizadas de suplementos de adenina, leucina, uracilo, histidina y lisina 225 mg/l eliminando el suplemento correspondiente en cada situación.

Para seleccionar cepas resistentes a antibióticos, estos se añadieron a partir de las soluciones stock indicadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Soluciones stock de los compuestos adicionados a los medios de cultivo.

Compuesto	Solución Stock (mg/ml)	Concentración final
Higromicina B	100 en agua	300 µg/ml
G-418	50 en agua	120 µg/ml

El crecimiento de las distintas cepas de *S. pombe* se llevó a cabo en placas y matraces incubados a 25ºC o 28ºC. Los cultivos líquidos en matraces se mantenían en agitación a una velocidad de 200 revoluciones por minuto (rpm) para mantener condiciones aerobias y uniformes. El crecimiento se controlaba midiendo la absorbancia de cultivo a 600 nm (DO_{600}). Hay que tener en cuenta que los experimentos se realizaron en fase exponencial, es decir con una DO_{600} entre 0,5 y 1. Gracias a distintas tablas de calibración se sabe que una densidad óptica de 1,0 equivale a una concentración de $1x10^{-7}$ células/ml. Para medir la densidad óptica se utilizó el espectrofotómetro Hitachi U-2001.

2.3.2. Medios de cultivo para *E. coli*

- **LB (Luria-Bertani médium):** se emplea para el cultivo de *E.coli* y lleva Bactotriptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1%.

Para seleccionar clones resistentes a antibióticos se utilizó medios suplementados con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Estos cultivos se incubaron a una temperatura de 37ºC tanto en matraz (con agitación) como en placa.

2.4. Procedimientos generales de biología molecular

Los métodos usados en la manipulación del DNA se encuentran en (55,56), también se han tenido en cuenta las especificaciones de las casas comerciales del material utilizado.

2.4.1. Conjugación

En la conjugación se usaron estirpes heterotálicas de distinto sexo (h^+ y h^-). Los cruces se ponían una vez se habían sembrado en placas YES y habían alcanzado la fase estacionaria (2 días). Se mezclaba una cantidad semejante de ambas estirpes (aproximadamente la punta de un palillo) en 20 µl de agua y posteriormente, esta mezcla se extendía en una placa de MEA. Los zigotos se forman a partir de 12 horas y posteriormente sufren meiosis y esporulación, produciendo ascas con 4 ascosporas tras 2 o 3 días a 28ºC. Los cruces de mutantes termosensibles se incubaron a 25ºC (temperatura permisiva).

2.4.2. Obtención de cepas por *"random spores"*

Para obtener esporas aisladas, se hicieron suspensiones en agua estéril de las mezclas de conjugación explicadas en el apartado anterior y se trataron con 2 µl de β-glucuronidasa arisulfatasa al 0,2% durante toda la noche, en agitación, y a temperatura ambiente. Este proceso rompe las paredes celulares de las células vegetativas, pero no afecta a las ascosporas que tienen una pared celular más resistente. Después se realizaron las diluciones necesarias para obtener entre 100 y 1000 esporas por placa de YES y las placas se incubaron durante 4 días a 25ºC o 28ºC. Por último, las estirpes con el genotipo apropiado se seleccionaron mediante réplica en placa o poniendo manualmente cada colonia en diferentes medios selectivos y/o a distintas temperaturas.

2.4.3. Obtención de DNA

Para extraer DNA plasmídico a partir de bacterias (mini-preps) se usa el método de la lisis alcalina (57). En este procedimiento, las células se rompen mediante una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). En condiciones alcalinas el DNA plasmídico queda en solución y es posteriormente precipitado con isopropanol y sales. Para obtener DNA de mayor pureza se utilizaron los kits

comerciales *NZYMinipreps* (mini-preps de una concentración de 700 ng/µl) y *Wizard® Plus Midipreps DNA purification System* (midi-preps a una concentración de 2 µg/µl).

2.4.4. Tratamientos enzimáticos del DNA

- Digestiones con endonucleasas de restricción para cortar el DNA
- Reacciones de desfosforilación con la fosfatasa alcalina CIP (*Calf Instestinal Phosphatase)* para eliminar el grupo fosfato de los extremos del DNA.
- Reacciones de ligación de fragmentos de DNA con DNA ligasa del fago T4.

2.4.5. Transformación de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* con plásmidos o mezclas de ligación se transformaron mediante el protocolo del choque térmico (58). No obstante, a veces se realizó el método simplificado llamado "transformación del minuto" (59)

2.4.6. Transformación de *S. pombe*

Las células de *S. pombe* se transformaron usando el método de LiSorb (acetato de litio-sorbitol) (60).

2.4.7. Reacción en cadena de polimerasa

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se desarrolló en un termociclador *Bio Rad Gene Cycler*^{TM}. Dependiendo de la temperatura de fusión (Tm) de los cebadores empleados y del tamaño del producto esperado se realizaron modificaciones sobre el siguiente protocolo estándar de reacción:

- Desnaturalización inicial: 3 minutos a 98ºC
- 30 ciclos de:
    - Desnaturalización del DNA: 30 segundos a 94ºC
    - Anillamiento: 45 segundos a 55ºC
    - Extensión: 2 minutos a 72ºC
- Extensión final: 5 minutos a 72ºC

Las mezclas de reacción contenían DNA molde en cantidad variable según fuese de origen plasmídico o genómico, además de mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP y dCTP, con una concentración 0,2 mM cada uno), los dos oligonucleótidos cebadores (cada uno con una concentración de 1µM y suministrados por *Sigma y Thermo Fisher*), $MgCl_2$ 3mM, Taq polimerasa (*BIOTAQ*^{TM}, *Ecogen)* 0,05 unidades/µl y el tampón de reacción suministrado con la enzima.

2.4.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA obtenidos por amplificación por PCR o tratamiento con enzimas de restricción se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (agarosa D-1, *Pronadisa*) preparados a una concentración de 1%, aunque esta puede variar según el tamaño que se espera de las bandas. Los geles se prepararon con tampón 1x TAE (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5-7,8) añadiendo el agente intercalante Midori Green Advance DNA Stain (*NIPPON Genetics Europe GmbH*) a una concentración final de 0,05µl/ml para poder ver los fragmentos de DNA con luz ultravioleta.

Para aislar y purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizaron el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* de *Macherey-Nagel*.

2.4.9. Ensayo de viabilidad celular en placa

El ensayo de gota consiste en analizar el crecimiento de las cepas en placa a diferentes temperaturas (el rango de temperaturas en este trabajo ha ido de 25ºC a 37ºC) y/o en presencia de distintos agentes antifúngicos, genotóxicos, etc. En este trabajo los ensayos se han realizado en medio mínimo (MM) en ausencia de uracilo o leucina para mantener la selección de los plásmidos.

Las cepas para examinar se sembraron en placas de MM hasta alcanzar la fase estacionaria (2 días) y se concentraron en 200 µl de agua estéril. Para obtener el mismo número de células se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de cultivo} = \frac{200\ \mu\text{l x DO}_{\text{final}}}{\text{DO}_{\text{inicial}}}$$

, donde DO_{final} suele ser 2 y $DO_{inicial}$ la DO_{600} del cultivo.

Posteriormente, se hicieron diluciones seriadas 1/2 hasta conseguir 8 concentraciones decrecientes de células como se muestra en la **Figura 6**. Se utilizó el replicador (SIGMA) para plasmar gotas de idéntico tamaño (~ 3 µl) en las placas. Por último, las placas se incubaron durante 3-5 días según la temperatura o el medio.

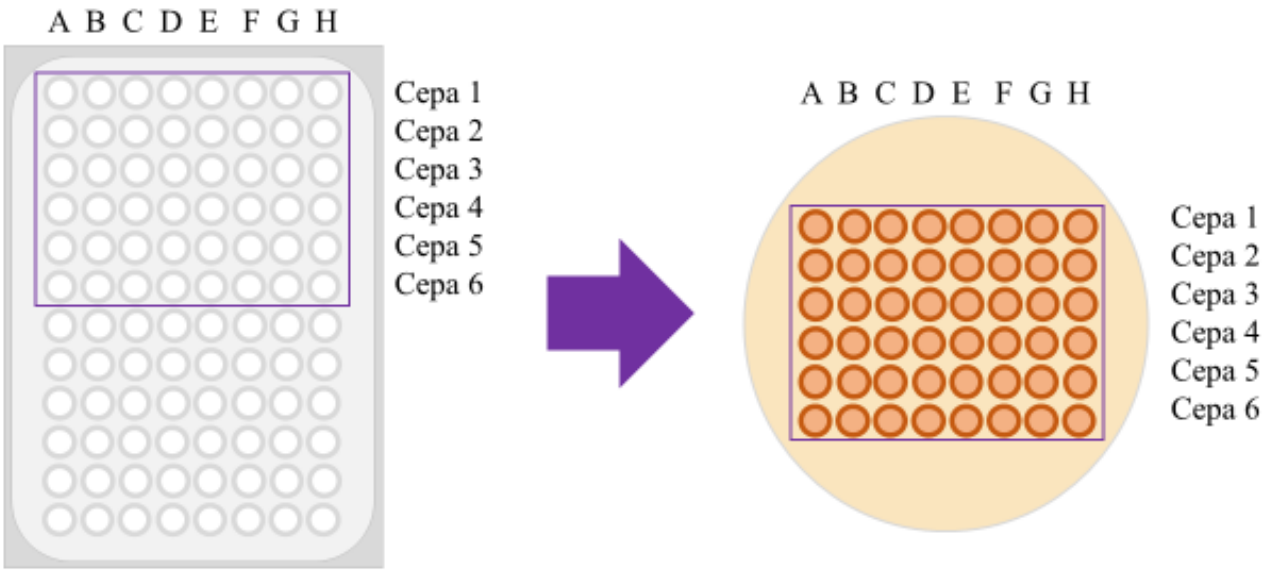

Figura 6. Esquema de un ensayo del ensayo de viabilidad celular realizado en este trabajo. Las células de cada cepa concentradas a una DO_{600} de 2 se colocaron en cada una de las filas de la placa y se diluyeron en cada columna en diluciones 1/2.

2.5. Técnicas de microscopía

Para llevar a cabo estas técnicas las muestras se tomaron directamente de cultivos líquidos, creciendo en fase logarítmica. Rutinariamente se centrifugaba 1 ml de cultivo a 6000 rpm durante 1 minuto, eliminando posteriormente el mayor volumen de sobrenadante. Para ver las células vegetativas, esporas y posibles contaminaciones se utilizó el microscopio Zeiss Axiophot con el objetivo de 40 aumentos (40x). Para realizar una microscopia diferencial de contraste de interferencias (DIC) y microscopia de fluorescencia, se utilizó el microscopio Leica DM RXA equipado con objetivo de inmersión 63x, cámara digital Leica DFC 350 FX y acoplado al programa informático Leica CW4000 Cytofish.

En el análisis de muestras de fluorescencia se usaron los filtros GFP *(Green Flourescence Protein)* y RFP *(Red Fluorescence Protein)* con los que se obtuvo las longitudes de onda que excitaban a los fluorocromos de las muestras. Se tomaron fotografías de las proteínas fluorescentes GFP y RFP fusionadas a proteínas de interés para analizar su localización celular.

2.6. Presentación de datos

Las imágenes escaneadas del ensayo de viabilidad celular en placa se procesaron con Adobe Photoshop CS6 *(Adobe System, Inc)* y las de microscopia con el programa *Fiji Is Just ImageJ* (*FIJI*). Las referencias bibliográficas se organizaron con el programa *Mendeley Desktop v1.19.5*.

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

3.1. Antecedentes

En *S. pombe* Rho1 participa en la síntesis de la pared celular y la regulación del citoesqueleto de actina, ambos procesos relacionados con el crecimiento polarizado. Pero como ya hemos apuntado en la Introducción, aunque la depleción de Rho1 va acompañada de la desaparición de la actina polimerizada y su incremento produce cúmulos de actina no polarizada, no se conocen los efectores de Rho1 en el citoesqueleto de actina.

En el laboratorio hemos visto que Rho1 y Rgf1 participan en la resolución de los focos de daño o focos de Rad52p-YFP producido la Fleomicina (Phl) que es un agente genotoxico (61).

También hemos visto que la adición de LatA que impide la formación de filamentos de actina no afecta a la inducción de focos de daño de Rad52p después del tratamiento con Fleomicina (Phl); sin embargo, sí afecta al proceso de recuperación impidiendo que los focos de daño se resuelvan y que las células reinicien el ciclo. Este defecto es especifico de inhibidores del citoesqueleto de actina, ya que la adición de MBC (metilbenzimidazolcarbamato) que inhibe la polimerización de microtúbulos no afecta a la resolución de los focos de daño inducidos por el tratamiento con Phl.

En *S. cerevisiae* se sabe que dos efectores de Rho1p son las forminas Bni1 y Bnr1. En *S. pombe* visto que For3, la formina que responsable de la síntesis de los cables de actina es activada por Cdc42 y no por Rho1.

3.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es detectar posibles candidatos que puedan actuar como proteínas que interactúan con Rho1 en el citoesqueleto de actina. Para ello hemos seleccionado una serie de mutantes de proteínas de unión a actina que regulan la nucleación, la estabilidad, el intercambio de nucleósido en los monómeros, etc

Estudiaremos si la sobreexpresión de la GTPasa Rho1 o alguno de sus activadores Rgf1, Rgf2 y Rgf3, es capaz de suprimir el fenotipo termosensible de alguno de los mutantes.

En aquellas cepas en las que un aumento de Rho1 o de sus activadores mejore el crecimiento analizaremos la morfología de las células y visualizaremos el citoesqueleto de actina.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidad de mutantes de proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina a temperaturas semi-permisivas con sobreexpresión de Rho1 y Rgf1.

Nos preguntamos si la sobreexpresión de la GTPasa *rho1* y de su activador *rgf1* podría suprimir los defectos de crecimiento observados en distintos mutantes de proteínas asociadas a actina y recogidos en la **Tabla 1**. Para ello nos propusimos transformar cada uno de los mutantes con un plásmido control (pAL) y con los plasmidos pAL- *rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ y posteriormente analizar el crecimiento de los transformantes a distintas temperaturas. Los plásmidos pAL- *rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ están basados en pAL que es un plásmido multicopia y en ellos los genes *rho1*$^+$ y *rgf1*$^+$ se expresan bajo el control de su propio promotor y terminador, de manera que están regulados de la misma forma que la copia genómica. Los tres plásmidos llevan como marcador de selección el gen *leu2*$^+$, mientras que la cepa que se transforma tiene el alelo mutante *leu1-32*, que la hace auxótrofa para leucina. De esta forma después de la transformación solo se seleccionaron las cepas que crecen en medio mínimo sin leucina (MM –leu) porque son las que llevan los plásmidos.

Entonces nos dimos cuenta de que algunos de los mutantes que habíamos seleccionado, en concreto *cdc8-117*, *cdc12-112* y *adf1-1*, no eran auxotrofos para leucina. Por ello, antes tuvimos que cruzar cada uno de los mutantes por una cepa auxotrofa para leucina (*leu1-32*) de género opuesto y seleccionar las cepas mutantes *cdc8-117 leu1-32* (SI02), *cdc12-112 leu1-32* (SI04) y *adf1-1 leu1-32* (SI16) por el método de "*randon spores*" (descrito en materiales y métodos). Estas cepas se seleccionaron atendiendo a los fenotipos de termosensibilidad conferidos por las mutaciones en proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina y a la incapacidad para crecer en placas de MM-leucina.

Los distintos mutantes se transformaron con los plásmidos mencionados (pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$) en distintos experimentos y en cada caso los transformantes se seleccionaron en placas de MM-leu a 25ºC que es la temperatura permisiva.

Posteriormente, analizamos el crecimiento de las cepas transformadas en medio mínimo (MM-leu) a diferentes temperaturas mediante un ensayo de gota (descrito en materiales y métodos). Normalmente las placas con los ensayos de gota se incubaron a 25ºC, 28ºC, 30ºC, 32ºC, 34ºC y 37ºC, aunque también se han utilizado incubadores a 33ºC y 36ºC. Para poder comparar el crecimiento de

la misma cepa transformada con los plásmidos pAL, pAL-*rho1*$^{+}$ y pAL-*rgf1*$^{+}$, partimos del mismo número de células de cada transformante, aproximadamente una DO de 2 a 600 nm, y a partir de esta DO se hicieron diluciones de 1/2 en las placas multipocillos. Se utilizó un replicador, con el fin de depositar gotas de idéntico tamaño en las diferentes placas.

4.1.1. Sobreexpresión de Rho1 en un mutante en el gen de la actina, *cps8-188*

La actina es una proteína globular de 41,7 Kd que tiene un sitio de unión a ATP. En *S. pombe* está codificada por el gen *act1*$^{+}$ que es un gen esencial. En el laboratorio contamos con el mutante *cps8-188* que fue aislado por su sensibilidad al inhibidor de microtúbulos clorprofam. Es un mutante termosensible que lleva una mutación puntual muy cerca en el lazo hidrofóbico que se encuentra entre los subdominios 3 y 4 de la actina (62).

Transformamos las células del mutante de actina con el plásmido control pAL y con el plásmido que pAL-*rho1*$^{+}$ y analizamos su crecimiento en un ensayo de gota a diferentes temperaturas. El resultado se muestra en la **Figura 7**. Aquí se ve que las dos cepas crecen de manera similar a 25ºC, 28ºC y 32ºC, sin embargo, a temperatura semipermisiva (34ºC) solo se observa crecimiento en la cepa que sobreexpresa Rho1.

Esto significa que un aumento de Rho1 suprime al menos parcialmente los defectos de crecimiento del mutante de actina *cps8-188* y nos anima a estudiar cual puede ser el origen de esta supresión y para ello vamos a analizar la sobreexpresión de Rho1 en mutantes de proteínas reguladoras de los cables, parches y anillo de actomiosina.

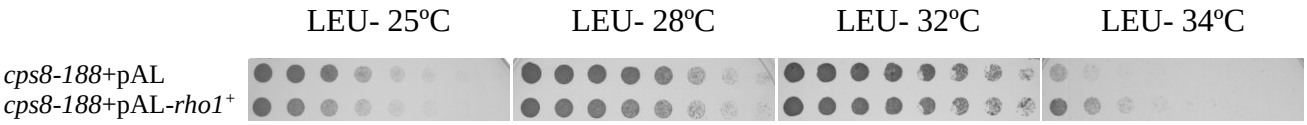

Figura 7. Ensayo de viabilidad celular del mutante *cps8* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^{+}$ e incubados a 25ºC, 28ºC, 32ºC y 34ºC.

4.1.2. Sobreexpresión de Rho1 en mutantes de proteínas reguladoras de la polimerización de la actina profilina (*cdc3-6*) *y* cofilina (*adf1-1*).

Las subunidades de actina se ensamblan cabeza con cola para generar filamentos con distinta polaridad, y los dos proto-filamentos paralelos se retuercen formando una hélice diestra. La orientación de las subunidades hace que los dos extremos del polímero sean diferentes y por tanto que polimericen a diferentes velocidades. El extremo que crece rápido se llama extremo (+) o barbado mientras que el que crece despacio se llama (–) o apuntado. Cada molécula o monómero de actina se

une fuertemente a una molécula de ATP que es hidrolizado a ADP tan pronto como se ensambla dentro del polímero.

Todas las células eucarióticas llevan un juego de proteínas de unión a actina que regulan la nucleación, la estabilidad, el intercambio de nucleósido en los monómeros, etc. Así la profilina se une a los monómeros de actina (G-actina) y facilita el intercambio de la forma de actina unida a ADP a actina unida a ATP, y participa en el ensamblaje de actina en el extremo barbado pero no en el extremo apuntado (63). En cambio, la cofilina se une específicamente a las formas de actina unidas a ADP y por lo que no actúa sobre el extremo barbado. La cofilina desestabiliza los filamentos estructural y termodinámicamente al debilitar las interacciones entre las subunidades ADP-F-actina produciendo un gran aumento en la constante de velocidad de despolimerización intrínseca del extremo apuntado.

Par saber si la sobreexpresión de Rho1 y/o Rgf1 podrían afectar a la viabilidad del mutante de profilina, analizamos el crecimiento de las cepas obtenidas al transformar el mutante *cdc3-6* con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$. En este caso observamos que ni un aumento de la expresión de Rho1, ni de Rgf1 suprimen el fenotipo termosensible de la cepa *cdc3-6* a ninguna de las temperaturas ensayadas. Esto no se debe a que la temperatura no fuera lo suficientemente restrictiva porque a 32ºC no crece ninguna de las cepas (**Figura 8)**.

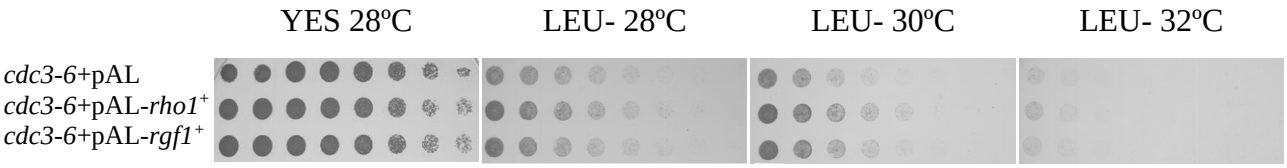

Figura 8. Ensayo de viabilidad celular del mutante *cdc3-6* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ e incubados a 28ºC, 30ºC y 32ºC.

A continuación, analizamos el crecimiento del mutante de cofilina *adf1-1* transformado con los plásmidos pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ a 32ºC, 34ºC, 35ºC y 36ºC. A 32ºC y 34ºC, tanto el mutante con el plásmido vacío como los mutantes que sobreexpresan Rho1 o Rgf1 se comportan de manera similar (**Figura 9**). Sin embrago a 35ºC y a 36ºC se ve claramente que la cepa que sobreexpresa Rho1 revierte el fenotipo termosensible del mutante *adf1-1*.

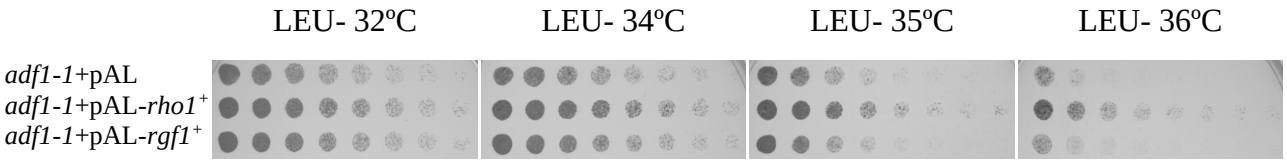

Figura 9. Ensayo de viabilidad celular del mutante *adf1-1* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ e incubados a 32ºC, 34ºC, 35ºC y 36ºC.

En resumen, este dato indica que un aumento de Rho1p mejora defectos en la tasa de despolimerización del extremo apuntado, pero no afecta (no mejora) los defectos en la tasa de polimerización del extremo barbado.

4.1.3. Sobreexpresión de Rho1 en mutantes de proteínas reguladoras de los cables de actina, la formina cdc12 y la tropomiosina cdc8.

A continuación, analizamos proteínas reguladoras de los cables de actina. Los cables de actina son haces lineales de filamentos de actina paralelos que se extienden a lo largo del eje longitudinal de las células. Las forminas nuclean los filamentos de actina y facilitan su alargamiento en el extremo barbado y la tropomiosina se organiza lo largo de los filamentos de actina y los estabiliza (64,65).

En *S. pombe* Cdc12 es la formina que participa en el ensamblaje de los cales de actina que forman el anillo de actomiosina durante la citoquinesis (27). Además de Cdc12, hay otras dos forminas, una es For3 que participa en la elongación de los cables de actina que se extienden hacia los polos y la otra Fus1, que es especifica de la fase de conjugación. En este trabajo nos hemos centrado en Cdc12 porque tenemos un mutante con un fenotipo termosensible mientras que la deleción de For3 es viable y carece de fenotipo. Tampoco hemos mirado que ocurre en la conjugación.

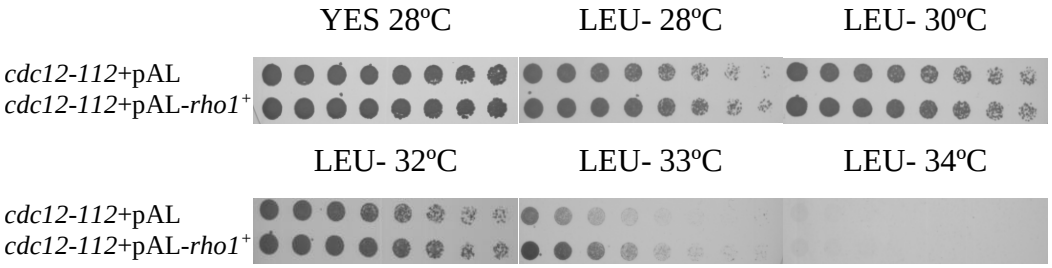

Figura 10. Ensayo de viabilidad celular del mutante *cdc12-112* transformado con pAL y pAL-*rho1*$^{+}$ e incubados a incubados a 28ºC, 30ºC, 32ºC, 33ºC y 34ºC.

Respecto al mutante *cdc12-112*, en la **Figura 10** se puede ver que tanto la cepa transformada con el plásmido control como la transformada con pAL-*rho1*$^{+}$ tienen un comportamiento similar a 28ºC, 30ºC y 32ºC tanto en medio rico como en medio mínimo. Sin embargo, solo la cepa que sobreexpresa Rho1 es capaz de crecer a 33ºC.

El mutante de tropomiosina *cdc8-117* es un mutante termosensible que no crece por encima de 34ºC. Como se puede observar todas las cepas tanto la transformada con el plásmido control pAL como las que sobreexpresan Rho1 y Rgf1 crecen de manera similar a las temperaturas permisiva (28ºC, 30ºC y 32ºC). Sin embargo, a la temperatura semi-permisiva de 33ºC, solo la cepa que sobreexpresa Rho1 revierte parcialmente el fenotipo termosensible del mutante *cdc8-117* (**Figura 11**). La cepa que sobreexpresa Rgf1 se comporta como la transformada con el plásmido control. A partir de 34ºC no

crece ninguna cepa, por lo que en principio solo Rho1p en multicopia actúa como supresor del defecto del mutante de la tropomiosina *cdc8-117*.

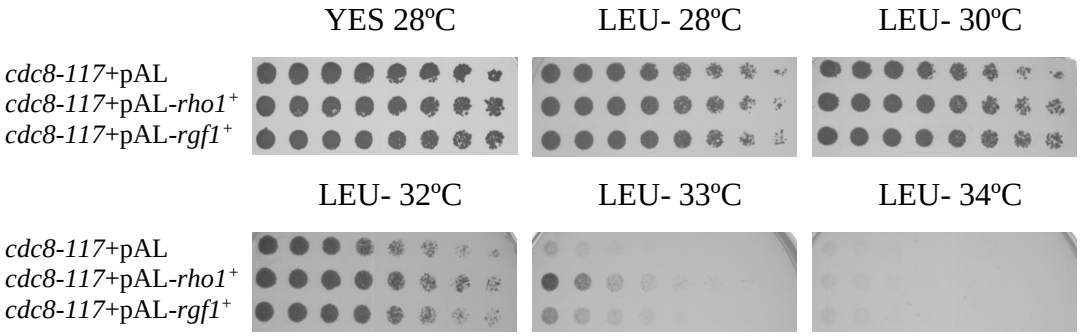

Figura 11. Ensayo de viabilidad celular del mutante *cdc8* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ e incubados a 28ºC, 30ºC, 32ºC, 33ºC y 34ºC.

En resumen, la sobreexpresión de Rho1 mejora el mutante de la formina y el de la tropomiosina, ambas proteínas participan en la formación y estabilización de los cables que forman el anillo de actomiosina esencial en citoquinesis.

4.1.4. Sobreexpresión de Rho1 en el mutante *arp3-c1* que forma parte de los parches de actina.

Para que se forme un nuevo proto-filamento de actina las subunidades deben ensamblarse en un agregado inicial o núcleo, que sea estabilizado por la unión de distintas subunidades y que después se pueda elongar rápidamente por la adición de más subunidades. A este proceso se le denomina nucleación y puede llevar un cierto tiempo dependiendo de cuantas subunidades formen el núcleo.

Los parches de actina aparecen cerca del cortex en sitios donde antes no existían filamentos de actina por lo que deben sintetizarse de novo. De los dos nucleadores de actina que se conservan entre células de mamífero y levaduras que son el complejo Arp2/3 y las forminas, solo el complejo Arp2/3 se ha encontrado en parches. Este complejo consta de varias subunidades que incluyen dos proteínas parecidas a la actina Arp2 y Arp3 (*actin related protein*) y otras 5 proteínas únicas; la deleción de cualquiera de estas subunidades excepto arc10 causa severos defectos de crecimiento o letalidad.

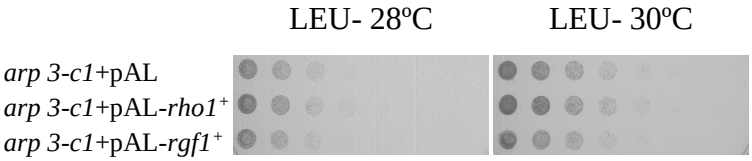

Figura 12. Ensayo de viabilidad celular del mutante *arp3-c1* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ e incubados a 28ºC y 30ºC

Nosotros hemos sobreexpresado Rho1 y Rgf1 en un mutante en la subunidad Arp3, el mutante *Arp 3-c1* es "cold sensitive", por lo que tiene una temperatura óptima más baja que el resto de mutantes. Como se muestra en la **Figura 12** no se observan diferencias entre las tres cepas. Aunque no se muestran en la figura, tampoco observamos diferencias en las placas incubadas a 22ºC y a 25ºC.

Este resultado sugiere que la función de Rho1 estaría más relacionada con la actina de los cables y del anillo de actomiosina que con la actina que forma parte de los parches

4.1.5. Sobreexpresión de Rho1 en el mutante de la cadena ligera de la miosina de clase II Myo2, *cdc4-8*.

Las células de *S. pombe* se dividen gracias a la contracción de un anillo contráctil formado por actina y miosina que se localiza en la zona media de la célula. Una de las primeras proteínas reclutadas en el proceso de formación del anillo es la cadena ligera de la miosina II, Cdc4 a la que sigue la formina Cdc12 y otras muchas proteínas. Según el modelo SCPR (*Search, Capture, Pull and Release*) los filamentos de actina nucleados desde un nodo por la formina Cdc12 serían capturados por las miosinas II de otros nodos próximos. La formina sirve además de anclaje del filamento al nodo, mientras la actividad motriz de la miosina tira de estos filamentos, generando la fuerza que mueve los nodos y los aproxima unos a otros (66).

Para saber si la sobreexpresión de Rho1 y/o Rgf1 podrían afectar a la viabilidad del mutante de la cadena ligera de la miosina Cdc4. Hicimos el mismo tipo de ensayo que con los otros mutantes. Vimos que tanto la cepa que sobreexpresa Rho1 como la sobreexpresa Rgf1 revierten el fenotipo termosensible del mutante *cdc4-8*, aunque esta última crece un poco peor que la de Rho1 (**Figura 13**). A 34ºC ninguna cepa crece.

Este dato nos sorprendió bastante porque la idea fue hacerlo como un control negativo, pensando que el mutante de las miosinas no iba a ser rescatado por la sobreexpresión de Rho1.

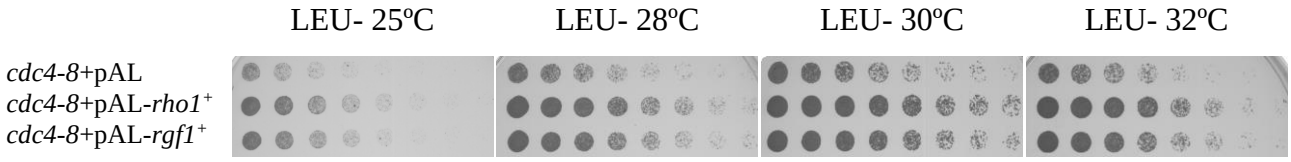

Figura 13. Ensayo de viabilidad celular del mutante *cdc4-8* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ e incubados a 25ºC, 28ºC, 30ºC y 32ºC.

4.1.6. Sobreexpresión de Rho1 en el mutante de Arp9 que forma parte del complejo remodelador de cromatina RSC.

Aunque la mayoría de las proteínas de unión a actina o ABPs son citoplásmicas, la actina y las ABPs también se encuentran en el núcleo donde se las ha relacionado con la regulación de la expresión génica (67) y con la reparación del daño en el DNA (68). Se ha encontrado actina formando complejos con cada una de las 3 RNA polimerasas eucarióticas y se ha visto que la actina participa en el exporte del mRNA del núcleo al citoplasma a través de los complejos de poro. Por otra parte, la actina y las

proteínas relacionadas con actina (Arps) se unen de manera estable a los complejos remodeladores de cromatina y, forman parte del nucleoesqueleto o matriz nuclear.

En el laboratorio contamos con el mutante de la subunidad Arp9 del complejo RSC (complejo remodelador de la familia Snf2). Después de hacer una búsqueda y analizar el fenotipo de varios mutantes con delecciones en actin-related-proteins (Arps) escogimos el mutante *arp9*Δ, por ser termosensible. El complejo RSC controla la estructura de los promotores de la mayor parte de los genes de levaduras (21). Igual que en casos anteriores para saber si la sobreexpresión de Rho1 y/o Rgf1 podrían afectar a la viabilidad del mutante *arp9*Δ, analizamos el crecimiento de las cepas que sobreexpresan Rho1 y Rgf1. Vimos que solo la cepa que sobreexpresa Rho1 suprime parcialmente el fenotipo termosensible del mutante *arp 9*Δ (**Figura 14**) en MM-leu a 32ºC. A partir de 34ºC no crece ninguna cepa.

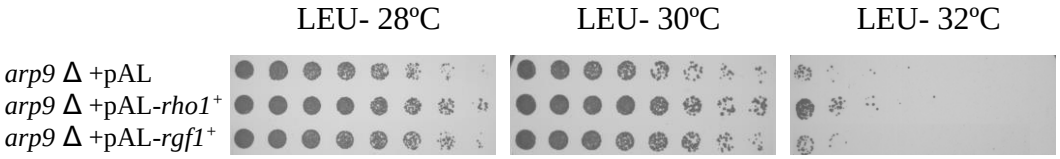

Figura 14. Ensayo de viabilidad celular del mutante *arp9* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ e incubados a 28ºC, 30ºC y 32ºC.

Como control del experimento anterior utilizamos el mutante de deleción de Gcn5 una de las subunidades del complejo SAGA otro de los remodeladores de cromatina pero que no es un *acti-related-protein* 8arp. El complejo SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferasa) es un co-activador trancripcional que posee diferentes actividades que incluyen la modificación de histonas y el remodelado de nucleosomas. Las proteinas Spt interaccionan con la "*TATA binding protein*", y de las del grupo Ada depende la actividad histona acetil transferasa (HAT). Gcn5 tiene actividad acetil transferasa. En la **Figura 15** se puede ver que la sobreexpresión de Rho1 no suprime la mutación de *gcn5*. De hecho, su sobrexpresion a alta temperatura es letal ya que la cepa con el plásmido pAL-*rho1*$^+$ apenas crece a alta temperaturas (34ºC), mientras que sí lo hacen las cepas con el plásmido pAL y con pAL-*rgf1*+.

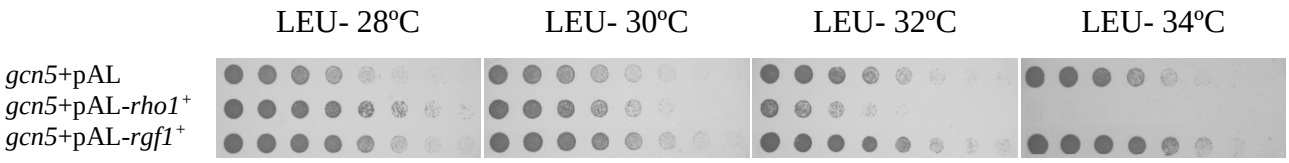

Figura 15. Ensayo de viabilidad celular del mutante *gcn5* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$ y pAL-*rgf1*$^+$ e incubados a 28ºC, 30ºC, 32ºC y 34ºC.

La conclusión que sacamos de este experimento es que Rho suprime específicamente al mutante *arp9* (una actin-related-protein) y no a cualquiera de las subunidades de un complejo remodelador como es el mutante nulo de Gcn5.

4.2. Sobreexpresión de Rgf1, Rgf2 y Rgf3 en mutantes de tropomiosina y de formina.

En los mutantes de la tropomiosina (*cdc8-117*) y de la formina (*cdc12-112*) habíamos observado que Rho1 suprime parcialmente el fenotipo termosensible, pero Rgf1 no lo hace. Nos preguntamos si alguno de los otros GEFs o activadores de Rho1 eran los responsables de este fenotipo. Para ello se transformaron los 2 mutantes con los plásmidos pAL-*rgf2*$^+$ y pAL-*rgf3*$^+$. En la **Figura 16** se observa que a temperatura permisiva (28ºC, 30ºC y 32ºC), todas las cepas crecen de manera similar. Sin embargo, a 33ºC, solo la cepa que sobreexpresa Rho1 y la que sobreexpresa Rgf2 revierten parcialmente el fenotipo. Es curioso que sea Rgf2 el que suprime ya que es un GEF que activa a Rho1 en el proceso de esporulación y no lo haga Rgf3 que es especifico de citoquinesis. Pero también sabemos que Rgf2 comparte una función esencial con Rgf1 durante el crecimiento vegetativo por lo que su efecto sobre estas proteínas reguladoras de actina podría estar enmascarado.

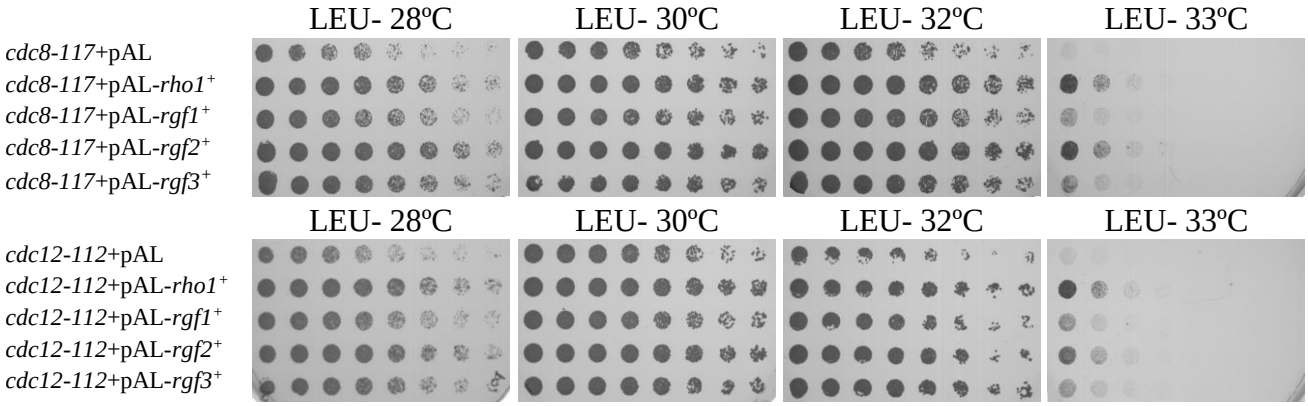

Figura 16. Ensayo de viabilidad celular del mutante *cdc8-117* y *cdc12-112* transformado con pAL, pAL-*rho1*$^+$, pAL-*rgf1*$^+$, pAL-*rgf2*$^+$ y pAL-*rgf3*$^+$ e incubados a 25ºC, 28ºC, 30ºC y 32ºC.

4.3. Construcción del plásmido pAU-*rho1*$^+$

Nos interesaba estudiar si había cambios en la morfología celular y en la localización de la actina en los mutantes en los que habíamos visto que Rho1 suprimía parcialmente la termosensibilidad. Para visualizar la actina utilizamos el péptido Life-Act (LA) marcado con GFP (LA:GFP) (69). Este péptido consta de 16 aa, proviene de la proteína Abp140 (*actin binding protein 40*) de *S. cerevisiae* y se une a la actina tanto en su forma monomérica como polimérica. El péptido LA:GFP se integra en el locus *leu1-32* y hace a las células de los mutantes prototrofas para leucina. Obtuvimos las cepas

cdc8-117 LA:GFP, *cdc12-112* LA:GFP, *cdc4-8* LA:GFP y *arp9*Δ LA:GFP, pero todos ellas son *leu*$^{+,}$ y resultan inservibles si queremos transformarlas con los plásmidos pAL y pAL-*rho1*$^{+}$.

Para solventar este problema construimos el plásmido pAU-*rho1*$^{+}$ (**Figura 17**) que lleva como marcador de selección uracilo (el gen *ura3*$^{+}$) en lugar de leucina (el gen LEU2). Para obtener el plásmido pAU-*rho1*$^{+}$, partimos del plásmido pAL-*rho1*$^{+}$ (inserto) y del vector vacío pAU. El gen rho1 se obtuvo de pAL-*rho1*$^{+}$ cortando con las enzimas de restricción Kpn y SacII y se clono en el vector pAU cortado con las mismas enzimas de restricción.

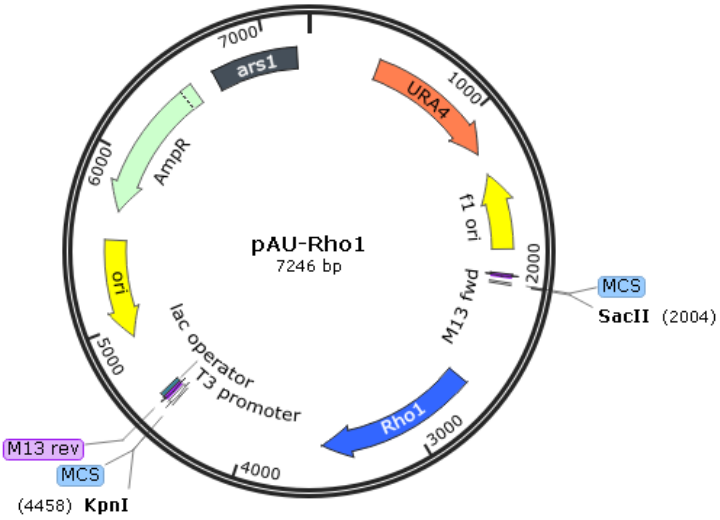

Figura 17. Esquema del plásmido pAU-Rho1 en el que se representa de color amarillo el gen *Rho1*.

Antes de visualizar la actina en los mutantes marcados con LA:GFP, comprobamos que la sobreexpresión de Rho en el plasmido pAU-*rho1*$^{+}$ también suprimía los defectos de los mutantes a la temperaturas semipermisiva mediante ensayos de gota (datos no mostrados).

4.4. Visualización de actina en los mutantes *cdc8-117*, *cdc12-112* y *arp9*Δ.

Se estudió la morfología celular de los mutantes *cdc8-117*, *cdc12-112* y *arp9*Δ transformados con pAU y con pAU-*rho1*$^{+}$ a 25ºC y a 37ºC ya que eran unos de los mutantes que revertían la termosensibilidad de la sobreexpresión de Rho1. Para ello se tomaron fotografías en el microscopio de contraste interferencial (DIC) de células procedentes de cultivos líquidos en fase logarítmica a la temperatura permisiva de 25º C y a la restrictiva de 37ºC durante 4 horas. La actina se visualizó en verde ya que todas las cepas estaban marcadas con LA:GFP. Además, la cepa *cdc8-117* también llevaba integrada en el genoma Cut11-mRPF, una proteína de la envuelta nuclear.

En la **Figura 18**, se pueden apreciar las fotografías de DIC y fluorescencia de las células del mutante *cdc8-117* a 25ºC y a 37ºC. A 25ºC no hay prácticamente diferencias entre la cepa control y la que sobreexpresa Rho1. Sin embargo, a 37ºC, hay muchas células lisadas (arrugadas) en la cepa control mientras que en la que sobreexpresa Rho1p no hay prácticamente lisadas y el cultivo tiene mucho mejor aspecto. En cuanto a la actina en el mutante a 37ºC está muy polarizada (cúmulos de actina en

los polos) y prácticamente no se ven cables mientras que en la cepa que sobreexpresa Rho1 la actina no esta tan polarizada y se pueden ver algunos cables.

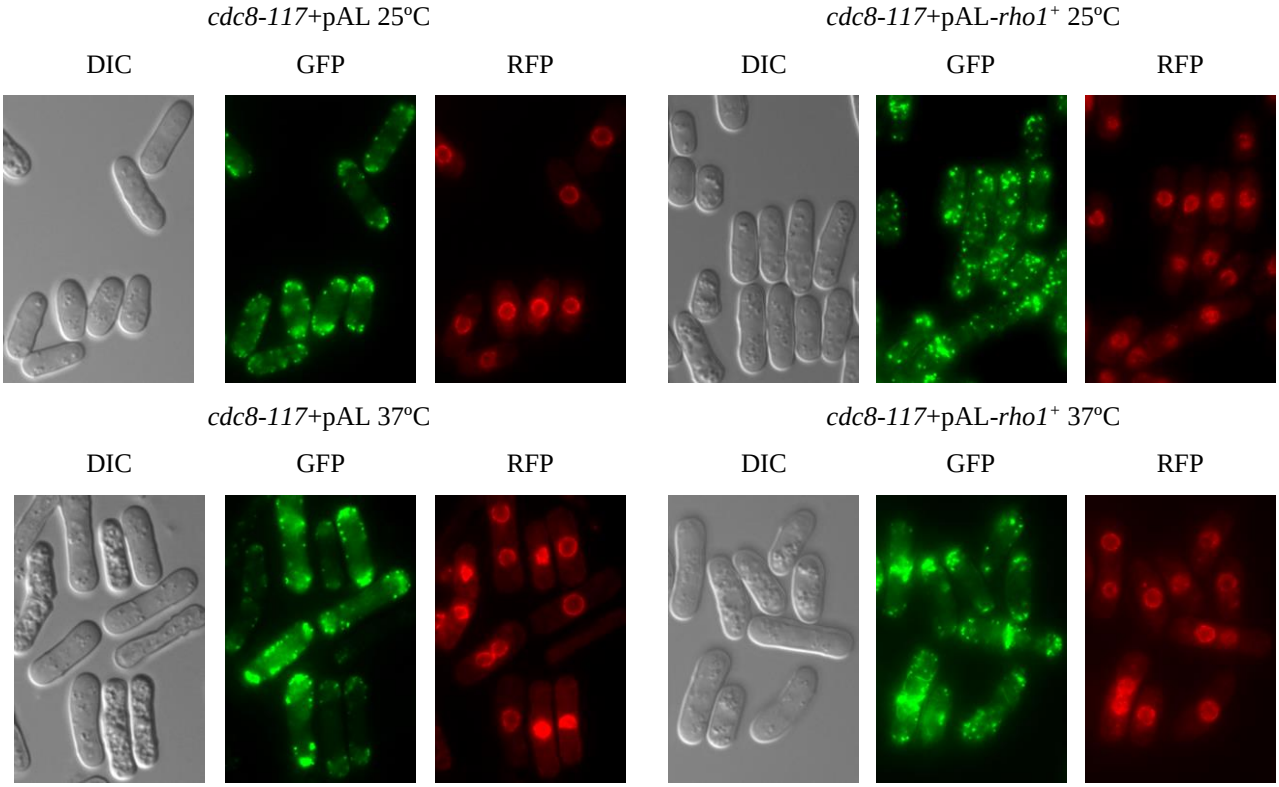

Figura 18. Micrografías DIC, pact-LAGFP, 3mRFP de izquierda a derecha de cada cepa y temperatura.

En el mutante *cdc12-112*, también apreciamos algunas diferencias entre la cepa que sobreexpresa Rho1 y su control. A 37ºC el mutante *cdc12-112* presenta células muy largas (que probablemente no hayan completado la citoquinesis) y por ello no hay septos. Sin embargo, las células que sobrexpresan Rho1 presentan mayor número de septos. No hemos apreciado diferencias en el citoesqueleto de actina, para hacerlo habría que seguir su comportamiento durante la citoquinesis en experimentos de time-lapse (tiempo real) (**Figura 19**).

Finalmente, analizamos la morfología las células y visualizamos la actina en el mutante *arp9*Δ (**Figura 19**) que forma parte del complejo remodelador de cromatina RSC. En este caso para ver la actina en el núcleo utilizamos una LifeAct:GFP con una secuencia de localización nuclear (NLS) capaz de dirigir el péptido al núcleo. Como en el caso de cdc8-117, a la temperatura restrictiva (37ºC) hay menos células lisadas y el cultivo tiene mejor aspecto en la cepa que sobreexpresa Rho1 que en el control. En cuanto a la visualización de actina en el núcleo, es difícil de hacer un juicio certero, pero parece que la tinción es menos homogénea en el control *arp9*Δ a 37ºC que en la que sobreexpresa Rho1, en la primera hay más células en las que la actina parece difusa, pero también puede ser debido a que hay más células lisadas.

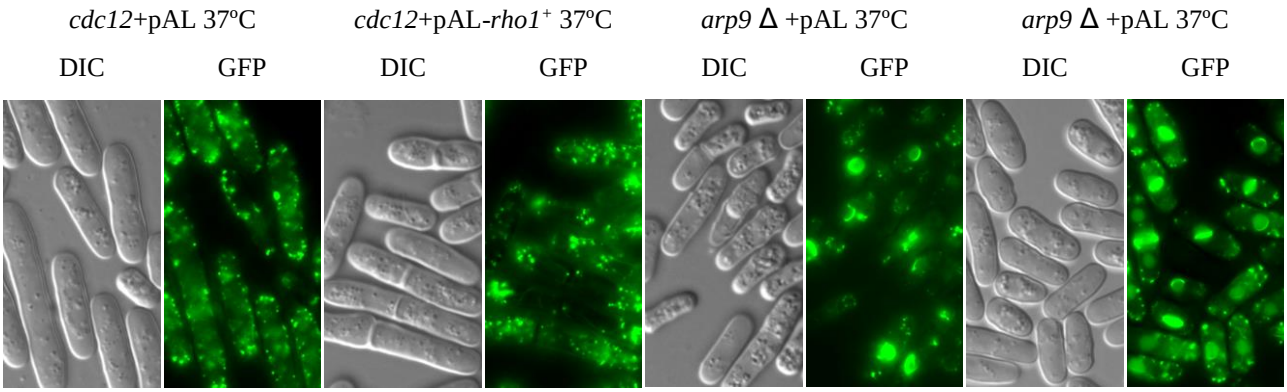

Figura 19. Micrografías DIC, pact-LAGFP de izquierda a derecha de cada cepa.

4.5. Conclusiones

Nuestros datos sugieren que la función de Rho1 estaría más relacionada con la actina de los cables y del anillo de actomiosina que con la actina que forma parte de los parches.

Hemos visto que la sobreexpresión de Rho1 suprime el fenotipo termosensible de mutantes de la tropomiosina, cuya función es estabilizar los filamentos de actina, y de la formina Cdc12 que se encarga de la formación de los filamentos de actina que componen el anillo. También suprime el fenotipo del mutante de la miosina de clase 2 encargada de aproximar los filamentos de actina durante la contracción del anillo. Estos datos coinciden con los obtenidos mediante microscopia: (i) la sobreexpresion de Rho1 permite la visualización de los cables en el mutante de la tropomiosina a la temperatura restrictiva y (ii) en el mutante de la formina que sobreexpresa Rho1 observamos un aumento del número de células con septo que han conseguido completar la citoquinesis,

Estos resultados son preliminares, pero abren nuevas posibilidades para estudiar el papel de esta GTPasa en el citoesqueleto de actina.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Hoffman CS, Wood V, Fantes PA. An ancient yeast for young geneticists: A primer on the Schizosaccharomyces pombe model system. Genetics. 1 de octubre de 2015;201(2):403-23.
2. Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, Lyne M, Lyne R, Stewart A, et al. The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe. Nature [Internet]. 2002;415(6874):871-80. Disponible en: https://doi.org/10.1038/nature724
3. Merlini L, Dudin O, Martin SG. Mate and fuse: How yeast cells do it. Open Biol. 2013;3(MAR).
4. Yamashita A, Sakuno T, Watanabe Y, Yamamoto M. Analysis of schizosaccharomyces pombe meiosis. Cold Spring Harb Protoc. 2017;2017(9):681-9.
5. Leupold U. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei Schizosaccharomyces Pombe. Ctes rend Lab Carlsberg, Sér Physiol [Internet]. 1949;(24):381-480. Disponible en: http://books.google.es/books?id=YjyyNQAACAAJ
6. Mitchison JM, Nurse P. Growth in cell length in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. J Cell Sci. 1985;75:357-76.
7. Hayles J, Nurse P. A journey into space. Vol. 2, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2001. p. 647-56.
8. Chang F, Martin SG. Shaping fission yeast with microtubules. Vol. 1, Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2009.
9. Roncero C, Sánchez Y. Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: The assembly of a septum. Yeast. 2010;27(8):521-30.
10. Daga RR, Chang F. Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(23):8228-32.
11. Daga RR, Nurse P. Interphase microtubule bundles use global cell shape to guide spindle alignment in fission yeast. J Cell Sci. 2008;121(12):1973-80.
12. Sawin KE, Tran PT. Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. Yeast. 2006;23(13):1001-14.
13. Hagan IM, Hyams JS. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. J Cell Sci. 1988;89 (Pt 3):343-57.
14. Pardo M, Nurse P. Equatorial retention of the contractile actin ring by microtubules during cytokinesis. Science (80-). 2003;300(5625):1569-74.
15. Marks J, Hagan IM, Hyams JS. Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. J Cell Sci Suppl. 1986;5:229-41.
16. Kovar DR, Sirotkin V, Lord M. Three's company: The fission yeast actin cytoskeleton. Trends Cell Biol [Internet]. 2011;21(3):177-87. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2010.11.001
17. Gachet Y, Hyams JS. Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. J Cell Sci. 15 de septiembre de 2005;118(18):4231-42.
18. Rotty JD, Wu C, Bear JE. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. Nat Rev Mol Cell Biol. enero de 2013;14(1):7-12.
19. Lee WL, Bezanilla M, Pollard TD. Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. J Cell Biol. 13 de noviembre de 2000;151(4):789-99.
20. 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. Mol Biol Cell. 15 de agosto de 2010;21(16):2894-904.
21. Ye Y, Wu H, Chen K, Clapier CR, Verma N, Zhang W, et al. Structure of the RSC complex bound to the nucleosome. Science (80-). 15 de noviembre de 2019;366(6467):838-43.
22. Kamasaki T, Arai R, Osumi M, Mabuchi I. Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. Nat Cell Biol. septiembre de 2005;7(9):916-7.
23. Tang Q, Billington N, Krementsova EB, Bookwalter CS, Lord M, Trybus KM. A single-headed fission yeast myosin V transports actin in a tropomyosin-dependent manner. J Cell Biol. 18 de julio de 2016;214(2):167-79.
24. Feierbach B, Chang F. Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. Curr Biol. 30 de octubre de 2001;11(21):1656-65.
25. Pelham RJ, Chang F. Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast.

Nature. 2002;419(6902):82-6.
26. Mishra M, Huang J, Balasubramanian MK. The yeast actin cytoskeleton. FEMS Microbiol Rev. 2014;38(2):213-27.
27. Willet AH, McDonald NA, Gould KL. Regulation of contractile ring formation and septation in Schizosaccharomyces pombe. Curr Opin Microbiol. 2015;28:46-52.
28. Yonetani A, Chang F. Regulation of Cytokinesis by the Formin cdc12p. Curr Biol. 23 de marzo de 2010;20(6):561-6.
29. Balasubramanian MK, Bi E, Glotzer M. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. Curr Biol. 2004;14(18).
30. Johnson AE, Mccollum D, Gould KL. Polar opposites: Fine-tuning cytokinesis through SIN asymmetry. Cytoskeleton. 2012;69(10):686-99.
31. Ueyama T. Rho-Family Small GTPases: From Highly Polarized Sensory Neurons to Cancer Cells. Cells [Internet]. 28 de enero de 2019 [citado 9 de febrero de 2020];8(2):92. Disponible en: http://www.mdpi.com/2073-4409/8/2/92
32. Hall A. Rho family GTPases. En: Biochemical Society Transactions. 2012. p. 1378-82.
33. García P, Tajadura V, García I, Sánchez Y. Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. Yeast [Internet]. 15 de octubre de 2006 [citado 10 de febrero de 2020];23(13):1031-43. Disponible en: http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1409
34. Perez P, Rincón SA. Rho GTPases: Regulation of cell polarity and growth in yeasts. Vol. 426, Biochemical Journal. 2010. p. 243-53.
35. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. Vol. 129, Cell. Cell Press; 2007. p. 865-77.
36. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. Vol. 93, Physiological Reviews. 2013. p. 269-309.
37. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci. 1 de marzo de 2005;118(5):843-6.
38. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. BioEssays [Internet]. abril de 2007 [citado 1 de diciembre de 2019];29(4):356-70. Disponible en: http://doi.wiley.com/10.1002/bies.20558
39. Liu M, Bi F, Zhou X, Zheng Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. Trends Cell Biol. 2012;22(7):365-73.
40. Arellano M, Coll PM, Pérez P. RHO GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. Microsc Res Tech. 1999;47(1):51-60.
41. Garcia P, Tajadura V, Sanchez Y. The rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. Mol Biol Cell. 15 de enero de 2009;20(2):721-31.
42. Sánchez-Mir L, Soto T, Franco A, Madrid M, Viana RA, Vicente J, et al. Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. PLoS One. 2014;9(1).
43. Arellano M, Durán A, Pérez P. Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in Schizosaccharomyces pombe morphogenesis. EMBO J. 1996;15(17):4584-91.
44. Nakano K, Arai R, Mabuchi I. The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Genes to Cells. 1997;2(11):679-94.
45. Arellano M, Duran A, Perez P. Localisation of the Schizosaccharomyces pombe rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. J Cell Sci. 1997;110(20):2547-55.
46. García P, Tajadura V, García I, Sánchez Y. Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. Mol Biol Cell. abril de 2006;17(4):1620-31.
47. Tajadura V, García B, García I, García P, Sánchez Y. Schizosaccharomyces pombe Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall β-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. J Cell Sci. 2004;117(25):6163-74.
48. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(2):167-80.
49. Taira K, Umikawa M, Takei K, Myagmar BE, Shinzato M, Machida N, et al. The traf2- and nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton. J Biol Chem.

2004;279(47):49488-96.
50. Bassi ZI, Audusseau M, Riparbelli MG, Callaini G, D'Avino PP. Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(24):9782-7.
51. Muñoz S, Manjón E, García P, Sunnerhagen P, Sánchez Y. The checkpoint-dependent nuclear accumulation of Rho1p exchange factor Rgf1p is important for tolerance to chronic replication stress. Mol Biol Cell. 2014;25(7):1137-50.
52. Morrell-Falvey JL, Ren L, Feoktistova A, Den Haese G, Gould KL. Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. J Cell Sci. 2005;118(23):5563-73.
53. Mutoh T, Nakano K, Mabuchi I. Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. Genes to Cells [Internet]. diciembre de 2005 [citado 9 de diciembre de 2019];10(12):1189-202. Disponible en: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2443.2005.00908.x
54. Moreno S, Klar A, Nurse P. Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Methods Enzymol. 1 de enero de 1991;194(C):795-823.
55. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA. Current Protocols in Molecular Biology Kevin Struhl (eds.) Current Protocols in Molecular Biology. 1995; Disponible en: http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/PCR(1)/Current Protocols in Mol. Biol..pdf
56. Sambrock, J; Russell DW. «Molecular cloning, a laboratory manual». Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb N Y. 2001;
57. Based, Zhou C, Yujun Y, Jong AY. Ten-minute plasmid DNA minipreps. Biotechniques. 1990;8:172-3.
58. Kushner SR. An improved method for transformation of E. coli with ColE1 derived plasmids. Genet Eng (N Y). 1978;17-23.
59. Golub EI. «one minute» transformation of competent E.coli by plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1988;16(4):1641.
60. Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol. 1983;153(1):163-8.
61. Manjón E, Edreira T, Muñoz S, Sánchez Y. Rgf1p (Rho1p GEF) is required for double-strand break repair in fission yeast. Nucleic Acids Res [Internet]. 19 de mayo de 2017 [citado 9 de febrero de 2020];45(9):5269-84. Disponible en: https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkx176
62. Ishiguro J, Kobayashi W. An actin point-mutation neighboring the «hydropbobic plug» causes defects in the maintenance of cell polarity and septum organization in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. FEBS Lett. 2 de septiembre de 1996;392(3):237-41.
63. Carlier MF, Pernier J, Montaville P, Shekhar S, Kühn S. Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility. Vol. 72, Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG; 2015. p. 3051-67.
64. Skoumpia K, Coulton AT, Lehmann W, Geeves MA, Mulvihill DP. Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. J Cell Sci. 1 de mayo de 2007;120(9):1635-45.
65. Skau CT, Kovar DR. Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. Curr Biol. 24 de agosto de 2010;20(16):1415-22.
66. Vavylonis D, Wu JQ, Hao S, O'Shaughnessy B, Pollard TD. Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. Science (80-). 4 de enero de 2008;319(5859):97-100.
67. Rajakylä EK, Vartiainen MK. Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. Vol. 5, Small GTPases. Taylor and Francis Inc.; 2014.
68. Caridi CP, Plessner M, Grosse R, Chiolo I. Nuclear actin filaments in DNA repair dynamics. Vol. 21, Nature Cell Biology. Nature Publishing Group; 2019. p. 1068-77.
69. Huang G-J, Ho J-H, Prabhakar C, Liu Y-H, Peng S-M, Yang J-S. Site-Selective Hydrogen-Bonding-Induced Fluorescence Quenching of Highly Solvatofluorochromic GFP-like Chromophores. Org Lett [Internet]. 5 de octubre de 2012 [citado 7 de febrero de 2020];14(19):5034-7. Disponible en: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ol302237k