

## Relación de las proteínas Wsc1p y Rgf1p en la biosíntesis de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*

Relationship of the Wsc1p and Rgf1p Proteins in the Biosynthesis of the Cell Wall of *Schizosaccharomyces pombe*

Sandra Margarita Cruz Quintana<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8510-1294>

Pedro Díaz Sjostrom<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4546-0986>

Michel Leiva Mora<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1846-4060>

Oscar Patricio Núñez Torres<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9593-5850>

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Ambato. Tungurahua, Ecuador.

\*Autor para la correspondencia: [sm.cruz@uta.edu.ec](mailto:sm.cruz@uta.edu.ec)

### RESUMEN

**Introducción:** La pared celular fúngica es una estructura esencial para el mantenimiento de la morfología y protege a las células frente a las condiciones adversas del medio externo, por lo que su conocimiento es importante para identificar dianas para el desarrollo de nuevos antifúngicos. Wsc1p se ha caracterizado como posible sensor de los daños de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe* y Rgf1p es uno de los activadores de la GTPasa Rho1p, que integra la cascada de señalización de integridad celular.

**Objetivo:** Identificar la relación de las proteínas WSC1p y Rgf1p en la biosíntesis de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*.

**Métodos:** Se emplearon técnicas de clonación molecular, métodos genéticos, técnicas de microscopía, Western Blot, determinación de la actividad de Pmk1p bajo condiciones de estrés y análisis informático de las secuencias de ADN y proteínas.

**Resultados:** Las proteínas Wsc1p y Rgf1p colocalizan en el septo y los polos, la delección simultánea de los genes *wsc1<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* es letal; sin embargo, la sobreexpresión de Rgf1p no es letal en el mutante *wsc1Δ*, además la sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* aumenta los niveles

de fosforilación de Pmk1p, a través del módulo de MAP kinasas y depende parcialmente de Rgf1p.

**Conclusiones:** La sobreexpresión de Wsc1p aumenta la cantidad de pared celular, lo que es un estrés para la célula y podría actuar activando la cascada de integridad celular, parcialmente, a través de Rgf1p.

**Palabras clave:** pared celular; sensor; biosíntesis; cascada de señalización; integridad celular; Wsc1p; Rgf1p.

## ABSTRACT

**Introduction:** The fungal cell wall is a structure essential for the maintenance of morphology. It protects cells against adverse conditions provoked by the external environment, a reason why possessing knowledge about it is important to identify targets for the development of new antifungal agents. Wsc1p has been characterized as a possible sensor for cell wall damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, while Rgf1p is one of the activators of the GTPase Rho1p, which integrates the cell integrity signaling cascade.

**Objective:** To identify the relationship of the WSC1p and Rgf1p proteins with the biosynthesis in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*.

**Methods:** Molecular cloning techniques, genetic methods, microscopy techniques, Western Blot, determination of Pmk1p activity under stress conditions, as well as computer analysis of DNA and protein sequences were used.

**Results:** The Wsc1p and Rgf1p proteins are colocalized in the septum and the poles. Simultaneous deletion of the *wsc1<sup>+</sup>* and *rgf1<sup>+</sup>* genes is lethal. However, the overexpression of Rgf1p is not lethal in the *wsc1Δ* mutant; in addition, the overexpression of *wsc1<sup>+</sup>* increases the levels of phosphorylation of Pmk1p, through the MAP kinase module, and depends only partially on Rgf1p.

**Conclusions:** The overexpression of Wsc1p increases the amount of cell wall, which is a stress for the cell and could act by activating the cell integrity cascade, partially, through Rgf1p.

**Keywords:** cell wall; sensor; biosynthesis; signaling cascade; cell integrity; Wsc1p; Rgf1p.

Recibido: 27/03/2020

Aceptado: 24/09/2020

## Introducción

La pared celular fúngica es una estructura clave para resistir las adversidades ambientales y es una diana potencial para los agentes antifúngicos. En los hongos la señalización celular y la plasticidad de la pared celular son cruciales para mantener los procesos fisiológicos. Las proteínas sensoras del daño en la pared celular fúngica se localizan en la membrana plasmática y desencadenan complejas cascadas de señalización que llevan a la regulación transcripcional dentro de los núcleos.<sup>(1)</sup>

Se han descrito cinco sensores de integridad de la pared celular (Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1) en *Saccharomyces cerevisiae*, que detectan el daño e interaccionan con Rom2p, que es un componente de la ruta de señalización de integridad celular.<sup>(2,3)</sup> Entre Wsc1p de *S. pombe* y Wsc1p de *S. cerevisiae* el porcentaje de aminoácidos idénticos es del 30 % y al analizar los aminoácidos conservados o con funciones similares, este porcentaje aumenta hasta un 48 %.<sup>(4)</sup>

La ORF (marco de lectura abierto), correspondiente al gen *wsc1*<sup>+</sup>, consta de 1125 pb, y codifica una proteína de 374 aminoácidos (aa') con un peso molecular aproximado de 38,3 kDa y se encuentra en el cromosoma II. Esta proteína presenta un dominio extracitoplásmico (1-292 aa') y posee una secuencia correspondiente a un péptido señal (1-20 aa'). Además, presenta un motivo con 8 cisteínas, llamado también dominio Wsc o dominio rico en cisteínas (CRD) (34-109 aa'), que forma una estructura al final de la barra de serinas y treoninas y que podría "sentir" señales y modular la actividad de la proteína.<sup>(5)</sup>

La secuencia continúa con un dominio rico en residuos de serina y treonina (STR) que podría estar fuertemente glicosilado, y un dominio transmembrana (293-315 aa'). La cola citoplásmica (316-374 aa') se caracteriza por la presencia de aminoácidos cargados negativamente (5 de ácido aspártico).<sup>(6)</sup>

En *S. pombe*, Rho1p es una GTPasa homóloga de RhoAp humana y tiene varias funciones, como la de regular la integridad celular y crecimiento polarizado. La actividad de Rho1p está regulada por tres GEF (factor intercambiador de nucleótido de guanina), Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, que catalizan el intercambio de GDP a GTP, lo que hace que la GTPasa se encuentre en estado activo. Rgf1p específicamente participa en la síntesis de la pared celular, citoesqueleto de actina e integridad celular, es el único GEF de Rho1p conocido que es componente de la cascada de integridad en *S. pombe*.<sup>(7,8)</sup>

La ORF correspondiente al gen *rgf1*<sup>+</sup> consta de 4 Kb y codifica una proteína de 1334 aminoácidos (aa') con un peso molecular estimado de 150.1 kDa. El análisis detallado de

la secuencia proteica revela la presencia de cuatro dominios altamente conservados, un dominio DEP (*Dishevelled*, *Egl-10* y *Pleckstrin*, aa' 424-497), un dominio DH (*Dbl homology*), también llamado RhoGEF (aa' 469-653), un dominio PH (*Plekstrin Homology*, aa' 693-855) y un dominio CNH (*Citron Kinase Homology*, aa' 935-1239). El dominio RhoGEF se encuentra presente en todas las proteínas con función intercambiadora de nucleótidos de guanina, para GTPasas de la familia Rho. Los datos bioquímicos disponibles hasta el momento proponen que el dominio DH es el responsable de la unión y activación de las GTPasas, mientras que el dominio PH podría intervenir en la localización subcelular de las proteínas y en la regulación de la actividad del dominio DH. La función de los dominios DEP y CNH no está clara, pero en muchos casos actúan como dominios reguladores relacionados con interacciones macromoleculares.<sup>(9)</sup>

*Schizosaccharomyces pombe* es un modelo atractivo para estudiar la morfogénesis celular; esta levadura tiene forma cilíndrica, crece de forma asimétrica polarizada por la extensión de los extremos y se divide por fisión binaria. La forma de la célula de *S. pombe* está determinada por el citoesqueleto de actina, los microtúbulos y la pared celular.<sup>(10)</sup>

Los principales componentes estructurales de la pared celular de *S. pombe* son  $\beta(1,3)$ -d-glucano y  $\beta(1,6)$ -glucano (46 % al 54 %), los  $\alpha(1,3)$ -d-glucanos (18 % a 28 %) y galactomanano (9 % a 14 %).<sup>(11)</sup> La pared celular debe estar conectada al anillo de actomiosina a través de la membrana plasmática, y esto probablemente involucre una o varias proteínas de membrana capaces de conectar el espacio periplásmico con el citoplasma.<sup>(12)</sup>

Tanto Wsc1p como Rgf1p intervienen en la biosíntesis de la pared celular de *S. pombe*, por lo que el propósito de la investigación es identificar la relación entre las proteínas WSC1p y Rgf1p en la biosíntesis de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*.

## Métodos

Para determinar la relación existente entre las proteínas Wsc1p y Rgf1p se realizó una investigación experimental, donde el microorganismo que se utilizó, mayoritariamente, fue la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Para realizar los trabajos de clonación molecular se utilizaron también diferentes cepas de *Escherichia coli* como DH5a (Life Technologies) y CJ236 (BioRad). Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* son los descritos por Moreno,<sup>(13)</sup> medio rico (YES), medio

mínimo (EMM o MM) y medio de esporulación (MEA). Para el cultivo de *E. coli* se utilizaron los medios LB (Luria-Bertani) y 2xYT.

Para determinar la localización subcelular de Wsc1p y Rgf1p se fusionó la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) en Wsc1p y rojo Tomato en Rgf1p, justo antes del codón de parada de la secuencia del gen. Esta construcción se integró en el genoma de los mutantes *wsc1Δ* y *rgf1Δ*, respectivamente, y bajo el control de su propio promotor, de esta forma la totalidad de las proteínas está marcada con los fluorocromos y se pudo visualizar en un microscopio de fluorescencia.

Se realizó una búsqueda con la secuencia “ScWsc1p” en la base de datos de *Schizosaccharomyces pombe* (levadura de fisión); por homología se consideró para el presente estudio SPBC30B4.01c por tener una disposición de dominios similar a la de los sensores descritos en *S. cerevisiae*.

### Construcción de los mutantes nulos

Para eliminar la ORF correspondiente al gen *wsc1*<sup>+</sup> se utilizó la técnica de remplazamiento génico en un solo paso descrita por Rothstein,<sup>(14)</sup> para lo que se construyó un casete de delección con un marcador de selección. Mientras que la ORF del gen *rgf1*<sup>+</sup> se eliminó en dos pasos; se obtuvieron primero las regiones flanqueantes (3' y 5') por PCR (polymerase chain reaction).

### Construcción y manipulación de plásmidos

Se construyó un plásmido que lleva la fase de lectura abierta del gen *wsc1*<sup>+</sup> bajo el control del promotor *nmt1* (pREP3x-*wsc1*<sup>+</sup>). De forma similar también se construyó el plásmido pREP3x-*rgf1*<sup>+</sup> para sobreexpresar las proteínas Wsc1p y Rgf1p.

### Purificación y detección de Pmk1p-HA6H activado

Se utilizaron células de la cepa silvestre y de los mutantes con la copia genómica de *pmk1*<sup>+</sup> marcadas en su extremo 3' con HA y 6 histidinas (HA6His).<sup>(15)</sup> La proteína Pmk1p se purificó mediante bolas de Ni<sup>2+</sup> que presentan afinidad por las 6His, posteriormente se analizó la fracción de Pmk1p fosforilada mediante SDS-PAGE y Western Blot, para lo que se utilizaron anticuerpos policlonales anti-fosfo-p44/42 que detectan el estado activo de Pmk1p. Los niveles totales de Pmk1p se detectaron a partir de los extractos celulares mediante SDS-PAGE y Western Blot, con el uso de anticuerpos anti-HA.

## Microscopía y análisis de imágenes

Para realizar estas técnicas se empleó un microscopio *Leica DM RXA*, equipado con sistema de iluminación halógena y equipo de fotografía digital. Además, se utilizó el equipo Personal Deltavision Microscope (*Applied Precision*), que consta de un microscopio invertido Plympus IX-70. Se observaron las muestras por microscopía de contraste de fases y contraste interferencial (Nomarski), microscopía de fluorescencia directa con GFP (proteína verde fluorescente) y tinción con Calcoflúor.

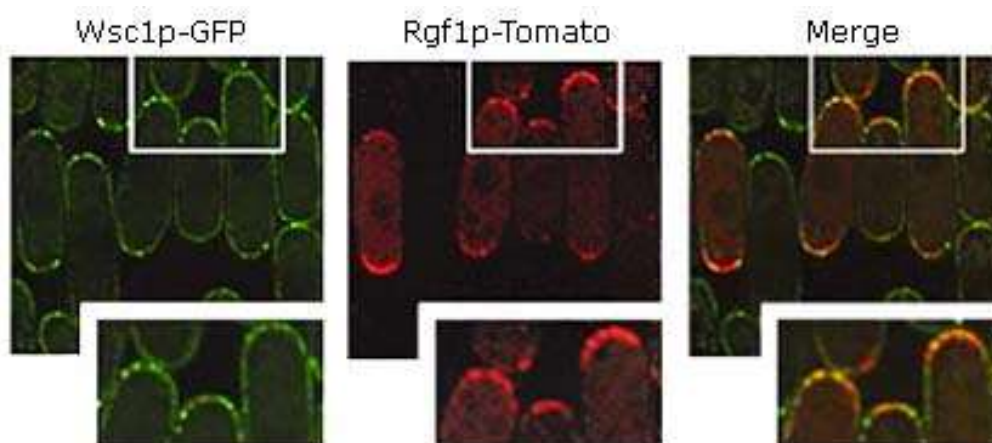
## Análisis bioinformático de los datos

Para el análisis informático de las secuencias de ADN y de aminoácidos, alineamientos de secuencias y mapas de restricción se utilizaron los programas DNASTARTM y DNASTRIDER. Las secuencias génicas y proteicas se obtuvieron de las bases de datos de *S. pombe* y de *The Wellcome Trust Sanger Institute Schizosaccharomyces pombe Gene DB*, disponible en <http://www.genedb.org/genedb/pombe/>.

## Resultados

### Localización de Wsc1p y Rgf1p

Tanto Wsc1p-GFP como Rgf1p-Tomato, colocalizan en los polos y en el septo, coincidiendo con los sitios de crecimiento activo de la célula (Fig. 1).



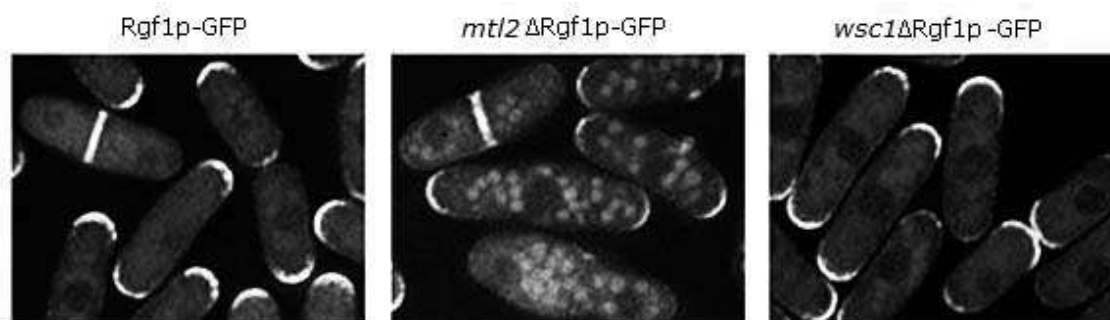
Nota: La cepa Wsc1-GFP (GRG42) fue transformada con el plásmido pAL *rgf1*<sup>+</sup> Tomato y las células se incubaron a 28 °C en YES. La fluorescencia verde (Wsc1p-GFP) y roja (Rgf1p-Tomato) coinciden en puntos discretos en los polos, ver recuadro ampliado.

(Merge: superposición de ambas fotografías, GFP y Tomato).

**Fig. 1 -** Colocalización de Wsc1p-GFP con Rgf1-Tomato.

### Localización de Rgf1p-GFP en el mutante *wsc1Δ*

Para estudiar la localización de Rgf1p en el mutante *wsc1Δ* se construyó una cepa *wsc1Δ rgf1Δ*, en la que la copia silvestre de la proteína Rgf1p está marcada con GFP e integrada en el locus *leu*. Se observa que en el mutante *wsc1Δ rgf1Δ* Rgf1p-GFP, Rgf1p se localiza normalmente en los polos y en el septo de la misma forma que lo hace en la cepa silvestre (Fig. 2).



Nota: La proteína Rgf1p-GFP integrada se visualizó en células del *wsc1Δ* (SC165).

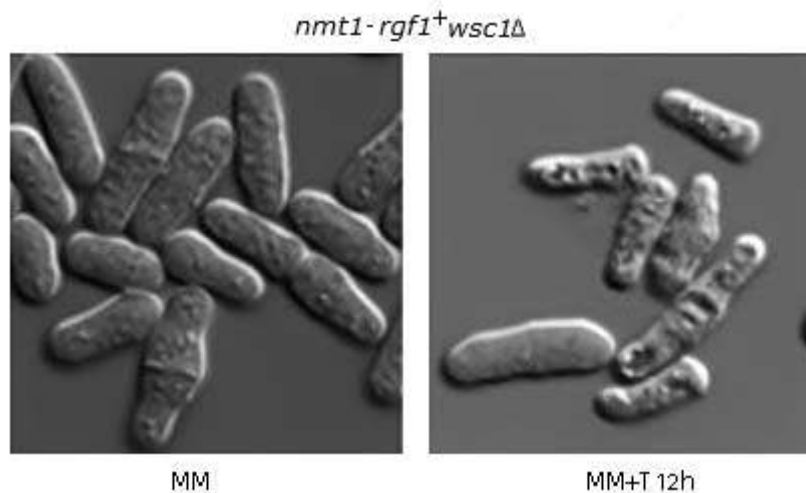
**Fig. 2** - Localización de Rgf1p-GFP en el mutante *wsc1Δ*.

### La delección simultánea de los genes *wsc1<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* es letal

Para analizar la relación funcional entre *wsc1<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* se estudió el fenotipo de cepas delecionadas en cada uno de los genes. De ese modo cuando se intentó obtener la combinación, *rgf1Δwsc1Δ*, no se obtuvo ningún mutante doble, ni al analizar las esporas al azar, ni mediante micromanipulación y posterior análisis de tétradas, lo que indica que son inviables.

Estos resultados fueron confirmados al observar el fenotipo de las cepas que se construyeron a tal efecto y se denominan “apagados”: *P81nmt1-rgf1wsc1Δ*, que lleva la delección de *wsc1<sup>+</sup>*, y la única copia de *rgf1<sup>+</sup>* existente en la célula se encuentra bajo el control de un promotor *P81nmt1*, reprimible por tiamina. Las células crecen perfectamente en ausencia de tiamina (promotor encendido), pero son incapaces de crecer en presencia de tiamina (promotor apagado) (Fig. 3). Cuando las células creciendo en fase logarítmica (sin tiamina) se “apagan”, es decir, se añade tiamina al medio de cultivo, aproximadamente el 95 % de las células, se lisan con forma alargada, un fenotipo característico del mutante *rgf1Δ*.





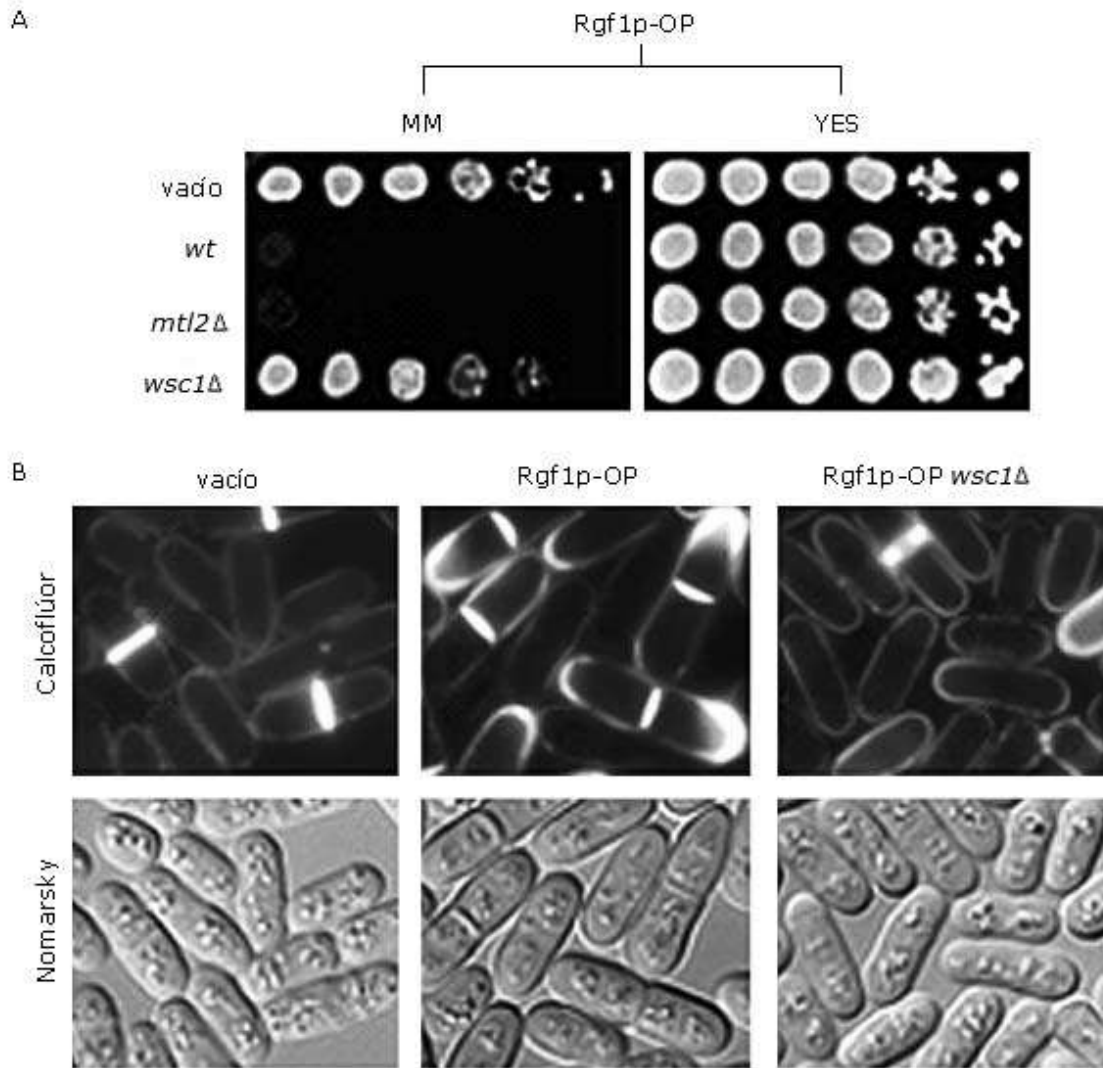
**Fig. 3** - Fotografías de contraste interferencial de las células *P81xnmt-rgf1 wsc1Δ* (SC173) tomadas en ausencia de tiamina y después de 12 horas en presencia de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tiamina para reprimir el promotor. (T: tiamina).

### La sobreexpresión de Rgf1p no es letal en el mutante *wsc1Δ*

Los datos de los apartados anteriores indican que Wsc1p podría estar involucrada en el anclaje adecuado de Rgf1p a la membrana y en su activación, pero no aclaran si Rgf1p regula la integridad celular en paralelo o por debajo de Wsc1p. Para distinguir entre estas dos posibilidades, el gen *rgf1<sup>+</sup>* fue sobreexpresado en un plásmido pPGR33 (pREP3x-*rgf1<sup>+</sup>*) en la cepa silvestre y en el mutante *wsc1Δ*.

Como se muestra en la figura 4-A las células *wsc1Δ* son prácticamente “insensibles” a la sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>* (pREP3x-*rgf1<sup>+</sup>*), y forman colonias en condiciones de desrepresión, mientras que la cepa silvestre no crece en estas condiciones. Se inocularon diluciones seriadas de las cepas wt, *mtl2Δ* (YS1220) otro posible sensor y *wsc1Δ* (GRG15) transformadas con el plásmido pREP3X-*rgf1<sup>+</sup>* y de la cepa wt con el plásmido pREP3X (vacío), en placas de MM sin tiamina y de YES, y se incubaron 3 días a 28 °C. Cuando se sobreexpresa *rgf1<sup>+</sup>* en el mutante *wsc1Δ* no se observan células de gran tamaño ni acumulaciones asimétricas de material de pared celular (que se tiñen con Calcoflúor), tal y como aparecen en la cepa silvestre transformada con el plásmido (pREP3x-*rgf1<sup>+</sup>*) (Fig. 4-B). De acuerdo con esto, la morfología de las células que sobreexpresan *rgf1<sup>+</sup>* en el mutante *wsc1Δ* fue muy parecida a la de las células de la cepa silvestre transformadas con el plásmido vacío (pREP3X).



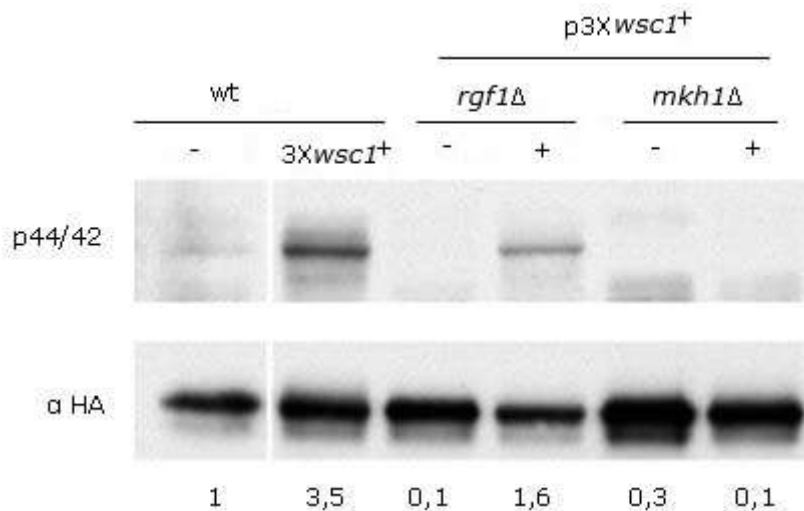


**Fig. 4-** Micrografías de contraste de Nomarsky (paneles inferiores) y de tinción con calcoflúor (paneles superiores). A) La sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>* no es letal en el mutante *wsc1Δ*. B) Se puede observar la acumulación anormal de material de pared que se tiñe con calcoflúor en la cepa silvestre pero no en el mutante *wsc1Δ*.

### La sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* aumenta los niveles de fosforilación de Pmk1p, dependiendo solo parcialmente de Rgf1p

La sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* aumenta claramente los niveles de fosforilación de Pmk1p, comparado con la cepa que lleva el plásmido vacío. Este aumento depende del módulo de MAP kinasas ya que no se produce en el mutante *mhk1Δ* un componente de la cascada, y depende solo parcialmente de Rgf1p (Fig. 5). En la parte izquierda se muestra Pmk1p obtenida a partir de células de la cepa silvestre *pmk1<sup>+</sup>*-HA6His (MI200) transformada con los plásmidos pREP3X (vacío) y pREP3X-*wsc1<sup>+</sup>*, desreprimidas en MM sin tiamina

durante 22 horas. En la parte derecha, las células de la cepa *mkh1Δ pmk1<sup>+</sup>*-HA6His (PG318) y *rgf1Δ pmk1<sup>+</sup>*-HA6His (PG285) fueron transformadas con los plásmidos pREP41X vacío y pREP3X-*wsc1<sup>+</sup>*.



Nota: La sobreexpresión de Wsc1p activa a Pmk1p, y esta activación se produce a través de *mkh1<sup>+</sup>*. La cantidad de Pmk1p, fue analizada como ya se ha descrito anteriormente, revela con anticuerpos anti-fosfo-p42/44 (arriba) o anti-HA (abajo).

**Fig. 5** – Fosforilación de Pmk1p por sobreexpresión de Wsc1p.

## Discusión

En *S. pombe* el crecimiento tiene lugar de forma polarizada y la síntesis de la pared celular se da preferentemente en la zona de los polos durante el crecimiento vegetativo y en el septo durante la división celular. De acuerdo con esto, las proteínas que intervienen en este proceso se localizan en estos lugares.<sup>(16)</sup>

Como se pudo comprobar ambas proteínas se localizan en los polos y está descrita su relación con el crecimiento polarizado en *S. pombe*. Wsc1p se localiza casi exclusivamente en el polo que crece en el mutante *tea4Δ* (Tea4p es un marcador de polaridad) mientras que se sitúa en ambos polos en la cepa silvestre.<sup>(4)</sup> Rgf1p también se localiza en los polos cuando estos se encuentran en crecimiento por lo que en su ausencia hay defectos en el crecimiento bipolar de *S. pombe*.<sup>(7)</sup> Estos resultados sugieren que Wsc1p y Rgf1p podría formar parte de complejos con otras proteínas en las zonas de crecimiento activo de la célula.

La sobreexpresión de Rgf1p es letal en la cepa silvestre y aumenta casi el doble la cantidad de β-glucano y de α-glucano de la pared celular. Si Rgf1p está regulada de algún modo

por Wsc1p o, dicho de otro modo, si la actividad de Rgf1p estuviera comprometida por la función de Wsc1p, cabría esperar que las células del mutante *wsc1Δ* fueran “resistentes” a la sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>*. Por otra parte, si Rgf1p y Wsc1p regulan la integridad celular en forma paralela, *nmt1-rgf1<sup>+</sup>* debe ser tan tóxica en células *wsc1Δ* como en las células de la cepa silvestre o podría ser aún más tóxica.<sup>(7)</sup>

Una explicación posible, aunque no la única, es que Wsc1p sea necesario para la activación de Rgf1p al menos en condiciones de estrés (como ocurre al sobreexpresar Rgf1p); en este sentido la reducción de material de pared celular (probablemente β-glucano) podría explicar por qué el mutante *wsc1Δ* es tolerante a la sobreproducción letal de Rgf1p. Estos datos sugieren que Rgf1p actúa por debajo de Wsc1p, aunque no dicen si lo hace directa o indirectamente.<sup>(4)</sup> Además Rgf1p también ha sido relacionada con la progresión normal del ciclo celular y la tolerancia al estrés crónico de la célula.<sup>(17)</sup> Recientemente se describió su participación en la vía de señalización de reparación de la rotura de la doble cadena de ADN (DBS) en la levadura de fisión.<sup>(18)</sup>

La sobreexpresión de Wsc1p aumenta los niveles de Rho1p y también aumenta la cantidad de pared celular, lo que es un estrés para la célula y podría actuar activando la cascada indirectamente. Aun así y puesto que los “sensores” comparten una función esencial en lo que respecta a la integridad celular, se pudiera pensar que solo la ausencia de los dos a la vez debería tener un efecto en la transmisión de la señal.<sup>(4,9)</sup> Wsc1p también tiene un papel importante en la respuesta a diferentes estreses químicos, iones metálicos y en la adaptación estacional al medio ambiente.<sup>(19)</sup>

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito que Wsc1p utiliza su dominio citoplásmico para interaccionar con el GEF de Rho1p, Rom2p, lo que sugiere que la interacción de Wsc1p con Rom2 facilita la activación de Rho1p.<sup>(20)</sup>

Se concluye que el Wsc1p colocaliza con Rgf1p-Tomato sobre todo en los polos y en el septo, mientras que en el mutante *wsc1Δ rgf1Δ* Rgf1p-GFP, Rgf1p se localiza normalmente en los polos y en el septo, de la misma forma que lo hace en la cepa silvestre; pero la delección simultánea de los genes *wsc1<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* es letal.

La sobreexpresión de Rgf1p no es letal en el mutante *wsc1Δ* mientras que la sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* aumenta los niveles de fosforilación de Pmk1p, este aumento depende del módulo de MAP kinasas ya que no se produce en el mutante *mhk1Δ* y depende solo parcialmente de Rgf1p. La sobreexpresión de Wsc1p aumenta la cantidad

de pared celular, lo que es un estrés para la célula y podría actuar activando la cascada de integridad celular parcialmente, a través de Rgf1p.

## Referencias bibliográficas

1. da Silva Gurgel IL, de Oliveira Santa Jorge K, Sousa de Oliveira Malacco NL, Marques Souza JA, Campos Rocha M, Faria Fernandes M, *et al.* The *Aspergillus fumigatus* Mucin MsbA Regulates the Cell Wall Integrity Pathway and Controls Recognition of the Fungus by the Immune System. *mSphere*. 2019;4(3):e00350-19. DOI: [10.1128/mSphere.00350-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00350-19)
2. Kock C, Arlt H, Ungermann C, Heinisch JJ. Yeast cell Wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signalling. *Cell Microbiol*. 2016 Sep;18(9):1251-67. DOI: [10.1111/cmi.12635](https://doi.org/10.1111/cmi.12635)
3. Levin DE. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:262-91. DOI: [10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005](https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005)
4. 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. DOI: [10.1002/mbo3.113](https://doi.org/10.1002/mbo3.113)
5. Kock C, Dufrière YF, Heinisch JJ. Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(3):806-11. DOI: [10.1128/AEM.03273-14](https://doi.org/10.1128/AEM.03273-14)
6. Banavar SP, Gómez C, Trogon M, Petzold LR, Yi TM, Campàs O. Mechanical feedback coordinates cell wall expansion and assembly in yeast mating morphogenesis. *PLoS Comput Biol*. 2018;14(1):e1005940. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1005940](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005940)
7. 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*. 2006;17:1620-31. DOI: [10.1091/mbc.e05-10-0933](https://doi.org/10.1091/mbc.e05-10-0933)
8. García P, García I, Marcos F, Ruiz de Garibay G, Sánchez Y. Fission yeast Rgf2p is a Rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of Rgf1p. *Genetics*. 2009;81:1321-34. DOI: [10.1534/genetics.108.094839](https://doi.org/10.1534/genetics.108.094839)

9. 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*. 2009;20(2):721-31. DOI: [10.1091/mbc.e08-07-0673](https://doi.org/10.1091/mbc.e08-07-0673)
10. Johnson M, Mulvihill DP. Dependency relationships within the fission yeast polarity network. *FEBS Lett*. 2018;592(15):2543-49. DOI: [10.1002/1873-3468.13180](https://doi.org/10.1002/1873-3468.13180)
11. Pérez P, Ribas JC. Radioactive Labeling and Fractionation of Fission Yeast Walls. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017(11):pdb.prot091744. DOI: [10.1101/pdb.prot091744](https://doi.org/10.1101/pdb.prot091744)
12. García Cortés JC, Ramos M, Osumi M, Pérez P, Ribas JC. The Cell Biology of Fission Yeast Septation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):779-91. DOI: [10.1128/MMBR.00013-16](https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-16)
13. Moreno S, Klar A, Nurse P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology*. EE. UU., Reino Unido: Academic Press; 1991;194:795-823. DOI: [10.1016/0076-6879\(91\)94059-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94059-1)
14. Rothstein R. Targeting, disruption, replacement and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast. In: Gurthrie, C. and Fink, G. R. (Eds), *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press;1991;194:281-301. DOI: [10.1016/0076-6879\(91\)94022-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94022-5)
15. Hercyk B, Das M. Rho Family GTPases in Fission Yeast Cytokinesis. *Commun Integr Biol*. 2019;12(1):171-80. DOI: [10.1080/19420889.2019.1678453](https://doi.org/10.1080/19420889.2019.1678453)
16. Abenza JF, Couturier E, Dodgson J, Dickmann J, Chessel A, Dumais J, et al. Wall mechanics and exocytosis define the shape of growth domains in fission yeast. *Nat Commun*. 2015;6:8400. DOI: [10.1038/ncomms9400](https://doi.org/10.1038/ncomms9400)
17. 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. DOI: [10.1091/mbc.E13-11-0689](https://doi.org/10.1091/mbc.E13-11-0689)
18. Manjón E, Edreira T, Muñoz S, Sánchez Y. Rgf1p (Rho1p GEF) is required for double-strand break repair in fission yeast. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(9):5269-84. DOI: [10.1093/nar/gkx176](https://doi.org/10.1093/nar/gkx176)
19. Tong SM, Chen Y, Zhu J, Ying SH, Feng MG. Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions. *Environ Microbiol Rep*.2016;8(2):295-304. DOI: [10.1111/1758-2229.12380](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12380)

20. Vélez-Segarra V, Carrasquillo-Carrión K, Santini-González JJ, Ramos-Valerio YA, Vázquez-Quiñones LE, Roche-Lima A, *et al.* Modelling and molecular docking studies of the cytoplasmic domain of Wsc-family, full-length Ras2p, and therapeutic antifungal compounds. *Computational Biology and Chemistry* 2019;78:338-52. DOI: [10.1016/j.compbiolchem.2019.01.001](https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.01.001)

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

*Sandra Margarita Cruz Quintana*: conceptualización; metodología; redacción-borrador original

*Pedro Díaz Sjoström*: Curación de datos; análisis formal; redacción-revisión y edición

*Michel Leiva Mora*: Curación de datos; análisis formal; redacción-revisión y edición

*Oscar Patricio Núñez Torres*: Curación de datos; redacción-revisión y edición

### **Financiación**

Título del proyecto: Los reguladores de la GTPasa Rho1p y el control de la polaridad, la integridad y la citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe*.

Entidad financiadora: CICYT (BFU2008-00963/BMC).