

**Papel de la clatrina y del
complejo AP-2 en la
morfogénesis de
*Schizosaccharomyces pombe***



Nagore De León Marcos

Tesis Doctoral, 2013



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Biología Funcional y Genómica



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica



**Papel de la clatrina y del complejo AP-2 en la
morfogénesis de *Schizosaccharomyces pombe***

**Nagore Tamara De León Marcos
2013**

El Dr. Luis Román Fernández Lago, Profesor Titular y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Papel de la clatrina y del complejo AP-2 en la morfogénesis de *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Nagore Tamara De León Marcos para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. María Henar Valdivieso Montero en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética). Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a de Octubre de 2013.

Fdo. Luis Román Fernández Lago

La Dra. María Henar Valdivieso Montero, Profesora Titular de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Papel de la clatrina y del complejo AP-2 en la morfogénesis de *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Nagore Tamara De León Marcos para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética). Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el siguiente certificado en Salamanca, a 21 de Octubre de 2013.

Fdo. María Henar Valdivieso Montero

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de una beca predoctoral del Programa de Formación del Profesorado Universitario (2009/2013) del Ministerio de Educación del Gobierno de España, proyectos del Plan Nacional de I+D (MICINN/Programa FEDER) (BFU2007-61866 y BFU2010-15085), el proyecto de la Junta de Castilla y León GR231 y la Fundación Ramón Areces.

A Áxel

Porque siempre hay algo que merece la pena

“Quien no quiere pensar es un fanático; quien no puede pensar es un idiota; quien no osa pensar es un cobarde.”

Francis Bacon (1561-1626)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han estado conmigo durante este periplo que es el realizar una Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero dar las gracias a Henar por haberme permitido formar parte de un grupo maravilloso de trabajo y, por su puesto, por haber aprendido tanto a su lado. Estos cinco años han sido muy buenos y me animan a seguir por este “tortuoso sendero” de la ciencia (no todo el mundo puede decir lo mismo...).

A mis niñas Marta, Mari y Cris, sois las mejores, sin más. Sin vosotras esos buenos momentos seguramente no lo hubiesen sido tanto. Me llevo más que a compis, a amigas. ¡Muchas gracias por todo! Y Cris, la vida nos dio que llegaste para hacernos la vida más fácil.

No me olvido de Sandra y de Fran, ¡cómo crece la familia! Espero que todo os vaya genial y disfrutéis tanto como lo he hecho yo.

A Mohammad, que aunque está lejos, todavía muchas veces nos acordamos de él por los buenos momentos pasados.

A todo el personal de apoyo y administrativo del IBFG, desde el primero hasta el último, de verdad no sabéis el trabajo tan grande que hacéis y cómo nos ayudáis en el día a día.

De verdad tengo que agradecer a todo el mundo, porque salvo raros casos, siempre me he encontrado con buenas palabras, sonrisas de pasillo, bromas, y cuando he necesitado ayuda de algún tipo nadie a dudado en echarme una mano. ¡¡GRACIAS!! Quiero hacer una mención especial a César, Yolanda, Carmen Castro, Carlos, Pilar, Fernando, Josefi... porque más que como jefes se han portado conmigo como compañeros. Pero sobre todo quiero agradecer a Paco Antequera por todo lo que me ha ayudado, por los buenos consejos y por ese aire de optimismo que te inculca, que siendo charra se agradece, y mucho.

A mis chicos, Sofi, Raúl, Mariona, David O, Irene, Miguel, Verónica, Rebe, Sara, Elvira, Carlos S. (aunque estés lejos aquí tienes que estar), todos los FAM (es que sois muchos), Javi (ex-FRI), Esther y a mucha más gente que seguro que me olvido (lo siento), por esas jornadas de biblioteca, por los cafés, los bailes, los pinchos y todos los buenos momentos pasados juntos, que han sido muchos.

A Cristina, Víctor y Javi Mérida (mi otra familia), os quiero un montón y aunque no nos veamos tanto como quisiéramos se que siempre estáis ahí, en directo o en diferido.

A Nuria, Civi, Laura, Marta (sí, otra vez), Ester, Mario, Natalia, Paco, Fran, porque estemos aquí o allá, cerca o lejos, siempre vais a ser los mejores amigos.

A los chicos del Rayo Oliva, sois fantásticos sin más (sobre todo esas chicas guapas).

A mi familia porque aunque es pequeña en componentes es enorme en cuanto a la calidad de las personas que la forman. A mi abuela Clara que siempre se preocupa y hace todo lo que puede y más por mí. A mi hermano al que quiero con locura (literalmente). A mi "nueva familia" extremeña por lo bien que me tratan siempre y por hacerme sentir una más cuando estoy con ellos.

A Nacho, ese chico del polo morado que es lo mejor que me ha pasado. He debido portarme muy bien en otra vida para poder disfrutar de una persona tan maravillosa como tú.

Y sobre todo a los mayores responsables de que haya llegado hasta aquí, mis padres, porque siempre me han apoyado, animado, criticado, ayudado, regañado y enseñado a que todo en la vida tiene su justo valor y que a cada cosa hay que darle la importancia que merece. ¡Muchas gracias por todo! Espero que estéis orgullosos de este trabajo ya que en parte es vuestro.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

αGS	α -glucán sintasa
βGS	β -glucán sintasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin di-fosfato
AMPc	Adenosin mono-fosfato cíclico
AP	Proteína adaptadora (<i>Assembly polypeptide/Adaptor protein</i>)
ARF	Factor de ADP-ribosilación (<i>ADP-ribosylation factor</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
Arp	Proteína relacionada con la actina (<i>Actin-related protein</i>)
ARS	Secuencia de replicación autónoma (<i>Autonomous Replicative Sequence</i>)
ATP	Adenosin tri-fosfato
BAR	<i>Bin/Amphiphysin/Rvs-homology</i>
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAR	Anillo contráctil de actomiosina (<i>Contractile Actomyosin Ring</i>)
CCV	Vesículas cubiertas por clatrina (<i>Clathrin Coat Vesicles</i>)
CDCFDA	5, 6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DIC	Contraste diferencial
DMSO	Dimetil Sulfóxido
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
FM4-64	[Dibromuro de N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(dietilamino) fenil) hexatrienil) piridina]
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPásica (<i>GTPase Activating Protein</i>)
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP (<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>)
GDP	Guanosina 5'-difosfato (<i>Guanosine 5' diphosphate</i>)

GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GTP	Guanosina 5'-trifosfato (<i>Guanosine 5' triphosphate</i>)
GTPasa	Guanosín trifosfato (GTP) hidrolasa
GPI	Guanosil fosfatidil inositol (<i>Glycosyl phosphatidyl inositol</i>)
HA	Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe
IP	Inmunoprecipitación
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Medio rico para <i>E. coli</i> (<i>Luria-Bertani</i>)
MAP	Proteína activada por mitógeno
Mb	Megabase
MCS	Sitio de clonación múltiple (<i>Multi Cloning Site</i>)
min	Minutos
MM	Medio mínimo
MT	Microtúbulos
MTOC	Centro organizador de microtúbulos (<i>Microtubule Organizing Centre</i>)
NETO	Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo (<i>New End Take Off</i>)
NPF	Factores promotores de la nucleación (<i>Nucleation Promoting Factor</i>)
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
ORF	Fase de lectura abierta (<i>Open Reading Frame</i>)
PAA	Distribución de microtúbulos tras anafase (<i>Post-Anaphase Array</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

PIP	Fosfatidil Inositol
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Retículo endoplasmático
RFP	Proteína roja fluorescente (<i>Red Fluorescent Protein</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
Scar/Wave	<i>Suppressor of cAR/WASP family Verprolin-homologous protein</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide -sensitive factor attachment protein receptor</i>
SPB	Cuerpo polar del huso (<i>Spindle Pole Body</i>)
T	Tiamina
TAE	Tampón Tris-Acético EDTA
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20 (<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
TGN	Red de Trans Golgi (<i>Trans-Golgi Network</i>)
TRIS	Tris-(hidroximetilamino)-metano
UDP	Uridina 5'-difosfato
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
WT	Estirpe silvestre (<i>Wild Type</i>)
YES	Medio rico para <i>S. pombe</i> (<i>Yeast Extract with Supplements</i>)

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. LAS LEVADURAS COMO MODELO DE ESTUDIO	3
2. LA LEVADURA DE FISIÓN <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
2.1. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	4
2.2. Ciclo morfo genético de <i>S. pombe</i>	5
3. EL CITOESQUELETO DE <i>S. pombe</i>	7
3.1. Citoesqueleto de actina	7
3.2. Citoesqueleto de microtúbulos	10
4. LA PARED CELULAR DE <i>S. pombe</i>	11
4.1. Funciones biológicas de la pared celular	11
4.2. Composición y estructura de la pared celular de <i>S. pombe</i>	13
4.3. Biosíntesis de los polímeros de la pared celular	14
4.4. Remodelación y degradación de la pared celular de <i>S. pombe</i>	18
5. MECANISMOS DE TRÁFICO VESICULAR	19
5.1. Formación de la vesícula	20
5.2. Transporte de la vesícula a través del citoplasma	23
5.3. Desensamblaje de la cubierta proteica	24
5.4. Anclaje a la membrana	24
5.5. Fusión con el compartimento aceptor	25
6. TRÁFICO VESICULAR MEDIADO POR CLATRINA	26
6.1. Clatrina	26
6.1.1. Estructura de la clatrina	26
6.1.2. Funciones de la clatrina	28
6.2. Adaptadores de clatrina	30
6.2.1. Complejos adaptadores (APs)	30
6.2.2. Otros adaptadores	34
6.3. Endocitosis mediada por clatrina	35
6.4. Secreción mediada por clatrina	37
7. TRÁFICO VESICULAR INDEPENDIENTE DE CLATRINA	38
7.1. COPII	38
7.2. COPI	38
7.3. El retrómero	39
7.4. El exómero	40
7.5. ESCRT	40
7.6. Endocitosis independiente de clatrina	40

OBJETIVO	43
1. OBJETIVO	45
RESULTADOS	47
1. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Clc1p	49
2. LA DELECIÓN DEL GEN <i>clc1</i> ⁺ ES LETAL PARA LAS CÉLULAS DE <i>S. pombe</i>	51
2.1. La estabilización osmótica del medio rescata la letalidad del mutante <i>clc1Δ</i>	52
3. LAS CÉLULAS DEL MUTANTE <i>clc1Δ</i> PRESENTAN MORFOLOGÍA ABERRANTE	53
3.1. Análisis del citoesqueleto de actina en el mutante <i>clc1Δ</i>	54
3.2. Análisis de la pared celular en el mutante <i>clc1Δ</i>	55
3.2.1. Distribución de la pared celular en el mutante <i>clc1Δ</i>	55
3.2.2. Composición de la pared celular en las células <i>clc1Δ</i>	56
3.2.3. Actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa en el mutante <i>clc1Δ</i>	57
4. ANÁLISIS DEL TRÁFICO VESICULAR EN LAS CÉLULAS MUTANTES <i>clc1Δ</i>	57
4.1. La ausencia de <i>clc1</i> ⁺ provoca defectos en el proceso de endocitosis	58
4.2. El mutante <i>clc1Δ</i> no presenta defectos aparentes en la secreción de fosfatasa ácida	60
5. EL MUTANTE NULO DE LA CADENA LIGERA DE LA CLATRINA POSEE DIFERENTES DEFECTOS EN LAS VACUOLAS	61
6. EL MUTANTE DE DELECIÓN <i>clc1Δ</i> PRESENTA IMPORTANTES DEFECTOS EN LOS PROCESOS DE CONJUGACIÓN Y ESPORULACIÓN	62
7. CONSTRUCCIÓN Y ESTUDIO DE UN MUTANTE CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p	63
7.1. El descenso en la cantidad de Clc1p afecta a la viabilidad celular	64
7.2. Clc1p es necesaria para la estabilidad de Chc1p	64
7.3. La sobreexpresión de <i>chc1</i> ⁺ complementa parcialmente los defectos de crecimiento del mutante 41XHA <i>clc1</i>	65
7.4. La estabilización osmótica del medio no corrige los defectos en la cantidad ni afecta a la distribución de la clatrina en el mutante 41XHA <i>clc1</i>	66

8. MORFOLOGÍA CELULAR DEL MUTANTE CON NIVELES REDUCIDOS DE CLATRINA	68
9. ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR EN LAS CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p	68
9.1. Composición de la pared celular	68
9.2. Valoración de la actividad β -glucán sintasa <i>in vitro</i>	70
9.3. Distribución de las enzimas β -glucán sintasa	70
9.4. El transporte de las enzimas $\beta(1,3)$ glucán sintasa hacia la membrana está alterado en el mutante 41XHAclc1	72
9.5. La secreción de la endo- $\beta(1,3)$ glucanasa Eng1p está alterada en el mutante que posee una cantidad reducida de clatrina	72
10. ANÁLISIS DE LOS CITOESQUELETOS DE ACTINA Y TUBULINA EN CÉLULAS CON UNA CANTIDAD REDUCIDA DE Clc1p	74
10.1. Cuantificación y distribución de los parches de actina	74
10.2. La estirpe 41XHAclc1 posee cables de actina aberrantes	76
10.3. La formina For3p se ve afectada por la disminución de la cantidad de Clc1p	76
10.4. El anillo de actomiosina se ve afectado por la disminución de la cantidad de clatrina	77
10.5. Los microtúbulos no presentan defectos morfológicos apreciables como consecuencia de una disminución leve de clatrina	79
11. ANÁLISIS DEL PROCESO DE SECRECIÓN EN LAS CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p	80
11.1. El complejo adaptador AP-1 no pierde la afinidad por Chc1p cuando hay un descenso en la cantidad de Clc1p	80
11.2. Análisis del exocisto en la cepa 41XHAclc1	80
11.3. Análisis de la distribución de los complejos SNARE	81
11.4. Análisis de la secreción de fosfatasa ácida en la estirpe con niveles reducidos de clatrina	83
11.5. El mutante 41XHAclc1 no muestra defectos aparentes en el tráfico intracelular de la carboxipeptidasa Y	83
12. ANÁLISIS DEL PROCESO DE ENDOCITOSIS EN CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE CLATRINA	84
12.1. Análisis del complejo AP-2	84
12.2. Distribución de End4p	85
12.3. Un descenso del 40% en la cantidad de clatrina no afecta de forma significativa a la internalización de material de membrana plasmática	86

12.4.	Influencia de la estabilización osmótica del medio sobre la internalización del colorante FM4-64	88
13.	LAS PROPIEDADES DE LAS VACUOLAS ESTÁN ALTERADAS EN LAS CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p	90
13.1.	Defectos en la morfología y el número de las vacuolas	90
13.2.	El descenso de Clc1p provoca defectos en la fusión homotípica de las vacuolas y altera sus propiedades	92
14.	CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Apl3p	93
14.1.	Relación de Apl3p con Clc1p	93
14.2.	Apl3p es necesaria para la estabilidad del complejo AP-2	94
15.	ANÁLISIS DEL MUTANTE <i>apl3Δ</i>	95
15.1.	La ausencia de Apl3p podría afectar a la distribución de las vesículas de clatrina	96
15.2.	El proceso general de endocitosis no parece afectarse por la ausencia de Apl3p	97
15.3.	El complejo AP-2 es necesario para que el proceso de endocitosis sea plenamente eficiente	98
15.4.	La falta de Apl3p no afecta a la secreción general en <i>S. pombe</i>	100
15.5.	La morfología y las propiedades de las vacuolas no se ven afectadas por la ausencia del <i>apl3⁺</i>	100
15.6.	Apl3p y su relación con la pared celular	100
15.6.1.	<i>La distribución de la pared celular no presenta defectos aparentes en el mutante <i>apl3Δ</i></i>	100
15.6.2.	<i>La ausencia de Apl3p provoca una disminución de la actividad β-glucán sintasa in vitro</i>	101
15.6.3.	<i>Sensibilidad del mutante <i>apl3Δ</i> a antifúngicos que inhiben la síntesis de β-glucano</i>	102
15.6.4.	<i>Sensibilidad del mutante <i>apl3Δ</i> a la digestión por glucanasas</i>	102
15.6.5.	<i>Distribución de las enzimas β-glucán sintasa</i>	104
15.6.6.	<i>Localización de Rho1p en el mutante <i>apl3Δ</i></i>	105
15.6.7.	<i>Apl3p podría estar formando parte de las vesículas que portan las enzimas β-glucán sintasa</i>	105
16.	OTROS FENOTIPOS DEL MUTANTE <i>apl3Δ</i>	107
16.1.	Defectos en la membrana plasmática	107
16.2.	Crecimiento en placas suplementadas con diferentes compuestos inductores de estrés	108
16.3.	Disminución de la viabilidad durante la fase estacionaria de crecimiento	109

DISCUSIÓN	111
1. DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	133
1. CONCLUSIONES	135
MATERIALES Y MÉTODOS	137
1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS	139
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	139
2.1. Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	139
2.2. Crecimiento de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	139
2.2.1. Crecimiento vegetativo	139
2.2.2. Conjugación y esporulación	140
2.2.3. Condiciones especiales de crecimiento	141
3. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	143
3.1. Vectores utilizados	143
3.1.1. Vectores de <i>E. coli</i>	143
3.1.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	144
3.2. Construcción de plásmidos	145
3.2.1. Clonación del gen <i>clc1⁺</i>	145
3.2.2. Construcción del casete de delección <i>clc1::KAN</i>	145
3.2.3. Construcción del alelo 41XHA- <i>clc1::KAN</i>	146
3.2.4. Clonación del gen <i>apl3⁺</i>	146
3.2.5. Construcción del casete de delección <i>apl3::KAN</i>	147
3.2.6. Marcaje de los genes <i>clc1⁺</i> , <i>apl3⁺</i> y <i>chc1⁺</i>	147
4. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS	148
4.1. Obtención de extractos proteicos	148
4.2. Separación electroforética, transferencia e inmunodetección de proteínas	149
4.3. Detección de la proteína Eng1-GFP en extractos celulares y en el medio de cultivo	150
4.4. Co-inmunoprecipitación	151
4.5. Ensayo de inmunoblot de colonias (Dot-blot)	151

5. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	152
5.1. Valoración de la actividad fosfatasa ácida	152
5.1.1. <i>Valoración de la secreción de fosfatasa ácida al medio de cultivo</i>	152
5.1.2. <i>Valoración de fosfatasa ácida en extractos celulares</i>	152
5.2. Valoración de la actividad β -glucán sintasa	153
6. ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR	155
6.1. Sensibilidad a la digestión por glucanasas	155
6.2. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular	155
7. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIONES	157
7.1. Microscopía de campo claro y contraste de fases	157
7.2. Microscopía de fluorescencia	158
7.2.1. <i>Fluorescencia directa con proteínas de fusión</i>	158
7.2.2. <i>Tinción con Calcofluor</i>	159
7.2.3. <i>Tinción con Hoechst 33258</i>	160
7.2.4. <i>Tinción con Rodamina-faloidina y Alexa-fluor 488</i>	160
7.2.5. <i>Tinción con Filipin</i>	161
7.2.6. <i>Tinción con FM4-64</i>	161
7.2.7. <i>Tinción con Lucifer Yellow</i>	162
7.2.8. <i>Tinción con CDCFDA</i>	162
7.2.9. <i>Microscopía confocal: Recuperación de fluorescencia después de "photobleaching" (FRAP)</i>	163
7.3. Microscopía electrónica	163
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	163
APÉNDICE	165
1. SECCIÓN 1	167
2. SECCIÓN 2	170
3. SECCIÓN 3	172
BIBLIOGRAFÍA	175
1. BIBLIOGRAFÍA	177



INTRODUCCIÓN



1. LAS LEVADURAS COMO MODELO DE ESTUDIO

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* son dos de las especies empleadas comúnmente como modelos de investigación en biología molecular. Éstas, aunque son organismos unicelulares y poseen rasgos comunes, son muy distintas entre sí ya que divergieron de un ancestro común hace 330-420 millones de años (Sipiczki, 2000; Heckman *et al*, 2001; Hedges, 2002).

El empleo de *S. cerevisiae* como sistema de estudio en el laboratorio se inicia en la década de 1930, cuando comienza a llevarse a cabo el estudio de su ciclo y diferenciación celular, siendo así mismo, el primer organismo eucariota en tener secuenciado su genoma completo (Goffeau *et al*, 1996). En cuanto a *S. pombe*, ya en la década de los 40 comenzaron a realizarse diversos estudios genéticos, pero no fue hasta finales de los años 50 del siglo pasado cuando empezó a utilizarse como modelo biológico para estudios de división celular, crecimiento y morfogénesis (Mitchison 1957; Schlake & Gutz 1993; Mitchison 1990). La secuenciación completa de su genoma fue publicada en el año 2002 (Wood *et al*, 2002).

Ambos microorganismos, siendo eucariotas unicelulares y estando separados evolutivamente, comparten procesos celulares fundamentales con los metazoos. Esto los convierte en excelentes organismos modelo para la investigación científica, proporcionando enfoques e ideas complementarias sobre las funciones biológicas en eucariotas superiores. Ambas levaduras son sistemas genéticos manejables y fáciles de manipular en el laboratorio debido a que se trata de organismos de pequeño tamaño, con rápido crecimiento en medios de cultivos simples y no son patógenos (Fosburg, 2001)

Algunas de las características más relevantes que convierten a estas levaduras en formidables modelos de estudio son su ciclo celular, su morfogénesis y su organización interna. La contribución de estos organismos al conocimiento de éstos y otros procesos celulares ha sido y es de gran relevancia para la ampliación del conocimiento en general y para la comprensión de los mecanismos moleculares de enfermedades humanas tales como el cáncer, los procesos neurodegenerativos y las enfermedades metabólicas (Cho & Hofmann, 2004; Foury & Kucej, 2002; Steinmetz *et al*, 2002; Hartwell, 2001; Phillips *et al*, 2006; Leto & Saltiel, 2012).

2. LA LEVADURA DE FISIÓN *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura de fisión *S. pombe* fue aislada en 1893 por P. Lindner de una variedad de cerveza africana. En 1921, A. Osterwalder aisló de un zumo de uva procedente del sur de Francia una cepa homotática que se denominó h^{90} . En esta cepa, aproximadamente el 90% de las células eran capaces de conjugarse y formar esporas en un medio pobre en nutrientes. En la década de 1940, U. Leupold caracterizó genéticamente esta cepa que es conocida actualmente como 972. De esta estirpe homotática se aislaron las cepas heterotáticas de tipo sexual opuesto, h^+ 975 y h^- 972, de las cuales proceden la mayoría de las cepas empleadas en los laboratorios actualmente.

S. pombe es un hongo ascomiceto que en condiciones naturales es haploide. Posee 12,6 Mb de ADN que codifican 5123 genes que se distribuyen en 3 cromosomas diferentes. Como ya se ha comentado, la secuencia completa del genoma de esta levadura fue publicada en el año 2002 (Wood *et al*, 2002). Se puede acceder a ella a través de la dirección web: <http://www.pombase.org>

2.1. Ciclo de vida de *S. pombe*

La levadura de fisión presenta un ciclo de vida sencillo en el que las fases haploide y diploide se alternan en función de una serie de factores ambientales y de la interacción entre células de tipo sexual opuesto (**Figura 1**).

Durante la fase haploide las células sufren sucesivas rondas de división mitótica en las que se pueden diferenciar las fases G1 (preparación de la maquinaria necesaria para la duplicación del ADN), S (duplicación de la información genética), G2 (preparación para el inicio de la mitosis) y M (reparto del ADN de forma equivalente entre las dos células hijas). Esta levadura no presenta un ciclo celular eucariótico típico, ya que no posee una fase G1 muy obvia debido a su corta duración, apenas un 10% del total del ciclo, mientras que la fase G2 se extiende durante el 70% del mismo.

En *S. pombe* las células haploides pueden ser de dos tipos sexuales complementarios: h^+ y h^- . La fase diploide sólo aparece cuando dos células de tipo sexual opuesto sometidas a condiciones limitantes de nitrógeno entran en contacto, conjugan y forman un cigoto. Este cigoto diploide es inestable y sufre la división meiótica de su núcleo rápidamente, de modo que esporula generando un asca zigótica que contiene en su interior cuatro ascosporas haploides. Cuando las condiciones ambientales son favorables, las ascosporas se liberan por dehiscencia del asca y germinan entrando de nuevo en la fase haploide del ciclo. Si los cigotos son inoculados en un medio rico antes de que ocurra la meiosis, pueden iniciar un ciclo mitótico diploide. Cuando el medio se empobrece, los diploides heterocigóticos h^+/h^- esporulan originando un asca zigótica que también contiene en su interior cuatro ascas haploides.

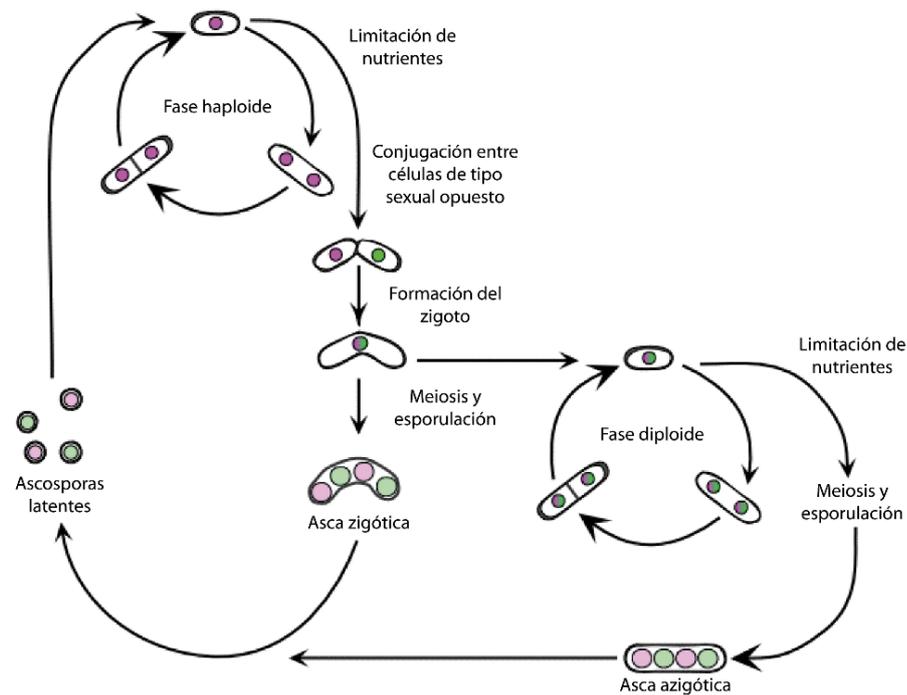


Figura 1. Ciclo biológico de *Schizosaccharomyces pombe*. Representación de las distintas fases del ciclo de vida de la levadura de fisión. Los colores rosa y verde indican dos tipos sexuales diferentes (h^+ y h^-). Consultar el texto para más detalles.

Además de las estirpes heterotálicas h^+ y h^- existe una estirpe homotálica h^{90} , denominada así porque el 90% de las células son capaces de formar esporas. Estas células pueden cambiar su tipo sexual entre h^+ y h^- cada dos generaciones. Esto significa que una única célula es capaz de originar una colonia de células h^+ y h^- que pueden conjugarse entre sí cuando las condiciones nutricionales vuelven a ser limitantes.

2.2. Ciclo morfogénico de *S. pombe*

S. pombe es un organismo unicelular con forma cilíndrica la cual se mantiene a lo largo de su ciclo celular. Sus células crecen de manera polarizada y asimétrica por extensión de sus polos y no de su zona media, manteniendo un grosor constante de 3-4 μm a lo largo del ciclo. Al alcanzar una longitud de entre 12-15 μm se lleva a cabo la citocinesis y formación del septo de división, que posteriormente será degradado permitiendo la separación celular para generar dos células hijas de igual tamaño (aproximadamente 7-8 μm).

Este patrón de crecimiento polarizado no es simétrico ya que, aunque ambos polos poseen una tasa de crecimiento similar, sólo el polo procedente del ciclo anterior, el denominado "polo viejo", está activo durante la fase G1/S y toda la fase G2. El crecimiento del "polo nuevo" que ha sido creado *de novo* tras la separación celular depende del tamaño de la célula, y sólo se produce a partir de un determinado momento de la fase G2, denominado NETO (New End Take Off) (Mitchison & Nurse, 1985) **Figura 2**. Desde ese momento las células

crecen de forma bipolar, aunque el crecimiento sigue siendo más rápido por el “polo viejo”. Dicho crecimiento continúa hasta que se alcanza un tamaño crítico, momento en el cual éste cesa y se inicia la fase M (mitosis) del ciclo celular. Este proceso conlleva el ensamblaje y contracción de un anillo de actomiosina en el ecuador de la célula y culmina con la síntesis de un septo de material de pared celular entre ambas células hijas que finalmente será degradado, produciéndose así la separación celular definitiva (Hayles & Nurse, 2001; Martin & Chang, 2005) (Figura 2). El citoesqueleto de actina (representado por el color rojo en la Figura 2) y los microtúbulos (MT, de color verde en la Figura 2) son esenciales para que las distintas etapas del ciclo de vida de *S. pombe* sean exitosas, así como para garantizar el mantenimiento de la forma celular. La pared celular también juega un papel esencial en el establecimiento de la morfología de la célula como se podrá ver más adelante.

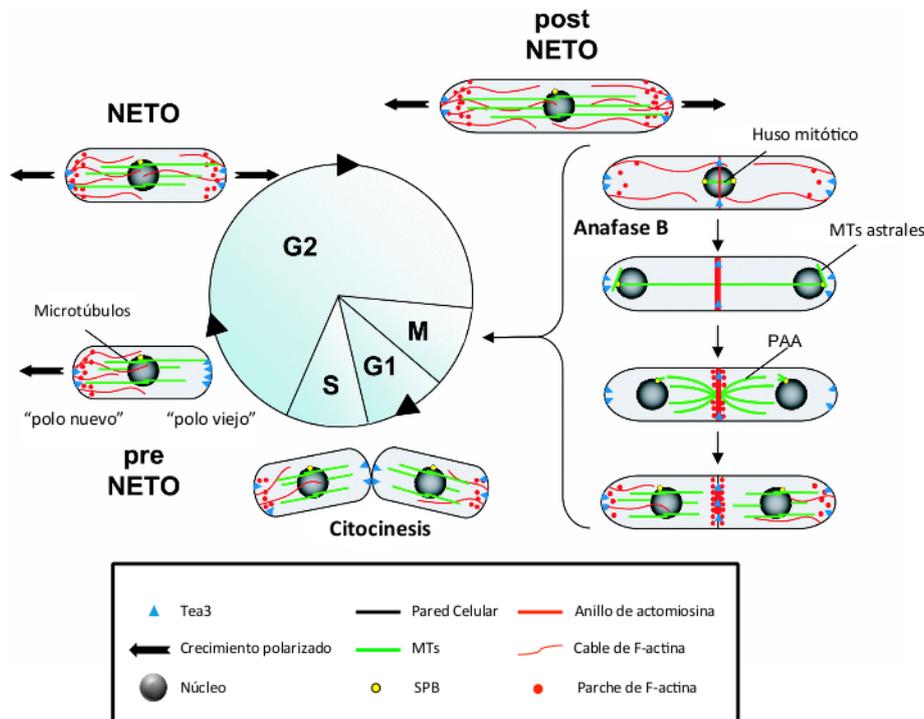


Figura 2. Ciclo morfofisiológico de la levadura de fisión. Representación del ciclo celular de *S. pombe* donde se muestran las diferentes etapas de crecimiento y la reorganización de elementos morfofisiológicos como el citoesqueleto de actina (en rojo) y los microtúbulos (en verde). MT=Microtúbulos; SPB=Spindle Pole Body (Cuerpo polar del huso); PAA=Post Anaphase Array (Estructura de post-anafase). Figura modificada de La Carbona *et al*, 2006.

También se ha descrito que en medios naturales donde los nutrientes escasean, *S. pombe* puede presentar un crecimiento invasivo acompañado por la producción de pseudohifas. Este fenómeno se interpreta como una adaptación de la levadura a las condiciones desfavorables del medio, ya que la generación de estas estructuras podría favorecer la búsqueda de nutrientes en el ambiente. Estudios realizados al respecto han permitido reproducir en el laboratorio estas estructuras multicelulares ramificadas. Esto ha sido posible combinando un medio con limitación de nitrógeno, una fuente de carbono accesible y una temperatura de 30°C, con estirpes que tuviesen la ruta del AMP cíclico funcional (Amoah-Buahin *et al*, 2005).

3. EL CITOESQUELETO DE *S. pombe*

3.1. Citoesqueleto de actina

En la levadura de fisión la actina es un componente esencial tanto para la morfogénesis como para el crecimiento polarizado, siendo un elemento muy dinámico que cambia su distribución a lo largo del ciclo celular. La actina está codificada por el gen *act1⁺* y se puede encontrar en dos estados de agregación diferentes: G-actina y F-actina. La primera es una actina globular que se encuentra de forma minoritaria en la célula y la segunda, denominada también actina filamentosa o polimerizada, es la isoforma más abundante y la responsable de la formación de las diferentes estructuras que se pueden encontrar en la célula. El citoesqueleto de actina de *S. pombe* es relativamente simple y cuenta con tres estructuras diferentes: los parches de actina, los cables de actina y el anillo contráctil [Figura 3 (Marks & Hyams, 1985)]. Además de la actina existen numerosas proteínas que se asocian a estas estructuras para regular su estabilidad (La Carbona *et al*, 2006).

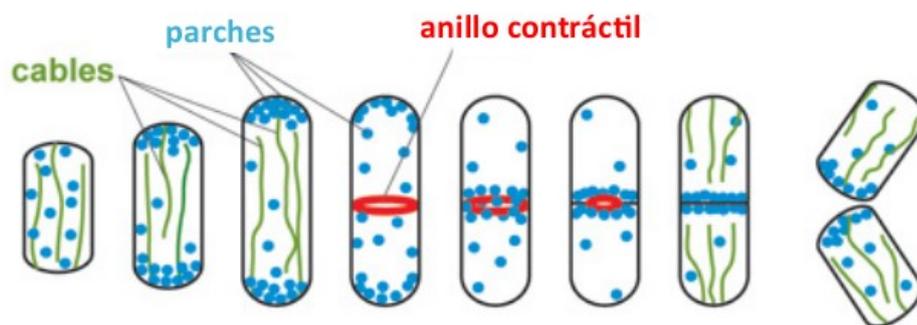


Figura 3. Distribución del citoesqueleto de actina en *S. pombe*. Detalle de la organización de las diferentes estructuras que componen el citoesqueleto de actina durante el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Figura adaptada de Kovar *et al*, 2012.

Parches de actina

Los parches de actina son estructuras formadas por la agrupación de hasta 150 filamentos cortos y ramificados de F-actina que alcanzan una longitud de 100-200 nm (Sirotkin *et al*, 2010). Los parches son sitios de endocitosis y se localizan en las zonas de crecimiento activo: los polos celulares durante la interfase y en la zona ecuatorial en mitosis (Gachet & Hyams, 2005; Arellano, 1997; Balasubramanian *et al*, 1994). Esta localización sugiere que la endocitosis que se produce a través de los parches de actina está asociada a la síntesis y remodelación de la pared celular (Kovar *et al*, 2012). Además, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en levaduras la actina es absolutamente necesaria para la invaginación de la membrana durante la endocitosis ya que ayuda a superar las fuerzas de resistencia de la misma y la presión de turgencia citosólica (Aghamohammadzadeh & Ayscough, 2009; Anitei & Hoflack, 2012).

El ensamblaje de los parches comienza con el reclutamiento de diversas proteínas que intervienen en el proceso de endocitosis y que se denominan proteínas de la cubierta por su presencia en las envueltas de las vesículas endocíticas. Posteriormente, se acumulan otras proteínas adaptadoras necesarias para el ensamblaje de la actina, la internalización del parche y la unión al complejo Arp2/3 (Castagnetti *et al*, 2005). La polimerización de la F-actina en los parches está regulada por el complejo Arp2/3 (Actin-related-protein) que sólo aparece durante la fase de endocitosis (Kaksonen *et al*, 2003; Jonsdottir & Li, 2004), y cuya actividad está a su vez controlada por los factores promotores de nucleación (NPFs) (Boettner *et al*, 2012).

Además del complejo Arp2/3 existe otro conjunto de proteínas que regulan y modulan la dinámica tanto de los parches como de otras estructuras de actina. La fimbrina Fim1p une los filamentos de actina fortaleciendo la estructura del parche (Skau & Kovar, 2010); la profilina Cdc3p, unida a un monómero de actina, se considera el principal sustrato disponible en la célula para el ensamblaje de actina e interviene en la nucleación y polimerización de filamentos (Kovar *et al*, 2003, 2006). Las cofilinas Adf1p y Gmf1p son necesarias para la despolimerización de los filamentos y el reciclaje de los monómeros de actina tras finalizar el proceso de endocitosis e invaginación del parche (Kovar *et al*, 2012). La coronina Crn1p está relacionada con el reciclaje de la actina en los parches; por un lado actúa como inhibidor del complejo Arp2/3 (Rodal *et al*, 2005) y, por otro, colabora con las cofilinas controlando el tamaño de los filamentos de actina (Gandhi *et al*, 2009).

Anillo de actomiosina

La división celular en levaduras requiere la formación de un anillo contráctil de actomiosina. Este anillo es una estructura compleja y dinámica compuesta por actina, las cadenas pesadas de las miosinas Myo2p y Myo3p y las cadenas ligeras Cdc4p y Rlc1p, además de otras muchas proteínas asociadas necesarias para su estabilidad y funcionalidad (Wu, 2003; Balasubramanian *et al*, 2004; Wolfe & Gould, 2005; La Carbona *et al*, 2006; Huang *et al*, 2008; Hachet & Simanis, 2008; Hachet *et al*, 2012). Su establecimiento tiene lugar durante las primeras etapas de la mitosis, seguido de un proceso de contracción desde la superficie celular hacia el centro de la célula (Marks *et al*, 1986). Mediante diversos estudios realizados se han identificado aproximadamente 50 proteínas diferentes implicadas en la formación y contracción del anillo (Guertin *et al*, 2002; Wu *et al*, 2003; Wu & Pollard, 2005). Estos análisis han llevado a postular dos mecanismos independientes pero complementarios de ensamblaje:

El primer modelo está basado en la intervención de diferentes componentes para formar el anillo, donde la formina Cdc12p y la miosina de la clase II, Myo2p, junto con otras proteínas, se organizan en nodos en la región central de la célula. Estos nodos se ensamblarían unos con otros formando un anillo contráctil funcional mediante la acción coordinada de Cdc12p y Myo2p (Bezanilla *et al*, 2000; Bähler *et al*, 1998; Huang *et al*, 2008; Paoletti & Chang, 2000; Vavylonis *et al*, 2008; Wu *et al*, 2003, 2006).

El segundo mecanismo propuesto sugiere que la formina Cdc12p se acumula en uno o varios puntos de la región central de la célula permitiendo el ensamblaje de otros componentes que formarían una estructura desde la cual partiría un cable de filamentos de actina. Éste iría alargándose hasta formar un "anillo basal", a partir del cual se formaría el anillo contráctil (Chang, 1997; Chang, 2000; Yonetani *et al*, 2008; Motegi *et al*, 2004; Arai & Mabuchi, 2002; Carnahan & Gould, 2003; Kamasaki *et al*, 2007).

Cables de actina

Los cables son haces de filamentos cortos y paralelos de F-actina que se distribuyen longitudinalmente a lo largo de la célula durante el crecimiento vegetativo y que son ensamblados por la formina For3p. Esta proteína es un factor de nucleación y elongación que se orienta hacia la zona más próxima al córtex celular donde se activa y se produce la polimerización de la actina, favoreciendo el transporte hacia los polos de factores implicados en el crecimiento polarizado hacia (Kamasaki *et al*, 2005; Martin *et al*, 2007; Nakano *et al*, 2002). A diferencia de los parches y del anillo contráctil, la cantidad de proteínas de unión a filamentos de actina que se relacionan con los cables es muy pequeña. Entre estos componentes se incluyen la tropomiosina Cdc8p como motor proteico y la coronina Crn1p (Pelham Jr. *et al*, 2001; La Carbona *et al*, 2006; Motegi *et al*, 2001; Win *et al*, 2001; Mulvihill *et al*, 2006; Fischer *et al*, 2008).

La regulación espacio-temporal de For3p es crítica para la correcta organización y función de los cables de actina durante el crecimiento polarizado (Martin, 2007; Feierbach & Chang, 2001). Estos cables, aunque no son esenciales para la viabilidad celular, contribuyen en gran medida al crecimiento polarizado de la célula al actuar como pistas para el transporte de las vesículas y orgánulos que son dirigidos por las miosinas de tipo V hacia los polos en expansión (Motegi et al, 2001). También son necesarios para el movimiento de los parches de actina hacia el interior celular e intervienen en la transición de crecimiento mono a bipolar (Pelham Jr. et al, 2001; Gachet & Hyams, 2005).

3.2. Citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros de forma cilíndrica, presentes en todas las células eucariotas, que están formados por la asociación no covalente de monómeros de α y β tubulina. Son estructuras polares con dos extremos bien definidos. El polo + es dinámico y está relacionado con el transporte de factores de polaridad, mientras que el polo - es estático y normalmente está asociado a la membrana nuclear (Figura 4) (Piel & Tran, 2009; Sawin & Tran, 2006). Durante el crecimiento vegetativo en *S. pombe* los microtúbulos se organizan de diversas formas y desde distintos lugares de la célula denominados centros organizadores de microtúbulos o MTOCs (Drummond & Cross, 2000). En interfase la célula contiene entre 3 y 5 haces de microtúbulos que se expanden a lo largo del eje longitudinal de la misma y que desempeñan funciones relacionadas con el posicionamiento del núcleo, el crecimiento y la morfología celular (Daga & Chang, 2005; Daga & Nurse, 2008).

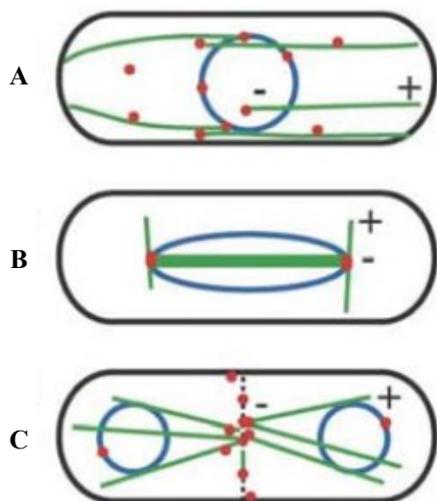


Figura 4. Organización de los microtúbulos en *S. pombe*. A. Ilustración esquemática de la distribución de los microtúbulos (MT, en verde) en relación con los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, en rojo) y la envuelta nuclear (azul). Los extremos (-) generalmente están dirigidos hacia el centro de la célula y los extremos (+) hacia los polos. B. Durante la mitosis se forman el cuerpo polar del huso (SPB) y los microtúbulos astrales. C. Durante la división celular los centros organizadores de microtúbulos situados en la zona de división van a nuclear los microtúbulos denominados PAA (Post Anaphase Array) que favorecen la separación celular.

En mitosis los microtúbulos citoplasmáticos se desensamblan, formándose los microtúbulos intranucleares -cuya localización coincide con el huso mitótico- y los microtúbulos astrales, relacionados con el alineamiento del huso con respecto al eje celular pero no con su elongación (Sawin, 2004; Tolić-Nørrelykke et al, 2004; Venkatram et al, 2004). Los microtúbulos intranucleares y astrales parten desde el denominado "Spindle Pole

Body" (SPB) o cuerpo polar del huso. En las últimas etapas de la mitosis estos microtúbulos desaparecen para así formarse una nueva estructura en la región del septo de división denominada "Post-Anaphase Array" o PAA. El PAA participa en la citocinesis estabilizando el anillo de actomiosina y manteniendo alejados a los núcleos de las células hijas de la zona de división (Pardo & Nurse, 2003; Hagan & Hyams, 1988). Al concluir la mitosis esta estructura se desorganiza y se forman de nuevo los microtubúlos citoplasmáticos.

El citoesqueleto de microtúbulos participa tanto en el control de la posición del núcleo como en la regulación de la morfología celular a través de la localización de los factores de polaridad (Piel & Tran, 2009). Para la localización del núcleo durante interfase la célula utiliza las fuerzas generadas por los microtúbulos al chocar contra los polos celulares. Los microtúbulos se organizan en forma de haces antiparalelos a ambos lados del núcleo, favoreciendo que las fuerzas aplicadas desde ambos lados de la célula sean similares, para así mantener el núcleo en el centro de ésta. En cuanto a la morfología celular, el citoesqueleto de actina es el responsable de dirigir el crecimiento celular, mientras que los microtúbulos son necesarios para determinar los puntos en los que se tiene que producir este crecimiento (Fischer *et al*, 2008; La Carbona *et al*, 2006; Martin *et al*, 2005; Sawin & Tran, 2006). Una vez iniciado el crecimiento, el citoesqueleto de actina es capaz de mantenerlo de forma independiente a los microtúbulos. De este modo se podría decir que los microtúbulos forman parte de un sistema de retroalimentación global que controla la morfología celular, mientras que el citoesqueleto de actina forma parte de un sistema de retroalimentación local que controla el crecimiento celular en los polos (Encinar del Dedo, 2010).

4. LA PARED CELULAR DE *S. pombe*

4.1. Funciones biológicas de la pared celular

La pared celular es una estructura externa a la membrana plasmática que está presente en gran variedad de grupos taxonómicos como plantas, algas, hongos y bacterias.

La pared celular fúngica es un orgánulo implicado en numerosos e importantes procesos celulares tales como el crecimiento, la morfogénesis, la conjugación, la virulencia o la integridad del propio microorganismo. Podría describirse como un exoesqueleto que permite soportar la presión interna y que proporciona a la célula una barrera protectora contra un amplio rango de condiciones ambientales, como la temperatura y los diferentes cambios osmóticos del medio. Además, dota a la célula de un escudo de protección contra el posible ataque de otros microorganismos o de parásitos. La pared celular es un elemento morfo genético fundamental, ya que es la responsable final de la forma del organismo que la posee. Lejos de ser una estructura rígida y estática, es lo suficientemente plástica y dinámica como para que las células puedan cambiar su forma a lo largo del ciclo celular y también en respuesta a los muchos estímulos externos a los que están sometidas.

Centrándonos en la biología de *S. pombe*, organismo sobre el que se han realizado todos los estudios de este trabajo, está demostrado que el crecimiento de este microorganismo es un proceso complejo relacionado necesariamente con la biosíntesis de la pared celular. Los cambios morfológicos que suceden durante su ciclo de vida, como son el crecimiento monopolar y bipolar, la citocinesis, la formación de los zigotos, y el desarrollo de las ascas, necesitan de una pared celular plástica y en constante cambio (Ishiguro, 1998; Durán & Pérez, 2004). Durante estas transiciones, junto a otros eventos, tiene lugar la síntesis y remodelación de la pared celular, procesos regulados y coordinados por la maquinaria de control del ciclo celular. La pared celular es necesaria para el mantenimiento de la morfología de *S. pombe* y es una estructura esencial para la viabilidad de estas células. Al eliminarla mediante la digestión enzimática de los polímeros que la conforman, los protoplastos obtenidos adquieren una morfología esférica, y pierden rápidamente la viabilidad si no se mantienen en un medio estabilizado osmóticamente (Osumi, 1998). Este orgánulo no sólo tiene interés como elemento morfogénico, sino que al ser una estructura esencial para el hongo es una excelente diana para el diseño de compuestos antifúngicos. Por ejemplo, el antifúngico CANCIDAS™ es un inhibidor de la biosíntesis del β -glucano y se emplea para el tratamiento de la aspergilosis invasiva y de otras infecciones causadas por hongos (Wagner *et al*, 2006).

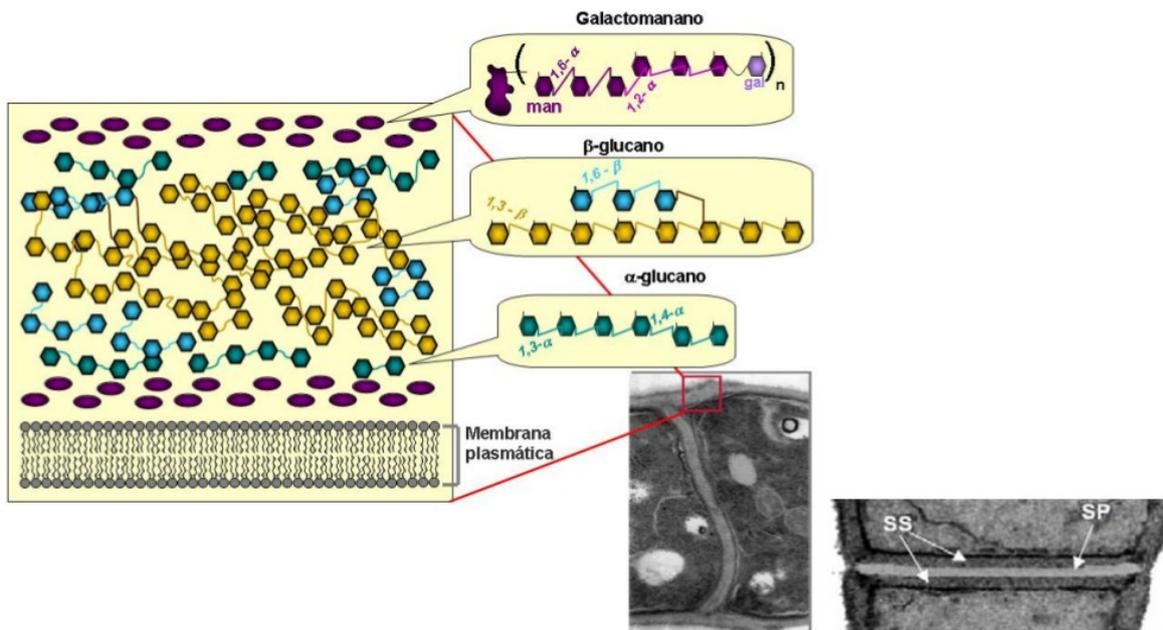


Figura 5. Composición y estructura de la pared celular de *S. pombe*. A. La pared lateral está formada por tres capas diferentes. Las capas externas están compuestas por galactomanano y la capa interna, menos densa a los electrones, está formada por α y β -glucanos. B. El septo presenta una capa interna denominada septo primario (SP) que está compuesta principalmente por β (1,3)glucano lineal. Esta capa está flanqueada por el septo secundario (SS) que tiene una composición similar a la de la pared celular lateral.

4.2. Composición y estructura de la pared celular de *S. pombe*

La pared celular de hongos está compuesta principalmente por glicoproteínas y polisacáridos dispuestos en diferentes capas fibrilares. Éstas establecen relación entre ellas mediante enlaces por puentes de hidrógeno, lo que convierte a la pared celular en una estructura fuerte y resistente.

En el caso de *S. pombe*, los polisacáridos que forman la pared son principalmente dos homopolímeros de glucosa que constituyen aproximadamente el 85% del total de la estructura; el α -glucano constituido por residuos de D-glucosa con enlaces $\alpha(1,3)$ y en menor proporción $\alpha(1,4)$ y el β -glucano formado por cadenas de D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1,3)$ y $\beta(1,6)$. Según el tipo de enlaces que posea, se pueden encontrar tres tipos diferentes de β -glucano en la pared: $\beta(1,3)$ glucano lineal, $\beta(1,3)$ glucano ramificado y $\beta(1,6)$ glucano ramificado. Además de estos componentes, la pared celular contiene alrededor de un 15% de galactomanano que es un polímero no estructural que se une a proteínas para formar glicoproteínas (Horisberger & Rouvet-Vauthey, 1985). A diferencia de lo que ocurre en otros hongos, la pared celular de *S. pombe* no posee cantidades significativas de quitina como elemento estructural durante su crecimiento vegetativo, aunque ésta sí aparece en la pared celular de las ascosporas (Durán & Pérez, 2004).

Mediante microscopía electrónica la pared celular de *S. pombe* se muestra como una estructura trilaminar en la que dos capas densas al paso de los electrones, formadas mayoritariamente por galactomanano, están separadas por una capa más clara constituida principalmente por $\beta(1,3)$ glucano y $\alpha(1,3)$ glucano [Figura 5A (Humbel *et al*, 2001; Durán & Pérez, 2004)]. El septo de división posee también una ultraestructura muy organizada en la que el septo primario, que está compuesto fundamentalmente por $\beta(1,3)$ glucano lineal (Cortés *et al*, 2007), se observa como una capa transparente a los electrones. El septo secundario, que delimita por ambos lados al primario, tiene una apariencia mucho más densa al paso de los electrones y posee una composición similar a la pared celular lateral [Figura 5B (Humbel *et al*, 2001; Sugawara *et al*, 2003)].

4.3. Biosíntesis de los polímeros de la pared celular

α -Glucano

El α -glucano está presente tanto en la pared celular de *S. pombe* como en la de otros hongos dimórficos y filamentosos (Bush *et al*, 1974; Bobbitt *et al*, 1977); sin embargo, está ausente en la pared de *S. cerevisiae*. En el caso de *S. pombe*, este polímero constituye aproximadamente el 30% de la pared y está formado por pequeñas cadenas compuestas por unos 200 monómeros de D-glucosa, unidos mediante enlaces $\alpha(1,3)$ y una pequeña proporción de enlaces $\alpha(1,4)$ (aproximadamente un 7%) (Manners & Meyer, 1977; Konomi *et al*, 2003; Grün *et al*, 2005). El α -glucano es esencial para el mantenimiento de la morfología celular (Alfa *et al*, 1993; Cortes *et al*, 2007), ya que al tratar las células con α -glucanasa éstas pierden su polaridad y se vuelven redondas (Alfa *et al*, 1993), hecho que también ocurre en mutantes con menor contenido en este polímero (Grün *et al*, 2005). Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células marcadas con un anticuerpo anti- $\alpha(1,3)$ glucano conjugado con partículas de oro coloidal, se ha podido observar la distribución difusa de estas partículas por toda la pared celular, detectándose incluso en el interior de la bicapa lipídica que forma la membrana. La enzima responsable de la síntesis de este polímero es la enzima $\alpha(1,3)$ glucán sintasa (α GS) que se localiza en la membrana celular y cataliza la unión de monómeros de glucosa en el interior de la membrana antes de transportarlos fuera de ella (Sugawara *et al*, 2003). El gen *ags1⁺/mok1⁺* codifica una proteína integral de membrana que presenta cierta homología con proteínas implicadas en el metabolismo del glucano y se considera la enzima α -glucán sintasa, o al menos un componente de dicha actividad (Hochstenbach, 1998; Katayama *et al*, 1999; Konomi *et al*, 2003). El α -glucano sintetizado por Mok1p es esencial para la integridad de la pared celular durante el crecimiento vegetativo. Éste interviene en la síntesis del septo secundario y en la correcta formación del septo primario, confiriendo a esta estructura la rigidez necesaria para soportar la presión de turgencia que se genera durante la separación celular (Cortés *et al*, 2012). Existen otros cuatro genes con similitud de secuencia a *mok1⁺*: *mok11⁺*, *mok12⁺*, *mok13⁺* y *mok14⁺*, los cuales no son esenciales para la viabilidad celular, pero participan en la síntesis de la pared celular de las ascosporas y en su maduración (García *et al*, 2006).

β -glucano

El β -glucano en *S. pombe* representa entre el 45% y el 54% del total de los componentes que forman la pared celular y es el responsable de dotar a ésta de la resistencia necesaria para mantener la morfología de la célula (Ishiguro, 1998). Como se ha comentado anteriormente, se pueden distinguir tres tipos de β -glucano en la pared celular según el tipo de enlaces que posean:

- El $\beta(1,3)$ glucano lineal está compuesto por cadenas lineales de monómeros de glucosa sin ramificaciones. Está presente exclusivamente en el septo primario de las células que están dividiéndose y su síntesis juega un papel fundamental en la división celular (Humbel *et al*, 2001; Cortes *et al*, 2007).
- El $\beta(1,3)$ glucano con ramificaciones $\beta(1,6)$ es el polímero más abundante de todos los polisacáridos que constituyen la pared celular y está formado por cadenas de residuos de glucosa unidos por enlaces $\beta(1,3)$ con ramificaciones laterales mediante enlaces tipo $\beta(1,6)$. Las estructuras filamentosas formadas se distribuyen por toda la pared celular y se encuentran tanto en el septo primario como en el secundario. Mediante estudios de regeneración de protoplastos se ha podido observar que este polímero es el primero en ser sintetizado por la célula, formando una red microfibrilar de fibras largas y paralelas sobre las cuales se ensamblan posteriormente el α -glucano y el galactomanano (Osumi, 1998; Humbel *et al*, 2001; Durán & Pérez, 2004).
- El $\beta(1,6)$ glucano ramificado es un polímero formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces $\beta(1,6)$ que está altamente ramificado (más del 43%) en uniones tipo $\beta(1,3)$ (Manners & Meyer, 1977; Konomi, 2003; Sugawara *et al*, 2004). El $\beta(1,6)$ glucano se localiza en la parte externa de la capa de la pared celular menos densa a los electrones, bajo la capa externa de galactomanano de la pared lateral y en el septo secundario (Humbel *et al*, 2001). Esta localización está de acuerdo con la hipótesis de que el $\beta(1,6)$ glucano conecta las manoproteínas a la pared celular. El $\beta(1,6)$ glucano también se ha encontrado asociado al aparato de Golgi en pequeñas vesículas cercanas a la membrana plasmática, indicando que este polímero se sintetiza en el sistema RE-Golgi y se exporta hacia la superficie celular (Humbel *et al*, 2001).

La biosíntesis del $\beta(1,3)$ glucano, que es el principal β -glucano sobre el que se va a discutir en este trabajo, se cataliza por el complejo enzimático $\beta(1,3)$ glucán sintasa (β GS) [UDP-glucosa: (1,3)- β -D-glucano-3- β -D-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.34]. Esta enzima está unida a la membrana plasmática y emplea UDP-glucosa como sustrato para formar cadenas lineales de entre 60 y 700 unidades de glucosa. La actividad β GS posee al menos dos componentes: una unidad catalítica y una reguladora (Cabib *et al*, 1998; Douglas, 2001). En *S. pombe* se han identificado cuatro genes que codifican potenciales subunidades catalíticas del complejo $\beta(1,3)$ glucán sintasa: *bgs1⁺*, *bgs2⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺*. Todos estos genes son esenciales en determinados momentos de su ciclo de vida: *bgs1⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺* son necesarios para la viabilidad celular, mientras que *bgs2⁺* lo es para el proceso de esporulación (Ishiguro *et al*, 1997; Liu *et al*, 2000; Martín *et al*, 2000, 2003; Cortes *et al*, 2005, 2007). Las proteínas Bgs son proteínas transmembrana de elevado peso molecular (\approx 200 kDa) que presentan gran similitud a las β -glucán sintasas descritas para *S. cerevisiae*, Fks1p y Fks2p (Mazur *et al*, 1995).

Las enzimas Bgs1p, 3 y 4 se localizan en los polos de crecimiento (Cortes *et al*, 2005, 2007), en la zona de división celular (Cortes *et al*, 2002; Liu *et al*, 2002; Mulvihill *et al*, 2006), y también se pueden observar en vesículas de transporte dispersas por el citoplasma. La subunidad reguladora de la $\beta(1,3)$ glucán sintasa descrita en *S. pombe* está constituida por la GTPasa Rho1p (Arellano *et al*, 1996).

En *S. pombe*, Bgs1p/Cps1p se ha descrito como una unidad catalítica β GS necesaria para la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano lineal que constituye el septo primario (Humbel *et al*, 2001; Liu *et al*, 2002; Cortes *et al*, 2002). Las células con un bajo nivel de expresión del gen *bgs1+* presentan septos defectuosos que aún poseen cierta cantidad de $\beta(1,3)$ glucano. Esto indicaría que, aunque Bgs1p tiene un papel principal, otras β GS intervendrían en la síntesis del β -glucano del septo (Cortes *et al*, 2007). Los septos aberrantes que se forman no pueden ser degradados correctamente tras la mitosis, lo que provoca que las células permanezcan encadenadas (Cortes *et al*, 2007), hecho que permite constatar que Bgs1p también juega un papel importante en la citocinesis. Como ya se ha indicado previamente, Bgs1p se localiza tanto en los polos como en la zona de división celular. La maquinaria de secreción es esencial para que la localización de Bgs1p/Cps1p en los polos sea correcta (Liu, 2002; Mulvihill *et al*, 2006; Yu *et al*, 2012; Bendezu & Martín, 2011) y el citoesqueleto de actina es necesario para la localización de la enzima en el anillo de división, aunque no para su mantenimiento en esta estructura (Cortes *et al*, 2002; Liu *et al*, 2002). Por otra parte, mutantes con baja actividad *bgs1* presentan defectos en polaridad y en la forma de las células (Cortes *et al*, 2007). Estos y otros resultados muestran que Bgs1p/Cps1p juega un papel importante en el crecimiento, la polaridad y la morfogénesis de la levadura de fisión (Cortes *et al*, 2007; Mulvihill *et al*, 2006).

El caso del gen *bgs2+* es diferente ya que sólo se expresa durante la esporulación, siendo esencial para este proceso. Los mutantes *bgs2 Δ* presentan una actividad β -glucán sintasa disminuida durante la esporulación y las esporas que se forman son inmaduras, incapaces de liberarse del asca, y no pueden germinar. Mediante análisis por microscopía electrónica se ha podido observar que la pared celular de las ascas de este mutante es mucho más delgada que la de una cepa silvestre, además de poseer una capa de β -glucano apenas detectable (Liu *et al*, 2000; Martín *et al*, 2000).

Bgs3p es necesaria para el mantenimiento de la viabilidad celular (Martín *et al*, 2003) y la polaridad durante el crecimiento vegetativo, puesto que la represión del gen *bgs3+* produce células redondeadas y con una pared celular más gruesa que una cepa control. Esto es debido, en parte, a un aumento en la cantidad de α -glucano, probablemente causado para compensar el descenso en la cantidad de β -glucano en la célula (Martín *et al*, 2003). Bgs3p presenta una localización similar a Bgs1p (Martín *et al*, 2003) y su función concreta es aún desconocida. No obstante, su expresión aumenta cuando se producen defectos en la síntesis

de otras glucán sintasas (Bgs1p y Bgs4p); esto sugiere que Bgs3p podría formar parte de un mecanismo compensatorio que funcionaría en respuesta a daño en la pared celular (Cortes, 2006).

Bgs4p es esencial para el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento polarizado y la citocinesis, y también es necesaria para la germinación de las esporas. Se localiza en el septo de división y en los polos al igual que Bgs1p y Bgs3p. Sin embargo parece que la función de Bgs4p en el septo es más crítica que en los polos celulares (Cortes *et al*, 2005). Se ha propuesto a Bgs4p como la principal β GS encargada de la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano de la pared y del septo secundario, además de formar parte del mecanismo de reparación contra un posible exceso de degradación de pared durante la división celular. También se piensa que es la enzima responsable de la mayor parte de la actividad β -glucán sintasa detectada *in vitro* (Cortes *et al*, 2005).

Galactomanano y manoproteínas

El galactomanano y las manoproteínas de la pared de *S. pombe* constituyen del 9% al 15% del total de la pared celular. El galactomanano está formado por un esqueleto de residuos de manosa unidos por enlaces $\alpha(1,6)$ que posee ramificaciones laterales unidas mediante enlaces $\alpha(1,2)$, los cuales terminan en extremos no reductores gracias a unidades de galactosa unidas a las manosas por enlaces α (Bush *et al*, 1974; Horisberger *et al*, 1978; Magnelli *et al*, 2005). Este polímero se une covalentemente a proteínas mediante enlaces N- y O- glucosídicos en el retículo endoplasmático (RE) y en el aparato de Golgi. Las proteínas generadas se secretan al espacio periplásmico uniéndose a la membrana plasmática mediante grupos GPI y a la capa más externa de la pared mediante enlaces con la matriz de glucanos (Andreishcheva *et al*, 2004). El galactomano está presente en el septo, pero únicamente en la zona más próxima al plasmalema. Una pequeña cantidad de galactomanano está presente en el citoplasma de *S. pombe*, pareciendo indicar que éste se sintetiza en o cerca del plasmalema (Horisberger *et al*, 1978; Andreishcheva *et al*, 2004).

Se han descrito varios genes implicados en el proceso de biosíntesis de estos polímeros. Los genes *gma12⁺* (Chappell & Warren, 1989; Chappell *et al*, 1994) y *gmh3⁺* (Yoko-o *et al*, 1998) codifican dos enzimas galactosiltransferasas, mientras que el gen *och1⁺* codifica una enzima manosiltransferasa (Yoko-o *et al*, 2001); los genes *oma1⁺*, *oma2⁺* y *oma4⁺* son O-manosiltransferasas necesarias para el mantenimiento de la integridad celular (Tanaka *et al*, 2005; Willer *et al*, 2005).

4.4. Remodelación y degradación de la pared celular de *S. pombe*

La pared celular de *S. pombe* sufre muchos cambios a lo largo de su ciclo de vida, lo que la convierte en un elemento muy dinámico, necesitado de procesos de remodelación y degradación continuos. Por este motivo, además de enzimas encargadas de la síntesis de los diversos polímeros que constituyen esta estructura, existen otras proteínas con actividad enzimática que se encargan del mantenimiento y de la degradación continua de la pared. Este es el caso de las proteínas Gas, enzimas con actividad glucosil-transferasa que intervienen en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento vegetativo, en la maduración de la pared de la ascospora y en su viabilidad (de Medina-Redondo *et al*, 2008, 2010).

Por otra parte, y encargándose de la degradación del glucano en determinados estadios del ciclo de vida de esta levadura, existen enzimas con actividad glucanásica, como es el caso de las endo- α -glucanasas Agn1p y Agn2p y las endo- β (1,3)-glucanasas Eng1p y Eng2p. Tras la citocinesis, el septo de división que separa a las dos células hijas ha de disolverse para que éstas puedan ser independientes. Para ello es necesario que se erosione la pared celular adyacente al septo y que el septo primario sea degradado. Estos procesos son llevados a cabo por la β -endoglucanasa Eng1p, necesaria para la disolución del septo primario, degradando el β (1,3)glucano existente (Martin-Cuadrado *et al*, 2003, 2005; Martín-Cuadrado *et al*, 2008) y por la α -glucanasa Agn1p, encargada de la digestión del α -glucano de la pared lateral (Alonso-Nunez *et al*, 2005; Dekker *et al*, 2004; Garcia *et al*, 2005). Así mismo, se ha descrito que Eng2p y Agn2p están implicadas en la degradación de la pared del asca, favoreciendo la liberación de las esporas (Dekker *et al*, 2004, 2007; Encinar del Dedo *et al*, 2009).

Las enzimas implicadas en la síntesis y remodelación de la pared celular se localizan en la membrana plasmática o en la pared celular. Sin embargo, en *S. pombe* no se sabe prácticamente nada de cómo se regula la síntesis del glucano por los mecanismos de transporte vesicular. Es más, la regulación de la síntesis del β (1,3)glucano por estos mecanismos no se ha estudiado en ningún hongo. Una parte importante de este trabajo ha sido el análisis del papel que juega el transporte vesicular mediado por clatrina como proceso regulador de la síntesis de la pared celular en general y de la biosíntesis del β -glucano en particular. A continuación, se describen de un modo general los mecanismos que constituyen el tráfico vesicular en las células eucariotas.

5. MECANISMOS DE TRÁFICO VESICULAR

Una de las características esenciales de las células eucarióticas es que poseen diversos subcompartimentos intracelulares rodeados de membrana. Estos orgánulos constituyen compartimentos bien diferenciados en los que tienen lugar procesos muy específicos, lo que hace que la célula posea una distribución interna compleja.

El transporte vesicular permite la comunicación entre los diferentes compartimentos membranosos de la célula y la membrana plasmática. La transferencia de material entre los orgánulos está mediado por diferentes vesículas que están gemando continuamente desde una membrana para fusionarse con otra. Este tránsito permite el transporte de diferentes moléculas denominadas "cargos". Los diferentes cargos pueden ser proteínas transmembranales y solubles, lípidos, material extracelular, etc. El transporte vesicular además favorece la remodelación de la membrana, ya sea plasmática o de los diferentes orgánulos implicados (**Figura 6**).

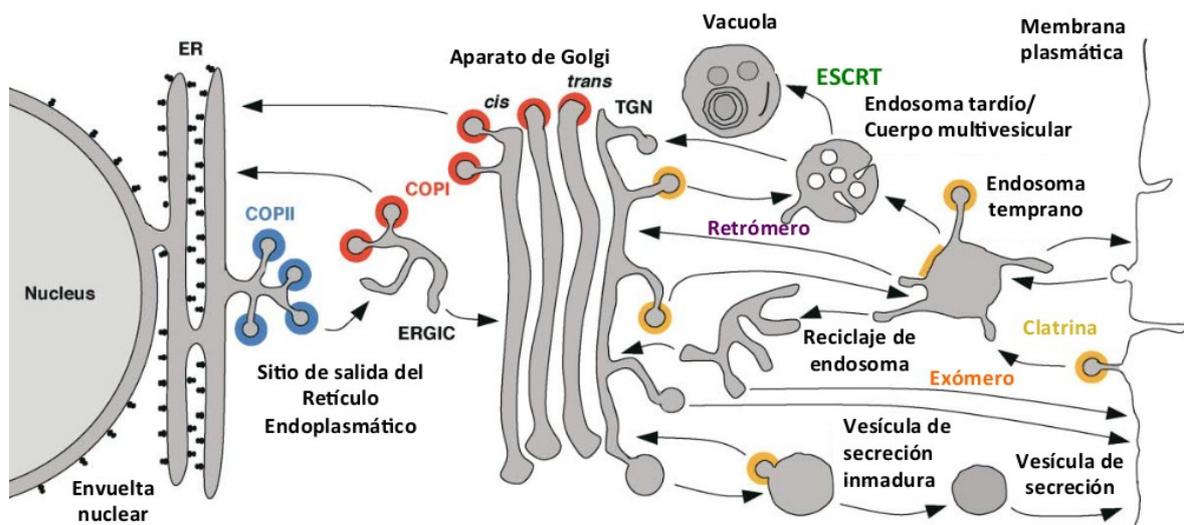


Figura 6. Esquema general del tráfico vesicular. En la ilustración se muestran los distintos compartimentos celulares implicados en el transporte vesicular y los diferentes tipos de vesículas que intervienen en los procesos de endocitosis, secreción y tráfico interno entre orgánulos. Los colores indican la localización y distribución de los diferentes tipos de vesículas. Las flechas muestran las diferentes vías de transporte de dichas vesículas. Figura modificada de Bonifacino & Glick, 2004.

Con carácter general, el transporte vesicular se puede dividir en un número reducido de fases que incluyen: la formación y escisión de la vesícula desde el compartimento donador, su transporte por la célula, el anclaje de la vesícula a la membrana del compartimento aceptor y su fusión con el mismo. Todos estos procesos están muy regulados para garantizar que las vesículas generadas se transporten hacia su destino correcto **Figura 7** (Bonifacino & Glick, 2004).

5.1. Formación de la vesícula

La formación de las vesículas de transporte está mediada en la mayoría de ocasiones por proteínas “de cubierta” que se encuentran en el citoplasma. Estas proteínas interactúan unas con otras en regiones específicas de la membrana donde se va a generar la vesícula y tienen gran especificidad por las moléculas que van a transportar. En ocasiones los cargos que se transportan son capaces de establecer contacto directo con las proteínas de la cubierta, sin embargo lo más habitual es que esta conexión se produzca a través de diversas proteínas o complejos adaptadores (Bonifacino & Glick, 2004).

En las células se pueden encontrar diferentes tipos de vesículas con cubierta que se pueden clasificar según el tipo de proteínas que las recubren. Generalmente, cada tipo de vesícula lleva a cabo uno o varios procesos de transporte determinados.

Tipos de vesículas

1. Vesículas cubiertas por clatrina: Participan en la ruta de secreción tardía, transportando cargos entre el aparato de Golgi y diversos orgánulos, y en la endocitosis. Son las vesículas de transporte mejor estudiadas y median gran parte de los procesos de tráfico vesicular.
2. Vesículas COPII: Intervienen en la ruta de secreción temprana exportando proteínas desde el retículo endoplasmático (RE) al aparato de Golgi.
3. Vesículas COPI: Emergen desde el aparato de Golgi para transportar cargos de forma retrógrada hacia el RE. Estas vesículas median el reciclaje de proteínas del RE y conforman un sistema de control de dicho orgánulo.
4. Exómero: Cubierta que hasta el momento sólo se ha descrito en *S. cerevisiae* y que media el transporte de proteínas desde la región trans-Golgi (TGN o trans-Golgi Network) hasta la membrana plasmática.
5. Retrómero: Es una cubierta que media la recuperación de proteínas desde los endosomas hacia el TGN.

Aunque estas vesículas tienen especificidad por diferentes compartimentos celulares y poseen distintos elementos estructurales, los mecanismos generales para su formación son similares. Los complejos proteicos que recubren la vesícula tienen una organización común ya que están formados por las proteínas propias de la cubierta, por adaptadores y por proteínas accesorias (en apartados posteriores se abordará cada caso en particular).

Regulación por GTPasas

El momento y el lugar donde se va a formar una vesícula está generalmente regulado por pequeñas proteínas de unión a GTP. Estas GTPasas pequeñas, también denominadas proteínas G, pertenecen a la superfamilia Ras y son reguladores esenciales del tráfico vesicular. Son proteínas monoméricas de unión a nucleótidos de guanina que alternan entre su forma activa, unida a GTP, y su forma inactiva, unida a GDP. La actividad de las GTPasas está mediada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina; los factores que inducen la liberación del GDP unido y su intercambio por el GTP se denominan GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), mientras que los GAPs (GTPase-Activating Proteins) promueven la hidrólisis de GTP a GDP.

Inicialmente se produce la activación de una GTPasa que favorece el ensamblaje de las proteínas de la cubierta, que se encuentran en el citoplasma, en la porción de la membrana donde se va a formar la vesícula y, en determinados casos, la interacción con los “cargos” que se van a transportar. Además, promueven la curvatura de la membrana que va a formar la vesícula e inducen su escisión liberándola del compartimento donador (Beck *et al*, 2011; Lee *et al*, 2005). Los lípidos de la membrana también tienen un papel importante en el proceso de formación de vesículas, ya que interactúan directamente tanto con las diferentes GTPasas como con las proteínas de la cubierta y los adaptadores (Krauss *et al*, 2003).

Las GTPasas de la familia Arf (ADP-Ribosylation Factor) son esenciales para la formación de distintos tipos de vesículas. Arf1p interviene en el reclutamiento de vesículas de clatrina asociadas al complejo adaptador AP-1 en procesos de secreción y reciclaje de proteínas (Valdivia *et al*, 2002; Daboussi *et al*, 2012; Zhdankina *et al*, 2001; Mullins & Bonifacino, 2001; Stearns *et al*, 1990). Esta GTPasa también interviene en la formación de la cubierta del exómero y de las vesículas COPI (Gaynor *et al*, 1998; Beck *et al*, 2011). En el caso de las vesículas COPII es la GTPasa Sar1p la que recluta el complejo adaptador Sec23-24 en la membrana plasmática (Matsuoka *et al*, 2001; Lee *et al*, 2005).

En el proceso de endocitosis mediado por clatrina (que se abordará con más detalle posteriormente) no se conoce hasta el momento la necesidad de la presencia de ninguna GTPasa para la iniciación de la formación de las vesículas. En este caso, el complejo adaptador AP-2 es reclutado en la membrana plasmática mediante su interacción con los

fosfatidil-inositoles fosfato (Gaidarov & Keen, 1999), aunque en mamíferos se ha visto que la GTPasa Arf6 favorece el reclutamiento de AP-2 a las membranas activando quinasas específicas que actúan sobre estos fosfolípidos (Krauss *et al*, 2003).

Por otra parte, las GTPasas de la familia Rho (Ras HOMolog) son necesarias para la organización del citoesqueleto de actina, la progresión del ciclo celular, y el establecimiento de la polaridad celular, interviniendo además en procesos de endocitosis independiente de clatrina (Perez & Rincon, 2010; Prosser *et al*, 2011). Las GTPasas de la familia Rab (Ras-related protein in Brain) son necesarias para aportar la energía necesaria para la fusión de las vesículas al compartimento “ceptor” al que se dirigen (Segev, 2001).

De este modo todas estas proteínas son necesarias para que exista un correcto funcionamiento de los mecanismos de tráfico vesicular.

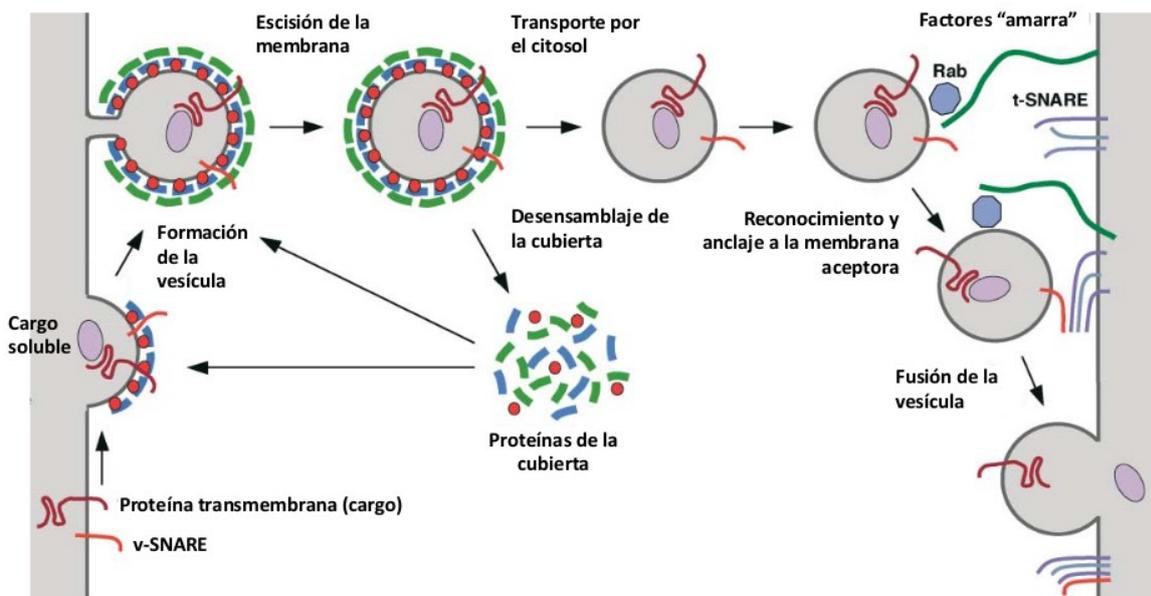


Figura 7. Esquema ilustrativo de la vida de una vesícula desde su formación en el compartimento donador hasta su fusión con la membrana del compartimento aceptor. El proceso simplificado consiste en la formación de la vesícula mediante el reclutamiento de proteínas de la cubierta en torno a los cargos y la deformación de la membrana plasmática; con ayuda de la actina la vesícula se escinde del compartimento donador y viaja por el citosol a lo largo del citoesqueleto de actina y los microtúbulos. En su destino final la vesícula es reconocida por los factores “amarra” del compartimento aceptor que permiten el anclaje de ésta para facilitar la posterior fusión con la membrana del compartimento aceptor a través de las proteínas SNAREs. Figura modificada de Bonifacino & Glick, 2004.

Requerimientos de actina

Tras la deformación inicial de la membrana es necesaria la formación de un cuello tubular para que se pueda liberar la vesícula. Estos procesos requieren la intervención del citoesqueleto de actina y de proteínas motoras para generar la fuerza necesaria que libere la vesícula del compartimento donador. En levaduras, la F-actina es totalmente necesaria para que se lleve a cabo el proceso de endocitosis, mientras que en mamíferos no lo es (para más información sobre la actina ver apartado 3.1. de esta sección) (Anitei & Hoflack, 2012; Boettner, 2012; Weinberg & Drubin, 2012).

Escisión de la vesícula

Para que la vesícula formada se escinda de la membrana necesita tanto la tensión generada por la polimerización de actina, como la intervención de diferentes proteínas. Este es el caso de las anfifisinas, las dinaminas y otras proteínas con dominios N- y F- BAR que se asocian al cuello de la invaginación y van a ayudar a “estrangular” la porción de membrana asociada al compartimento donador para liberar la vesícula.

Las anfifisinas forman heterodímeros que se ensamblan en el cuello de la invaginación. En mamíferos, las dinaminas actúan en la escisión de vesículas de la membrana plasmática, del TGN y de los endosomas (Pucadyil & Schmid, 2009; Ramachandran, 2011). Esta proteína es una GTPasa que se enrolla como un collar en el cuello de la vesícula naciente y controla la escisión de ésta mediante la hidrólisis de GTP; además se ha visto que interacciona con diversos reguladores de actina en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi (Cao *et al*, 2003, 2005). En este proceso también es necesaria la actuación de diversas fosfatasa que desfosforilan los lípidos adyacentes a la vesícula permitiendo la deformación de la membrana para favorecer la acción de las anfifisinas (Liu *et al*, 2009).

5.2. Transporte de la vesícula a través del citoplasma

Tras la escisión, la vesícula se desplaza por el citoplasma hacia su destino final -los compartimentos aceptores o la membrana plasmática- a una velocidad que puede rondar los 250 nm/s. En algunos casos las trayectorias parecen ser indefinidas, mientras que en otras ocasiones el movimiento es claramente lineal (Robertson *et al*, 2009). Los cables de actina y los microtúbulos sirven como vías para guiar a las vesículas por la célula, mientras que diversas proteínas motoras (miosinas, dineínas y quinesinas) son necesarias para generar la fuerza que hace que se produzca el movimiento vesicular (Anitei & Hoflack, 2012; Boettner, 2012; Weinberg & Drubin, 2012).

5.3. Desensamblaje de la cubierta proteica

Una vez que la vesícula se ha escindido del compartimento donador, la envuelta proteica se despolimeriza dejando a la vesícula rodeada simplemente por la membrana que se va a fusionar con el compartimento aceptor. Para que se produzca el desensamblaje de esta cubierta hace falta el aporte de energía que procede de la hidrólisis de GTP mediada por proteínas GAPs que favorecen la pérdida de la cubierta proteica (Doherty & McMahon, 2009; Boettner *et al*, 2012). La pérdida de las cubiertas hacen a las vesículas aptas para su posterior fusión con el compartimento aceptor, no obstante, se han encontrado evidencias de que, en determinadas ocasiones, las proteínas de la cubierta se mantienen hasta el momento de fusión de la vesícula, favoreciendo la unión con las proteínas de amarre del compartimento aceptor (Trahey & Hay, 2010; Cai *et al*, 2007).

5.4. Anclaje a la membrana

Una vez que la vesícula llega a su destino es necesario que ésta se ancle inicialmente a la membrana del compartimento aceptor para, posteriormente, fusionarse con ella. Para ello existen diversas proteínas amarra o “Tethering factors” cuya función es aproximar la vesícula a la membrana a la que se va a fusionar para así favorecer el posterior emparejamiento de los complejos SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor). Las proteínas amarra, al entrar en contacto con la vesícula, forman un puente entre ésta y la membrana aceptora favoreciendo el reconocimiento inicial de la vesícula. Estos factores de unión son reclutados por las GTPasas de la familia Rab los cuales, además, favorecen y regulan la posterior fusión de las membranas a través de la concentración de SNAREs en ellas. Las proteínas de amarre se pueden agrupar en dos categorías: proteínas largas con dominios “coiled-coil” y complejos multiproteicos (Multisubunit Tethering Complexes o MTCs). La mayoría de las proteínas de amarre “coiled-coil” se han encontrado en el aparato de Golgi, por lo que se han denominado “golginas”, aunque algunas están presentes en los endosomas (es el caso del factor EEA1) (Robinson *et al*, 2008; Niemes *et al*, 2010; Bröcker *et al*, 2010; Cai *et al*, 2007).

Por otra parte, se conocen nueve complejos multiproteicos (MTCs) que intervienen en procesos de secreción y endocitosis (COG, CORVET, Dsl1p, exocisto, GARP/VFT, HOPS/Clase C VPS, TRAPPI, TRAPP II y TRAPP III). Estos complejos se pueden dividir en tres grandes grupos diferentes (Bröcker *et al*, 2010):

a) Los necesarios para la fusión con el aparato de Golgi y con orgánulos que intervienen en la ruta de secreción, también denominados CATCHR (Complexes Associated with Tethering Containing Helical Rods) que son COG, Dsl1p, exocisto y GARP.

b) Los que intervienen en la ruta entre endosomas y lisosomas/vacuolas como CORVET y HOPS (Solinger & Spang, 2013).

c) Los complejos TRAPP (I, II y III), que son GEFs multiméricos necesarios para la activación de GTPasas de la familia Rab (Ypt1p, Ypt31p/Ypt32p) y que promueven la fusión de las membranas (Cai *et al*, 2007; Yu & Hughson, 2010; Bröcker *et al*, 2010).

5.5. Fusión con el compartimento aceptor

La última parte del viaje de una vesícula es su fusión con el compartimento aceptor. Este proceso ocurre a través del reconocimiento e interacción específica entre pares de proteínas transmembranales denominadas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors) seguido de la fusión entre las bicapas fosfolipídicas de las membranas de la vesícula y de la diana. Los SNARE se han descrito como una familia de proteínas de membrana que están relacionadas con tres proteínas neuronales: sinaptobrevina, syntaxina y SNAP-25. Existen dos tipos de proteínas SNARE: las v-SNAREs, que están presentes en la vesícula desde su formación, y las t-SNAREs, que se localizan en la membrana aceptor de la vesícula (Rothman, 1994; Söllner *et al*, 1993). La energía que se desprende en el proceso de unión de los dos tipos de SNAREs favorece la fusión de las dos bicapas lipídicas. En *S. pombe*, el gen *syb1⁺/snc1⁺* codifica una proteína v-SNARE similar a la sinaptobrevina (Edamatsu & Toyoshima, 2003) y los genes *psy1⁺/sso1⁺* y *sec9⁺* codifican las t-SNAREs similares a la syntaxina y a SNAP-25, respectivamente (Nakamura *et al*, 2001, 2005; Maeda *et al*, 2009).

Además de los SNAREs, la fusión de las vesículas requiere otros tipos de proteínas. Las GTPasas de la familia Rab influyen en la interacción de las v-SNARE y las t-SNARE para regular y facilitar la formación de los complejos de interacción v-SNARE/t-SNARE. La interacción entre los dos complejos promueve el acercamiento de las dos membranas, haciendo que se libere a su vez la energía necesaria para que se lleve a cabo la fusión. Las proteínas NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) son AAA ATPasas necesarias para el reciclaje de las SNAREs que forman un complejo con las proteínas adaptadoras SNAPs (Soluble NSF Attachment Proteins). Los complejos NSF/SNAP son reclutados en las membranas tras la unión de las v-SNARE y las t-SNARE, pero no se requieren para el emparejamiento vesícula/membrana aceptor o para la fusión de las membranas apareadas. Las proteínas NSF/SNAP actúan después de la fusión de las membranas para desmontar el complejo SNARE y permitir que estas proteínas transmembrana se reciclen para realizar sucesivos ciclos de transporte vesicular (Risselada & Grubmüller, 2012).

6. TRÁFICO VESICULAR MEDIADO POR CLATRINA

La secreción y la endocitosis son mecanismos a través de los cuales las células eucariotas regulan el flujo de proteínas hacia y desde la membrana plasmática y entre los diversos orgánulos intracelulares. Estos procesos implican la formación y el tráfico de vesículas, en su mayor parte con cubiertas proteicas, tal y como se ha indicado en el apartado anterior. Las vesículas recubiertas por clatrina juegan un papel fundamental y abarcan gran parte del transporte intracelular de proteínas y lípidos (Boehm & Bonifacino, 2001; Brodsky, 2012; Evans & Owen, 2002; Lafer, 2002; Girao *et al*, 2008; Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003; Boettner *et al*, 2012; Weinberg & Drubin, 2012; Faini *et al*, 2013).

6.1. Clatrina

La cubierta que poseen las vesículas de clatrina (CCVs) está compuesta por moléculas de clatrina y un complejo adaptador. Existen múltiples complejos adaptadores asociados con diferentes membranas intracelulares, que varían desde grandes adaptadores heterotetraméricos (APs) hasta proteínas monoméricas como son las GGAs (Nakayama *et al*, 2003).

6.1.1. Estructura de la clatrina

La unidad estructural o de ensamblaje de la clatrina se denomina trisquelión y está formada por un trímero de cadenas pesadas de clatrina (Chc1p), de aproximadamente 190 kDa cada una, que se unen radialmente sobre un eje central. Sobre cada una de estas cadenas pesadas se une de forma no covalente una cadena ligera de clatrina (Clc1p) de aproximadamente 25 kDa (Kirchhausen & Harrison, 1981; Ungewickell & Branton, 1981).

Cada uno de los tres brazos que forman el trisquelión mide aproximadamente 475 Å (Kirchhausen *et al*, 1986) y se puede dividir en seis segmentos o regiones diferentes: segmento proximal, segmento *knee*, segmento distal, segmento *ankle*, segmento de unión y segmento o dominio terminal (**Figura 8A**). El grosor de cada brazo es relativamente uniforme, exceptuando el dominio terminal que posee una estructura globular correspondiente a la región amino terminal de la cadena pesada. Las tres cadenas pesadas interaccionan entre ellas por su extremo carboxilo terminal (Fotin *et al*, 2004).

Cuando aproximadamente 36 trisqueliones (108 moléculas de Chc1p y 180 de Clc1p) se ensamblan alrededor de la membrana para formar la envuelta proteica de la futura vesícula, los brazos de cada uno de ellos interconectan desde el segmento distal hasta la región *ankle*, formando una estructura poliédrica con caras hexagonales y pentagonales que constituyen un enrejado de clatrina que envuelve la región de la membrana donde se va a formar la vesícula [**Figura 8B**; (Fotin *et al*, 2004)]. En esta estructura las cadenas ligeras de

clatrina quedan expuestas hacia el exterior de la vesícula. Por otra parte, la región terminal y el segmento de unión de las cadenas pesadas quedan libres para contactar con los diferentes adaptadores y con proteínas accesorias (Chu *et al*, 1996; Huang *et al*, 1997; Boettner *et al*, 2011; Fotin *et al*, 2004; Faini *et al*, 2013; Brodsky, 2012).

La cadena ligera de la clatrina se asocia al segmento proximal de la cadena pesada proximal (Ungewickell & Branton, 1981; Kirchhausen *et al*, 1983) a través de una región central de 71 residuos con repeticiones α -hélice (Kirchhausen *et al*, 1987; Jackson *et al*, 1987; Scarmato & Kirchhausen, 1990; Fotin *et al*, 2004), y también interacciona de forma variable con el segmento *knee* de ésta (Wilbur *et al*, 2010). Mediante diversos estudios se ha podido comprobar que en células de mamíferos la cadena ligera de la clatrina interacciona con la cadena pesada a través de tres residuos de triptófano que son esenciales para la unión, y que la región carboxilo terminal de CLC es la encargada de estabilizar la estructura del trisquelión (Ybe *et al*, 2007).

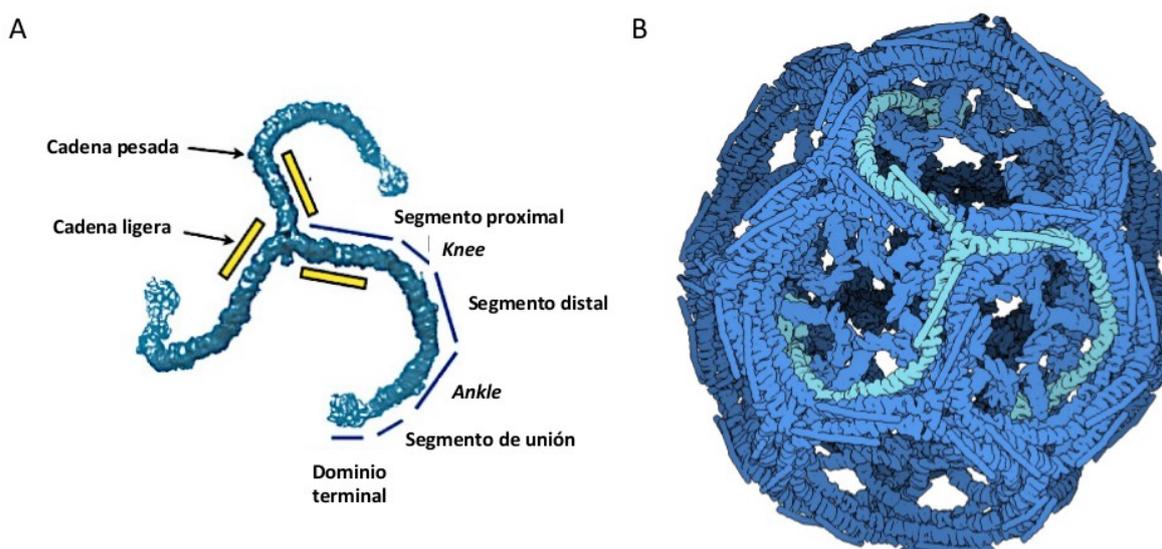


Figura 8. Arquitectura de la clatrina. A. Representación esquemática de un trisquelión donde se muestran las cadenas pesadas y ligeras de la clatrina y se indican los diferentes dominios de Chc1p. B. Ilustración de la organización de la envuelta de clatrina donde se observa resaltado un trisquelión en color azul claro.

En levaduras, la cadena ligera de la clatrina regula el ensamblaje eficiente de las cubiertas de clatrina (Chu *et al*, 1996; Huang *et al*, 1997). En mamíferos se ha visto que Clc1p es importante para la estabilización *in vitro* de los trisqueliones (Ybe *et al*, 2003, 2007) y que actúa inhibiendo la unión espontánea de trímeros de Chc1p (Ungewickell & Ungewickell, 1991; Liu *et al*, 1995). De igual manera, se sabe que la unión de Clc1p con Chc1p previene un mal plegamiento de las cadenas pesadas y que, por lo tanto, la cadena ligera de la clatrina es necesaria para el ensamblaje de la cubierta (Wilbur *et al*, 2010). Varios estudios, también realizados en mamíferos, sugieren que CLC desempeña un papel en el desensamblaje de la cubierta proteica (Ferreira *et al*, 2012; DeLuca-Flaherty *et al*, 1990; Schmid *et al*, 1984).

6.1.2. Funciones de la clatrina

El papel principal descrito para la clatrina es el de formar la cubierta de vesículas que participan en el transporte de moléculas desde la membrana plasmática a los endosomas tempranos y en el tráfico entre diferentes orgánulos intracelulares (estos eventos se describirán detalladamente más adelante).

Gran cantidad de proteínas implicadas en la formación y tráfico de vesículas cubiertas por clatrina han sido estudiadas en profundidad empleando como organismo modelo la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*. En este organismo, los mutantes obtenidos mediante la delección del gen que codifica la cadena pesada de la clatrina (*CHC1*) se han estudiado desde los años 80 (Payne & Schekman, 1985; Lemmon & Jones, 1987). En los estudios realizados se descubrió que la delección de *CHC1* provocaba multitud de defectos en la levadura. Las células presentaban crecimiento lento y morfología aberrante, además de ser genéticamente inestables (Payne & Schekman, 1985; Lemmon & Jones, 1987). Sin embargo, la ausencia del gen no era letal, a no ser que las células portasen una segunda mutación en otro gen (Lemmon & Jones, 1987; Munn *et al*, 1991). Aun con todos los defectos encontrados en los mutantes de *CHC1*, éstos eran capaces de secretar eficientemente diversas proteínas como la fosfatasa ácida y la invertasa (Payne & Schekman, 1985; Payne *et al*, 1987).

En *S. cerevisiae* los mutantes *chc1Δ* y *clc1Δ* presentan algunos fenotipos similares, sin embargo, los mutantes carentes de *CLC1* son viables en todas las condiciones y fondos genéticos estudiados (Chu *et al*, 1996; Silveira *et al*, 1990). En el caso de la ameba *Dictyostelium discoideum*, al igual que en *S. cerevisiae*, el fenotipo de los mutantes carentes de la cadena pesada es mucho más drástico que el que presentan los mutantes que no poseen la cadena ligera (Wang *et al*, 2003). En mamíferos, la cadena ligera de la clatrina tampoco es esencial, pero es necesaria para la estabilidad de los trisqueliones (Ybe *et al*, 2003, 2007). Por otra parte, aunque la depleción o sobreexpresión de *CLC* sólo provoca un defecto leve en la endocitosis, se han observado diversos defectos en el tráfico TGN/endosomas (Poupon *et al*, 2008; Wilbur *et al*, 2008; Huang *et al*, 2004; Chen & Brodsky, 2005), lo que sugiere que la función de la clatrina es más relevante para la secreción que para la endocitosis.

Un hecho a resaltar es que, mientras las secuencias aminoacídicas de las cadenas pesadas de la clatrina están altamente conservadas en diferentes especies, no ocurre lo mismo con las secuencias de las cadenas ligeras, aunque éstas sí que presentan características físico-químicas similares (Silveira *et al*, 1990; Wang *et al*, 2003; Brodsky, 2012). Estas diferencias sugieren que, o bien la cadena ligera de la clatrina es menos importante que la cadena pesada para la funcionalidad de las vesículas, o bien la cadena ligera tiene distinta función en diferentes organismos.

La clatrina, además de constituir la cubierta de las vesículas que participan en distintos procesos de transporte, se ha visto que contribuye de forma autónoma a la organización de los citoesqueletos de actina y microtúbulos.

La clatrina como elemento organizador de actina

La cadena ligera de la clatrina juega un papel importante en el proceso de endocitosis ya que regula la polimerización de actina en los parches endocíticos a través de su unión a la proteína Sla2p (Newpher & Lemmon, 2006; Boettner *et al*, 2011).

Además del papel que tiene la cubierta de clatrina en el reclutamiento de la actina para favorecer la escisión de las vesículas de la membrana plasmática, se han descubierto diferentes funciones para la clatrina relacionadas con la organización de la actina. En mamíferos, durante la infección por *Listeria*, la clatrina y la actina se acumulan en la región donde contactan la bacteria y la célula hospedadora para formar una vesícula de internalización del patógeno mucho mayor que las típicas vesículas de clatrina (Cossart & Veiga, 2008; Brodsky, 2012). Así mismo, la formación de sinapsis inmunológicas (IS) en las regiones de contacto de las células T con los complejos APCs (Antigen-Presenting Cells) también conlleva un reclutamiento masivo de actina en esas zonas, la cual es dependiente de la clatrina (Calabia-Linares *et al*, 2011).

Por otra parte, en *Drosophila* se ha visto que la cadena pesada de la clatrina está implicada en el reclutamiento del complejo Scar/Wave, necesario para la formación de la melopodios, en la membrana plasmática (Gautier *et al*, 2011), por lo que la clatrina también podría tener un papel en la migración celular.

La clatrina y su interacción con los microtúbulos

En mamíferos, la cadena pesada de la clatrina también se localiza en el SPB (Spindle Pole Pole Body o Cuerpo polar del huso) durante la mitosis. En este caso Chc1p forma un complejo con la proteína asociada a microtúbulos TACC3 y con la proteína ch-TOG, el cual participa en el crecimiento y estabilización de los microtúbulos (Royle, 2011, 2012). El complejo formado juega un papel importante en la estabilización de las fibras del cinetocoro. Estas fibras, que se extienden desde el cinetocoro hasta el centrosoma, participan en la segregación de los cromosomas durante la mitosis y son fundamentales para que este proceso se lleve a cabo eficientemente (Royle, 2011, 2012).

6.2. Adaptadores de clatrina

Para la correcta formación de las vesículas cubiertas por clatrina se necesitan diferentes complejos adaptadores que interconecten las membranas en las que están los cargos con las moléculas de clatrina que se van depositando sobre ellas. Existen diversos tipos de adaptadores asociados a la clatrina que varían tanto en su estructura, como en los procesos en los que intervienen.

6.2.1. Complejos Adaptadores (APs)

Los complejos adaptadores AP (Assembly Polypeptides) se han catalogado como el mayor componente estructural que forma parte de las vesículas cubiertas por clatrina, tras la propia clatrina. Estos complejos intervienen en la selección del cargo que se va a transportar y en el ensamblaje de la cubierta de las vesículas (Schmid, 1997; Hirst & Robinson, 1998).

En mamíferos, hasta el momento, se conocen cinco complejos adaptadores diferentes denominados AP 1–5. Estos complejos están asociados a la membrana plasmática, al TGN y a los endosomas, mediando el tráfico entre estos compartimentos. Sólo en el caso de AP-1 y AP-2 se ha visto interacción directa con clatrina, los otros complejos adaptadores parecen poder ejercer su función sin unirse a ella (Boehm & Bonifacino, 2001; Robinson & Bonifacino, 2001; Hirst *et al*, 2011). En levaduras solamente se han descrito tres complejos pertenecientes a esta familia, los complejos adaptadores AP-1, AP-2 y AP-3.

Se denominan adaptinas a cada una de las subunidades que conforman los complejos adaptadores de tipo AP. Éstos son heterotetrámeros formados por dos subunidades mayores (una subunidad $\gamma/\alpha/\delta/\epsilon$ o ζ y una subunidad β 1-5, que tienen un peso comprendido entre los 70-100 kDa), una adaptina mediana (μ 1-5, de unos 50 kDa) y una adaptina pequeña denominada σ 1-5, de unos 20 kDa aproximadamente (**Figura 9**) (Boehm & Bonifacino, 2001; Robinson & Bonifacino, 2001; Hirst *et al*, 2011). Las adaptinas análogas de cada uno de los complejos adaptadores poseen una homología a nivel aminoacídico del 21 al 90% (Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst *et al*, 2011). De modo general, las subunidades de diferentes complejos no son intercambiables entre sí, exceptuando posiblemente a las subunidades β 1 y β 2 de mamíferos y a las subunidades híbridas β 1/2 de diversos invertebrados, que pueden formar parte tanto de los complejos AP-1, como AP-2 (Boehm & Bonifacino, 2001; Sosa *et al*, 2012).

Todos estos complejos poseen una estructura similar en la que las regiones amino terminales de las subunidades mayores forman un núcleo donde se unen las subunidades mediana y pequeña, mientras que las regiones carboxilo terminales forman unos apéndices que se unen al núcleo a través de una región bisagra flexible. Esta región flexible es una zona desestructurada de la proteína por la que el adaptador se une al dominio amino terminal de la cadena pesada de la clatrina, a través de dominios específicos de unión a clatrina (Fotin *et al*, 2004; Brodsky, 2012). En mamíferos, la interacción de los adaptadores AP-1 y AP-2 con la clatrina se produce a través de las regiones bisagra de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ (Gallusser & Kirchhausen, 1993; Dell'Angelica *et al*, 1998), aunque la estructura helicoidal solenoide de las subunidades γ y α también contribuye a la unión con la clatrina (Edeling *et al*, 2006). La subunidad μ es la principal encargada de la interacción de los adaptadores con los cargos y la adaptina σ tiene un papel estabilizador de la estructura del complejo. En *S. cerevisiae* solamente se ha observado interacción física de la clatrina con el adaptador AP-1 y no con los otros dos adaptadores que se han descrito para levaduras, AP-2 y AP-3 (Yeung *et al*, 1999). La ausencia de alguna de las cuatro subunidades afecta drásticamente a la formación de un complejo estable, pese a que en algunos organismos como *C. elegans* se ha comprobado que la pérdida de ciertas subunidades, aún permite la existencia de un complejo AP-2 parcialmente funcional (Panek *et al*, 1997; Gu *et al*, 2013). En el caso de *S. cerevisiae* se sabe que la delección del gen *APL3*, que codifica la subunidad mayor α de AP-2, hace que se pierda la unión entre las subunidades Apl1 y Aps2, impidiendo la formación del complejo adaptador (Yeung *et al*, 1999).

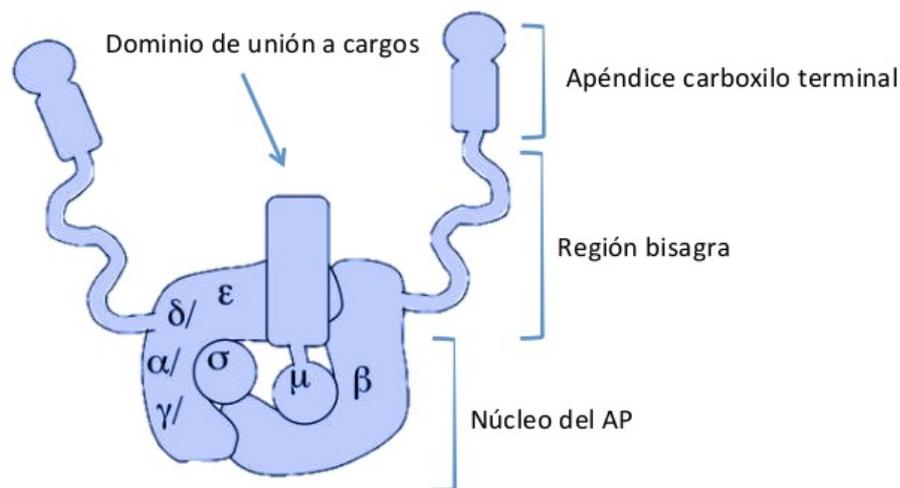


Figura 9. Estructura de los complejos AP. Estructura general de los complejos de la familia de adaptadores de clatrina AP. Se muestran las posiciones relativas de las cuatro subunidades que los componen y algunos de los dominios implicados en su función. Figura modificada de Hirst *et al*, 2011.

Cada uno de los complejos AP posee una localización y función diferente, aunque todos poseen una estructura similar:

- El complejo AP-1 posee una subunidad mayor γ (Apl4p) y otra $\beta 1$ (Apl2p); una adaptina mediana ($\mu 1$), denominada Apm1p; y una subunidad pequeña $\sigma 1$, denominada Aps1p (Boehm & Bonifacino, 2001). Este adaptador media el tráfico bidireccional entre TGN y los endosomas (Touz *et al*, 2004; Wang *et al*, 2003). En *S. cerevisiae*, diferentes mutaciones en los componentes del complejo AP-1 producen letalidad sintética con mutantes del gen *CHC1*, pero por sí mismas sólo originan un pequeño defecto en el procesamiento de la feromona factor α (Boehm & Bonifacino, 2001). Además, la ausencia de este adaptador provoca la deslocalización de proteínas del TGN o de los endosomas. El reciclaje de la quitín sintasa Chs3p y de la proteína SNARE Tgl1p, desde los endosomas hasta el TGN requiere la presencia de AP-1 (Valdivia *et al*, 2002; Yeung & Payne, 2001; Sacristan *et al*, 2013). AP-1 también es necesario para el correcto transporte entre TGN/endosomas de Ste13p, Kex2p, Gap1p y Drs2p (Ha *et al*, 2003; Foote & Nothwehr, 2006; O'Donnell *et al*, 2010; Liu *et al*, 2008). En contraste con lo que ocurre en la levadura de gemación, la delección de alguna de las subunidades de AP-1 en *S. pombe* provoca fenotipos más severos en las células como, por ejemplo, sensibilidad térmica y defectos en la citocinesis, en la integridad de la pared celular, en la fusión de las vacuolas y en la secreción de diversas enzimas (Kita *et al*, 2004). De igual modo, la ausencia de AP-1 produce la acumulación de proteínas destinadas a la secreción como la v-SNARE Syb1p en vesículas próximas al TGN (Kita *et al*, 2004; Ma *et al*, 2009). Recientemente también se ha descrito que en la levadura de fisión el transporte de la enzima Bgs1p depende parcialmente de AP-1 y que este adaptador es necesario para la correcta localización de la GTPasa Rho3p (Yu *et al*, 2012; Kita *et al*, 2011; Yu *et al*, 2013). En *D. discoideum* este complejo es necesario para el transporte de enzimas desde el TGN a los lisosomas y para la biogénesis de las vacuolas (Lefkir *et al*, 2003), y en *C. elegans* es el encargado de transportar las vesículas de receptores hacia los cilios olfativos (Dwyer *et al*, 2001). En mamíferos, AP-1 está implicado en el transporte del receptor de la manosa 6-fosfato desde el sistema endosomal hasta el TGN y también en el transporte de proteínas de membrana desde el aparato de Golgi o desde los endosomas hasta la membrana plasmática basolateral de las células epiteliales (Boehm & Bonifacino, 2002).
- El complejo AP-2 es el segundo componente más abundante de las vesículas endocíticas recubiertas por clatrina y es el adaptador mejor caracterizado dentro de la familia AP (Boehm & Bonifacino, 2001; Reider & Wendland, 2011). Las subunidades mayores α y $\beta 2$ se denominan Apl3p y Apl1p, respectivamente, y Apm4p y Aps2p corresponden a las subunidades mediana ($\mu 2$) y pequeña ($\sigma 2$) (Yeung *et al*, 1999). Este adaptador se localiza en la membrana plasmática y participa en la endocitosis

mediada por clatrina (Boehm & Bonifacino, 2001). AP-2 se une a la membrana plasmática a través de la subunidad α que interacciona con las cabezas lipídicas del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P2) (Collins *et al*, 2002; Gaidarov & Keen, 1999; Rohde *et al*, 2002); en mamíferos se ha comprobado que la GTPasa Arf6 facilita el reclutamiento de este adaptador y de la clatrina en las membranas de las vesículas sinápticas, estimulando la producción de PI(4,5)P2 (Krauss *et al*, 2003). Las subunidades μ 2 y σ 2 poseen sitios de unión a los diferentes cargos que se van a transportar (Jackson *et al*, 2010) y la adaptina β 2 es la encargada de unirse a la clatrina. En animales, AP-2, junto con otros adaptadores endocíticos, es fundamental para la formación de vesículas sinápticas en neuronas (Robinson, 2004; Kim *et al*, 2013). Igualmente, AP-2 interviene en la endocitosis mediada por clatrina del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, del receptor de LDL y del virus de la gripe, entre otros (Zupancic *et al*, 2008; Goh *et al*, 2010; Motley *et al*, 2003; Maurer & Cooper, 2006; Lakadamyali *et al*, 2006). En *D. melanogaster* la ausencia de la α adaptina de AP-2 provoca diferentes problemas relacionados con el desarrollo y la diferenciación celular, desde letalidad embrionaria hasta incapacidad de volar y caminar en individuos que llegan a adultos (González-Gaitán & Jäckle, 1997; Berdnik *et al*, 2002; O'Connor-Giles & Skeath, 2003). En *C. elegans* la ausencia de alguna de las subunidades de AP-2 también provoca problemas en el desarrollo e incluso inviabilidad embrionaria (Grant & Hirsh, 1999; Shim & Lee, 2000). En *D. discoideum* la ausencia de la adaptina β 1/2, subunidad que influye tanto al adaptador AP-1 como al AP-2, provoca serios defectos en el crecimiento, la citocinesis, el desarrollo y la formación de vacuolas (Sosa *et al*, 2012). En *S. cerevisiae*, al igual que ocurre en otros organismos, AP-2 se localiza en los lugares de endocitosis activa (Kaksonen *et al*, 2005; Carroll *et al*, 2009). Sin embargo, en este caso, no se ha encontrado interacción directa entre la subunidad β 2 del complejo adaptador y la clatrina (Yeung *et al*, 1999). No existe mucha información con respecto a la función exacta del complejo AP-2 en levaduras pero éste no parece tener mucha relevancia en la endocitosis mediada por clatrina. En *S. cerevisiae* el único cargo que se conoce de este complejo adaptador es la toxina "killer" K28 (Carroll *et al*, 2009) y en *S. pombe*, hasta ahora, no se le había atribuido ninguna función. Estos datos parecen indicar que en levaduras, AP-2 podría estar involucrado en la internalización de cargos muy específicos por lo que su papel no sería tan relevante como en otros organismos.

- El complejo AP-3 está relacionado con el transporte desde el TGN a las vacuolas (Bowers & Stevens, 2005; Dell'Angelica, 2009; Hirst *et al*, 2011). Sus subunidades mayores δ y β 3 se denominan Apl6p y Apl5p, mientras que Apm3p y Aps5p corresponden a las subunidades μ 3 y σ 3, respectivamente. En *S. cerevisiae*, la ruta mediada por este complejo adaptador va desde el TGN a las vacuolas directamente sin pasar por los endosomas; también se denomina ruta ALP, ya que se descubrió al

analizar el tráfico de la enzima fosfatasa alcalina. Para llevar a cabo este transporte es necesaria la presencia del complejo AP-3 pero no la de la clatrina. Otras de las proteínas que siguen esta ruta son Yck3p, Vamp3p y Nyv1p, que están localizadas en la membrana de la vacuola. Esto indicaría que esta ruta mediada por el adaptador AP-3 podría ser un mecanismo de transporte directo a la vacuola sin tener que pasar previamente por compartimentos intermedios (Dell'Angelica, 2009). Estudios realizados en mutantes del complejo AP-3 en moscas, ratones y en humanos han demostrado que este adaptador es particularmente importante para el tráfico de proteínas destinadas a los lisosomas (Robinson, 2004; Dell'Angelica, 2009).

6.2.2. Otros adaptadores

Existen otra serie de adaptadores que median el transporte de las vesículas cubiertas por clatrina en el proceso de endocitosis y en la secreción.

Este es el caso de los adaptadores monoméricos GGAs (Golgi-localized, Gamma-ear containing ARF-binding proteins) que están relacionados con el transporte desde el TGN hasta los endosomas tardíos. En levaduras (*S. cerevisiae* y *S. pombe*) existen dos GGAs diferentes, mientras que en mamíferos existen tres. Estos adaptadores poseen una estructura similar al dominio carboxilo terminal de las adaptinas mayores. En levaduras la delección de las dos GGAs provoca defectos en el transporte de las proteínas CPY (carboxipeptidasa Y), CPS (carboxipeptidasa S), Pep12p, y Gap1p, en la maduración del factor α y en la morfología vacuolar (Boehm & Bonifacino, 2001; Bonifacino, 2004; Scott *et al*, 2004).

Por otra parte, están las proteínas con homología a epsinas que en levaduras son las proteínas Ent1p, Ent2p, Ent3p y Ent5p. Éstas poseen estructura monomérica y tienen funciones redundantes con otros adaptadores en los procesos en los que participan. Ent3p y Ent5p son proteínas que intervienen en procesos de tráfico desde el TGN a los endosomas y a las vacuolas (Copic *et al*, 2007; Duncan *et al*, 2003). Ent1p y Ent2p, por su parte, promueven la endocitosis de moléculas que poseen señales de ubiquitinación, como es el caso del receptor Ste2p (Reider & Wendland, 2011). Las proteínas adaptadoras homólogas a AP180 (Yap1801 y Yap1802) actúan también en el proceso de endocitosis y son necesarias para la internalización de v-SNAREs, como es el caso de Scn1p (Burston *et al*, 2009), y parecen tener un papel redundante con las epsinas (Maldonado-Báez *et al*, 2008).

6.3. Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es la mayor ruta de internalización de membranas y lípidos desde la superficie celular. Es un proceso altamente conservado desde levaduras a humanos y está muy regulado. Tal y como se ha explicado previamente, el proceso comienza con la incorporación de diversas proteínas sobre la porción de membrana que se va a endocitar para promover la formación de las vesículas y el posterior transporte de las mismas hacia el interior celular. [Figura 10 (Sirotkin *et al*, 2010; Boettner *et al*, 2012; Weinberg & Drubin, 2012)].

En primer lugar es necesaria la unión de diversos factores, denominados proteínas tempranas, al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂) de la membrana, que marcarán los sitios donde se va a formar la vesícula endocítica. La fosforilación de estos lípidos por inositol quinasas es fundamental para la formación de las vesículas (Stefan *et al*, 2002; Antonescu *et al*, 2011). En levaduras, las primeras proteínas que llegan al sitio de formación de la vesícula son la clatrina, Ede1p (una proteína con homología a Eps15p) y Syp1p (una proteína con dominios F-BAR/ μ 2) (Reider *et al*, 2009; Stimpson *et al*, 2009).

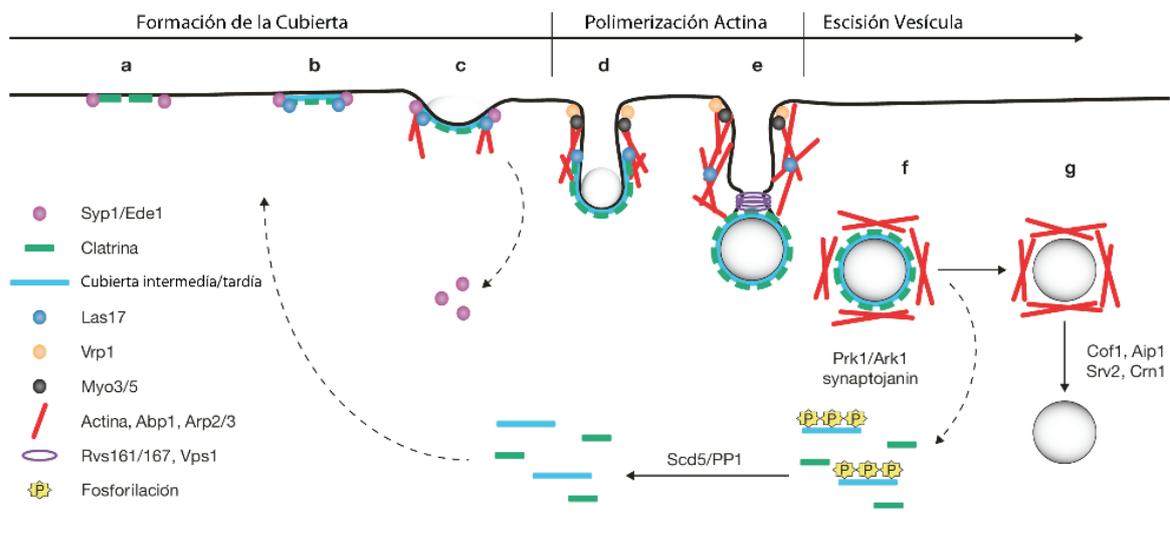


Figura 10. Modelo del mecanismo del proceso de endocitosis mediada por clatrina en levaduras. La endocitosis mediada por clatrina en levaduras se puede dividir en tres etapas temporales diferentes. La formación de la cubierta comienza con la unión de diversas proteínas tempranas a la membrana plasmática como Syp1p y Ede1p, para que posteriormente se una la cubierta principal de clatrina y otras proteínas accesorias. Una vez establecida la cubierta, hay una polimerización masiva de actina inducida y controlada por el complejo Arp2/3 que va a ejercer la fuerza necesaria para invaginar la membrana plasmática. Las anfifisinas Rvs161/167 son las encargadas de escindir la vesícula. Una vez liberada la vesícula se produce el desensamblaje de las proteínas de la cubierta por la acción de proteínas quinasas y fosfatasas para que intervengan en la formación de sucesivas vesículas endocíticas. Figura modificada de Boettner *et al*, 2012.

La proteína Ede1p es necesaria, al igual que la clatrina, para que la formación de la vesícula se lleve a cabo correctamente, mientras que Syp1p interviene en la formación de los parches de actina y es esencial para la formación de estos en células de mamíferos (Henne *et al*, 2010), pero no así en levaduras (Kaksonen *et al*, 2005; Boettner *et al*, 2009; Stimpson *et al*, 2009).

Para que se produzca la formación de la cubierta proteica es necesaria la presencia de diversos adaptadores que favorezcan la interacción de la clatrina con el componente lipídico de la membrana y con los diferentes cargos que se van a endocitar. Como ya se ha comentado, el complejo adaptador AP-2 es el mediador principal de la endocitosis en células de mamíferos. En el caso de las levaduras este complejo no es esencial para la endocitosis mediada por clatrina y parece que su papel estaría más relacionado con la endocitosis de determinados cargos específicos (Carroll *et al*, 2009). En este caso, sin embargo, parecen cobrar mayor protagonismo otros adaptadores como las epsinas Ent1p y Ent2p y las proteínas Yap1801/2 (AP180), que tendrían un papel redundante entre ellas (Maldonado-Báez *et al*, 2008). Seguidamente se unen una serie de proteínas, entre las que se incluyen Sla2/End4p y Sla1p, para formar las cubiertas intermedias y tardías que van a permitir la unión de diversos Factores Promotores de la Nucleación o NPFs (Nucleation-Promoting Factors), los cuales favorecerán el ensamblaje de una densa red de actina para promover la invaginación de la membrana plasmática (Moseley & Goode, 2006; Boettner *et al*, 2012). El responsable principal de la polimerización de esta red de filamentos de actina es el complejo Arp2/3, cuya actividad está regulada por los NPFs. En *S. cerevisiae* se conocen cinco NPFs diferentes: la proteína con homología a Eps15 (EH) Pan1p, el miembro de la familia WASP Las17p, los miembros de la familia MYO Myo3p y Myo5p, y la proteína Abp1p, que también es importante para el reclutamiento de los factores necesarios para el desensamblaje de la cubierta tras la escisión de la vesícula (Kaksonen *et al*, 2005). Éstas, junto con la acción de otras proteínas, favorecen la activación del complejo Arp2/3 y la nucleación de la actina. Los filamentos de actina formados, junto con la fuerza motora ejercida por las miosinas, deforman la membrana y provocan su invaginación para que posteriormente se escinda la vesícula (Boettner *et al*, 2012). En *S. cerevisiae*, las anfifisinas Rvs161p/Rvs167p intervienen en la liberación de la vesícula de la membrana plasmática y la dinamina Vps1, aunque no parece ser necesaria para la escisión, está presente en los parches de endocitosis (Boettner *et al*, 2012). En el caso de *S. pombe*, las proteínas con dominios F-BAR Cdc15p y Bzz1p parecen ser críticas para la escisión de la vesícula endocítica (Arasada & Pollard, 2011). En este proceso también son necesarias las fosfatasa Slj1p y Sjl2p o “sinaptojaninas”, que desfosforilan los lípidos PI(4,5)P₂ adyacentes a la vesícula permitiendo la deformación de la membrana para favorecer la acción de las anfifisinas (Liu *et al*, 2009).

La posterior despolimerización de la cubierta se inicia con la acción de las fosfatasa sinaptojaninas, las quinasas Ark1p/Prk1p y a la hidrólisis de GTP mediada por proteínas GAPs que favorecen la pérdida de la cubierta proteica (Doherty & McMahon, 2009; Boettner *et al*, 2012). Finalmente, la red de actina presente alrededor de las vesículas es eliminada por la acción de diversas moléculas como Cof1p, Crn1p, Srv1p y Aip1p (Okreglak & Drubin, 2010; Boettner *et al*, 2012), dejando a las vesículas libres para fusionarse con su diana.

6.4. Secreción mediada por clatrina

El último compartimento del aparato de Golgi, el TGN, dirige proteínas a diferentes destinos entre los que se incluyen la membrana plasmática y el sistema endosomal. El transporte desde el TGN está mediado mayoritariamente por vesículas cubiertas por clatrina que se dirigen a los endosomas tempranos. Los principales adaptadores que participan en la formación de las vesículas cubiertas por clatrina en el TGN son las proteínas GGAs, las proteínas con homología a epsinas Ent3p y Entp5, y el complejo adaptador AP-1. La formación de vesículas recubiertas por clatrina en el TGN para llevar a cabo el transporte de diversos cargos hasta los endosomas tempranos es un proceso que aún no está tan detallado como la endocitosis mediada por clatrina. A pesar de ello, diferentes estudios están permitiendo que cada vez se conozca más información sobre esta ruta de transporte.

Se ha descrito que los diferentes adaptadores se reclutan secuencialmente sobre la misma vesícula en dos momentos diferentes coordinados en el tiempo (Daboussi *et al*, 2012).

El proceso para la formación de la vesícula en TGN comienza con la llegada a la membrana de la GTPasa Arf1p, necesaria para el reclutamiento de la cubierta de clatrina, y de la proteína Pik1p que sintetiza el lípido de membrana fosfatidil-insositol-4-fosfato (PI4P). La presencia de Arf1p y el incremento de PI4P hacen que se incorpore a la membrana la proteína Gga2p, que a su vez favorece la llegada de más Pik1p, produciéndose mayor cantidad de PI4P, que, a su vez, reclutarán más GGAs. Estas proteínas interactúan con Ent3p, que se une a diferentes SNAREs involucrados en el reconocimiento/fusión de las vesículas a los endosomas (Black & Pelham, 2000; Wang *et al*, 2011) y también se une una pequeña proporción de moléculas de Ent5p. Una vez establecidos estos adaptadores, y debido a un incremento de los niveles de PI4P, comienza una segunda oleada de reclutamiento en la que se incorporan AP-1 y una mayor cantidad de Ent5p, que tiene capacidad autorreguladora en el proceso, para formar las vesículas de transporte que viajarán desde el TGN (Daboussi *et al*, 2012).

7. TRÁFICO VESICULAR INDEPENDIENTE DE CLATRINA

Aunque los eventos de transporte vesicular mediados por vesículas cubiertas por clatrina son los mejor caracterizados, existen otra serie de rutas implicadas en la endocitosis y secreción de moléculas en las que intervienen otra serie de vesículas. A continuación se describen brevemente estas rutas, su función y el tipo de vesículas que intervienen ellas.

7.1. Vesículas COPII

Las vesículas COPII son las responsables del transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático (RE) al aparato de Golgi. Estas vesículas parten de regiones específicas del RE denominados ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites), que son las zonas donde se van a reclutar los diferentes componentes de las cubiertas de las vesículas (Okamoto *et al*, 2012; Spang, 2009). La GTPasa responsable del reclutamiento de las diferentes proteínas de la cubierta en la membrana del RE, es Sar1p. Esta GTPasa pertenece a la familia Arf y es activada por el GEF Sec12p. La cubierta de las vesículas COPII está formada por un heterodímero constituido por las proteínas Sec23p y Sec24p, que reclutan las moléculas cargo que se van a transportar, y por un heterotetrámero formado por dos unidades de la proteína Sec13p y dos unidades de Sec31p (Jensen & Schekman, 2011). Además Sec16p es una proteína fundamental para la estabilización de la cubierta, ya que actúa como andamio de unión entre los diferentes componentes de la cubierta (Whittle & Schwartz, 2010). A diferencia de la clatrina, las proteínas que constituyen la cubierta COPII pueden interactuar y reconocer los cargos que se van a transportar, aunque también existen diversos adaptadores específicos que median el tráfico de determinadas moléculas. Este es el caso de los receptores de la familia p24, que median el tráfico de proteínas con anclaje GPI, o de Erv29p y Erv14p, que son necesarias para el transporte de la proteína soluble Cpy1p, la primera, y de proteínas transmembrana dirigidas a la vía de secreción, la segunda.

7.2. Vesículas COPI

El transporte mediado por vesículas COPI es un mecanismo importante para la recuperación de proteínas y de membrana desde el aparato de Golgi al retículo endoplasmático. Estas vesículas también están implicadas en el reciclaje de proteínas y en el transporte anterógrado (biosintético) en el aparato de Golgi (Hsu & Yang, 2009). Las vesículas COPI y COPII no son iguales estructuralmente ni realizan las mismas funciones. El ensamblaje de la cubierta COPI sobre la membrana depende de la actividad de la GTPasa Arf1p, mediada por los GEFs Gea1p y Gea2p (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003; Faini *et al*, 2013). La cubierta de las vesículas COPI se denomina coatómero y está formada por siete proteínas diferentes. Las subunidades α , β y ϵ (Ret1p/Sec27p/Sec28p de levaduras) forman el complejo externo o COPI-B y las subunidades β , γ , δ , y ζ (Sec26p/Sec21p/Ret2p/Ret3p) constituyen el complejo interno o COPI-f. Las subunidades de COPI-f, por su parte, presentan homología con los componentes del complejo adaptador AP-2 (Faini *et al*, 2013; Schledzewski *et al*, 1999; Gabriely *et al*, 2007; Popoff *et al*, 2011).

Al igual que las vesículas COPII, determinadas subunidades de COPI pueden interactuar con diferentes moléculas cargo para su reconocimiento y transporte. Este es el caso de las proteínas solubles marcadas con las señales de recuperación KDEL o KKXX (HDEL en levaduras) que son transportadas desde el Golgi de vuelta al RE a través del receptor KDEL, o Erd2p en el caso de las levaduras (Lewis & Pelham, 1992). El reciclaje de las proteínas de membrana se lleva a cabo a través del reconocimiento de motivos di-lisina o di-arginina por parte de los componentes de la cubierta COPI. Las subunidades Sec27p y Ret1p se unen a señales di-lisina, mientras que Sec26p y Ret2p lo hacen a motivos di-arginina presentes en las proteínas que se van a transportar (Eugster *et al*, 2004; Duden *et al*, 1994). Además de éstos, existen otros receptores de proteínas de membrana como es el caso de Rer1p, que recupera proteínas como Mns1p, Sec12p, Sec63p y Sec71p al RE mediante vesículas COPI (Kaether *et al*, 2007; Sato *et al*, 2003; Spasic *et al*, 2007).

7.3. El retrómero

Se denomina retrómero a la cubierta de determinadas vesículas que están implicadas en el tráfico y recuperación de proteínas desde los endosomas hacia el TGN (Seaman, 2005). Es una ruta conservada desde levaduras hasta mamíferos. En *S. cerevisiae*, el retrómero está formado por 5 proteínas diferentes, un heterotrímero constituido por Vps26p, Vps29p y Vps35p, que son las encargadas de reconocer a los cargos; y un heterodímero de las proteínas Vps17p y Vps5p, que van a deformar la membrana de los endosomas para formar la vesícula (Collins, 2008). El ensamblaje de las diferentes proteínas que forman la cubierta está controlado por la activación de la GTPasa Ypt7p (Balderhaar *et al*, 2010; Liu *et al*, 2012).

Se conocen diferentes adaptadores que participan en la recuperación de diversos complejos transportadores, como es el caso la proteína Snx3p, que es necesaria para el reconocimiento del transportador de hierro Frt1-Fet3 (Strochlic *et al*, 2008). También son cargos de este tipo de vesículas las proteínas Kex2p y Yif1p (Collins, 2008; Strochlic *et al*, 2008). Las vesículas del retrómero son reconocidas en el TGN por el complejo GARP (Golgi-Associated Retrograde Protein), que está formado por Vps51p-Vps52p-Vps53p-Vps54p, y es reclutado por la GTPasa Rab Ypt6p (Cullen & Korswagen, 2012; McGough & Cullen, 2011; Bonifacino & Hierro, 2011).

En *S. pombe*, Vps17p y Vps5p son necesarias para la esporulación (Koga *et al*, 2004), mientras que Vps26p, Vps29p y Vps35p son necesarias para el transporte retrógrado de Vps10p desde el compartimento prevacuolar al Golgi. Vps10 es una proteína necesaria para el transporte a la vacuola de diversas proteínas, entre las que se incluye la carboxipeptidasa Y (Cpy1p) (Iwaki *et al*, 2006).

7.4. El exómero

El término exómero se ha propuesto para un tipo de cubierta vesicular solo descrita hasta el momento en *S. cerevisiae* (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006). Es la cubierta de un tipo de vesículas que median el transporte de proteínas desde el TGN hasta la membrana plasmática. Está formada por la proteína Chs5p y por cuatro proteínas (Chs6p, Bud7p, Bch1p y Bch2p) que se denominan ChAPs (Chs5 and Arf1-binding Proteins). Chs5p y las ChAPs son reclutadas a la membrana del TGN por la GTPasa Arf1p (Trautwein *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006). Las ChAPs determinan la especificidad de las proteínas cargo que se van a transportar hacia la superficie celular, y su reclutamiento a las vesículas depende del autoensablaje de Chs5p que actúa de “andamio” para que las proteínas del complejo se mantengan unidas (Trautwein *et al*, 2006). Hasta el momento, sólo se conocen dos cargos de estas vesículas, que son la quitín sintasa Chs3p y Fus1p, siendo el tráfico de la proteína Chs3p el mecanismo más estudiado (Valdivia *et al*, 2002; Martín-García *et al*, 2011; Sacristan *et al*, 2013).

7.5. ESCRT

El transporte de diversas proteínas para su posterior degradación por proteasas vacuolares se lleva a cabo mediante la actuación de la maquinaria ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Ésta la forman cinco complejos diferentes denominados ESCRT-0, -I, -II, -III y Vps4p, que son los encargados de transportar las proteínas que se van a degradar hasta los endosomas tardíos y son los responsables de la formación los denominados cuerpos multivesiculares o MVB (Multivesicular Bodies). Posteriormente, los MVB se fusionarán con las vacuolas, favoreciendo la degradación de las proteínas por la actuación de las enzimas hidrolíticas presentes en estos orgánulos (Rusten *et al*, 2012; Henne *et al*, 2011).

7.6. Endocitosis independiente de clatrina

A pesar de que el proceso de endocitosis mediado por clatrina es el mecanismo de internalización de moléculas más estudiado, existen otras vías independientes al tráfico de vesículas cubiertas de clatrina por las cuales se produce la entrada de diferentes tipos de cargos en las células.

En mamíferos es donde se han descrito más rutas diferentes de endocitosis independientes de clatrina (Doherty & McMahon, 2009; Hansen & Nichols, 2009; Prosser *et al*, 2011; Sandvig *et al*, 2011).

1. **Endocitosis dependiente de RhoA y dependiente de Cdc42:** Ambos mecanismos parecen ser dependientes de los *lipid rafts* para la formación de las vesículas (Kumari *et al*, 2010; Lamaze *et al*, 2001; Howes *et al*, 2010). La ruta dependiente de RhoA es responsable de la endocitosis del receptor de la interleucina-2 (Lamaze *et al*, 2001) y también de diferentes toxinas como la toxina C2 de *Clostridium botulinum* (Pust *et al*, 2010; Gibert *et al*, 2011). La endocitosis dependiente de Cdc42 es la responsable de la toma de la mayor parte de fluido en la célula.

la. También es responsable de la internalización de proteínas con anclaje GPI; este último mecanismo también se denomina ruta CLIC/GEEC (clathrin- and dynamin-independent carrier/glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-enriched early endosomal compartment) (Kumari *et al*, 2010).

2. **Endocitosis asociada a caveolina:** La caveolina es una proteína estructural asociada a microdominios en la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos, denominados caveolas. La conformación de las caveolas depende de la expresión de las caveolinas, que se organizan en oligómeros que recubren la porción de membrana que se va a endocitar. El virus SV40 es uno de los cargos conocidos que se endocitan mediante esta ruta (Pelkmans *et al*, 2001; Norkin *et al*, 2002).
3. **Endocitosis dependiente de flotilina:** Las flotilinas son otro tipo de proteínas que se asocian a la membrana para llevar a cabo la endocitosis de diferentes partículas entre las que se encuentran la toxina B del cólera y los proteoglicanos (Payne *et al*, 2007; Glebov *et al*, 2006).
4. **Endocitosis asociada a Arf6:** Esta ruta está relacionada con la entrada del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y de las integrinas. Más que un mecanismo de endocitosis propiamente dicho, ésta parece ser una ruta de reciclaje entre la membrana plasmática y endosomas (Grant & Donaldson, 2009).
5. **Macropinocitosis:** Este mecanismo se refiere a la internalización de grandes porciones de membrana en las que se forman vesículas con un tamaño de diámetro mayor a 5 μm . Para que se lleve a cabo este proceso es necesaria la intervención de otras proteínas entre las que se incluyen Rac1, Pak1, Cdc42, Arf6 y las nexinas (Kerr & Teasdale, 2009; Wang *et al*, 2010).

Aunque las rutas de endocitosis independientes de clatrina fueron descritas inicialmente en células de vertebrados, se ha comprobado la existencia de algún mecanismo de endocitosis independiente de clatrina en otros organismos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum* y plantas, demostrándose que estas vías están conservadas a lo largo de la evolución (Cardelli, 2001; Glodowski *et al*, 2007; Bandmann *et al*, 2011; Prosser *et al*, 2011). Hasta hace unos años no se tenía información de que estos mecanismos también existiesen en hongos, incluyendo a las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, aunque había evidencias de su existencia ya que los mutantes *chc1 Δ* de *S. cerevisiae* mantenían aproximadamente un 30% del nivel de endocitosis (Kaksonen *et al*, 2005; Newpher *et al*, 2006; Chu *et al*, 1996). No obstante, estudios recientes al respecto han descubierto una ruta de endocitosis no mediada por clatrina y dependiente de la GTPasa Rho1p y la formina Bni1p en la levadura de gemación *S. cerevisiae* (Prosser *et al*, 2011; Prosser & Wendland 2012).



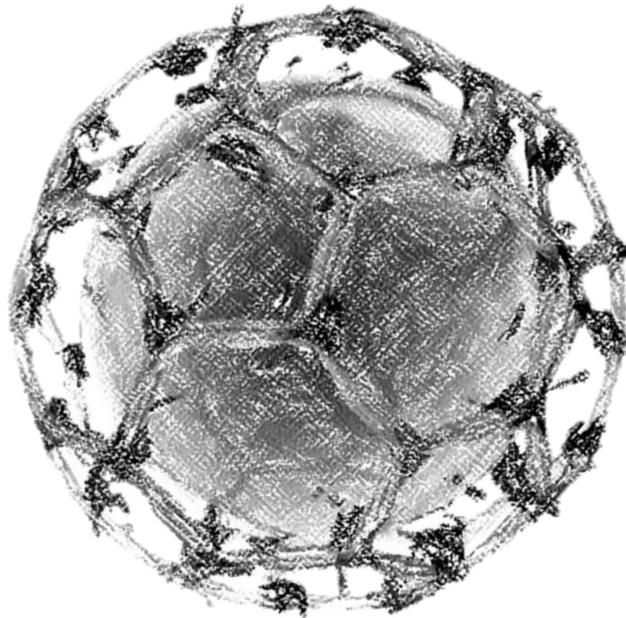
OBJETIVO



El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de cómo el tráfico vesicular mediado por clatrina regula la morfogénesis de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. En particular, se ha querido estudiar el papel que juegan en este proceso tanto la cadena ligera de la clatrina como su complejo adaptador AP-2.



RESULTADOS



1. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Clc1p

De acuerdo con la base de datos de *S. pombe* (<http://www.pombase.org>) las ORFs SPBC9B6.08 y SPAC26A3.05 codifican las proteínas Clc1p y Chc1p, que corresponden a las cadenas ligera y pesada de la clatrina respectivamente. Estos genes poseen una identidad del 29% (*clc1*⁺) y del 51% (*chc1*⁺) con sus genes ortólogos en *S. cerevisiae*. Antes de proceder al estudio de la función de la clatrina en *S. pombe* se llevó a cabo el análisis de la localización de Clc1p y Chc1p *in vivo* para conocer si su distribución en la levadura de fisión era similar a la observada en otros organismos (desde levaduras hasta mamíferos).

Con tal fin se clonaron los genes de la cadena ligera y pesada de la clatrina. El gen *clc1*⁺ se marcó en su extremo carboxilo terminal con las secuencias de las proteínas de fusión GFP y mCherry (ver "Materiales y métodos"). Por otra parte, el gen *chc1*⁺ se marcó en su región central con la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP). Con estas construcciones integradas en el genoma de la levadura se observó que las proteínas Clc1-mCherry y Chc1-GFP se distribuían por el citoplasma de la célula como puntos de diferentes tamaños, y que la señal de ambas proteínas co-localizaba (**Figura 11A**). Posteriormente al desarrollo de estos estudios Sirotkin y colaboradores (Sirotkin *et al*, 2010) describieron una localización similar para ambas proteínas en este organismo.

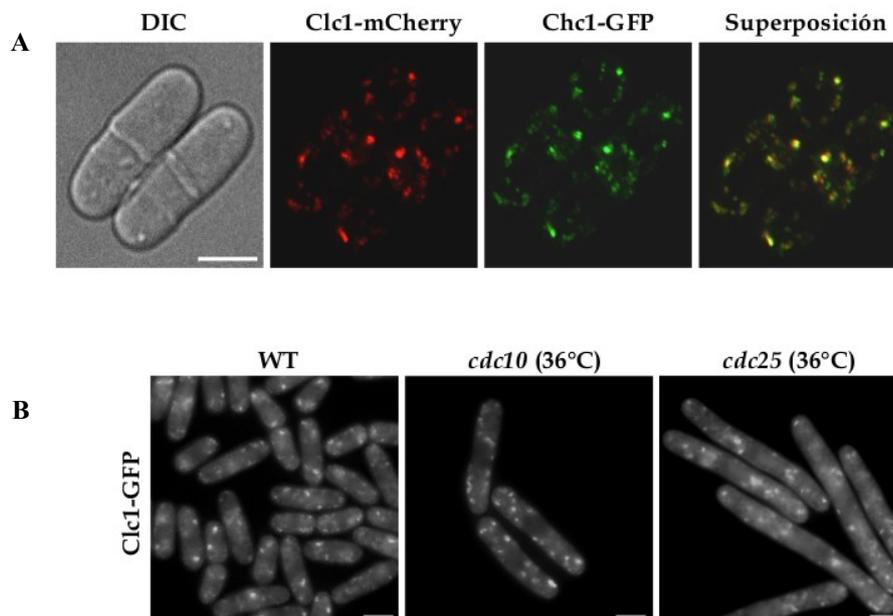


Figura 11. Localización de Clc1p en *S. pombe*. A. Micrografías de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia de células que expresan las proteínas de fusión Clc1-mCherry y Chc1-GFP y la imagen superpuesta de ambas fluorescencias. Las imágenes son proyecciones máximas de planos adquiridos en series-z con un sistema de microscopía DeltaVision. B. Micrografías de la localización de Clc1-GFP en células silvestres, *cdc10* y *cdc25* incubadas a 36°C durante tres horas. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

Como se observa en la **Figura 11A**, Clc1p y Chc1p no presentaban un patrón claro de polarización hacia los sitios activos de endocitosis, que en *S. pombe* son los polos y el ecuador celular. Para confirmar la ausencia de polarización durante todo el ciclo celular se observó la localización de la proteína de fusión Clc1-GFP en los mutantes *cdc10⁺* y *cdc25⁺*, que a 36°C sufren parada en las fases G1 y G2 del ciclo celular respectivamente. En ambos casos, al igual que ocurría en cultivos asincrónicos de la estirpe silvestre, la fluorescencia de Clc1-GFP se observaba como puntos brillantes dispersos por el citoplasma (**Figura 11B**). Un posible motivo por el cual no se apreciaría la señal de Clc1-GFP en los polos celulares podría ser que la intensa señal emitida por la proteína en el interior celular estuviese enmascarando la localización de Clc1p en los sitios activos de endocitosis.

Para abordar esta cuestión, células silvestres que expresaban Clc1-GFP se trataron con Brefeldina A, una droga que en neuronas inhibe el transporte desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi, pero que no interfiere con el reclutamiento de AP-2 ni de la clatrina en la membrana plasmática. La Brefeldina A también bloquea el tráfico del retículo endoplasmático al Golgi en la levadura de fisión (Krauss *et al*, 2003; Turi *et al*, 1994). Tras un breve tratamiento (100 µM de Brefeldina A durante 10 minutos, ver “Materiales y métodos”) fue posible observar pequeños puntos fluorescentes de Clc1-GFP en la superficie celular de los polos y en la zona de división celular (**Figura 12A**, puntos señalados con flechas en la fotografía situada a la derecha). Al hacer una tinción con el colorante lipofílico FM4-64 y superponer las imágenes obtenidas con las de la localización de la cadena ligera de la clatrina, se pudo observar cómo diversos puntos de Clc1-GFP coincidían con sitios donde se estaban formando vesículas endocíticas (panel de la izquierda de la **Figura 12B**, las flechas señalan posibles vesículas).

Otra aproximación con la que se pudo observar la señal de Clc1-GFP en la superficie celular sin emplear ninguna droga fue expresando esta proteína en un mutante *end4Δ*, que presenta defectos en la progresión de las vesículas endocíticas hacia el interior celular (Iwaki *et al*, 2004). En el panel situado a la derecha en la **Figura 12B** se observa cómo la vesícula de Clc1p señalada con una flecha coincide con una posible vesícula endocítica al hacer una tinción simultánea con FM4-64.

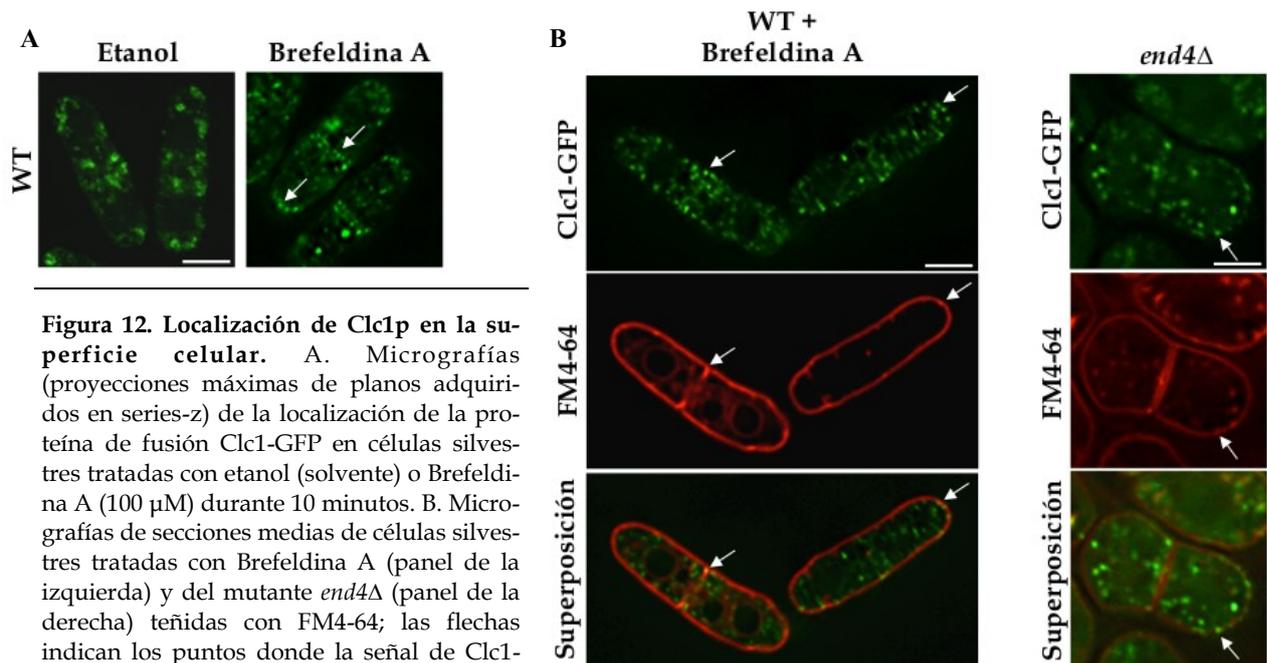


Figura 12. Localización de Clc1p en la superficie celular. A. Micrografías (proyecciones máximas de planos adquiridos en series-z) de la localización de la proteína de fusión Clc1-GFP en células silvestres tratadas con etanol (solvente) o Brefeldina A (100 μM) durante 10 minutos. B. Micrografías de secciones medias de células silvestres tratadas con Brefeldina A (panel de la izquierda) y del mutante *end4Δ* (panel de la derecha) teñidas con FM4-64; las flechas indican los puntos donde la señal de Clc1-GFP co-localiza con un sitio de endocitosis. Las imágenes de A y B se han obtenido con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μm.

2. LA DELECIÓN DEL GEN *clc1⁺* ES LETAL PARA LAS CÉLULAS DE *S. pombe*

Con el fin de estudiar la función del gen *clc1⁺* en *S. pombe* se construyó un mutante nulo para el mismo. Para ello se transformó una cepa diploide (HVP124) con el casete de delección *clc1::KANMX6* construido tal y como se explica en la sección “Materiales y métodos”. En varios clones diploides heterocigóticos *clc1⁺/clc1::KAN*, fruto de la transformación, se indujo la esporulación y se realizó el análisis de tétradas mediante micromanipulación en placas de medio YES. Como se muestra en la **Figura 13A**, tras 5 días de incubación a 28°C solamente dos de las cuatro esporas disecionadas generaron colonias, las cuales eran sensibles a geneticina. Este dato indicaba que la delección del gen *clc1⁺* podría ser letal ya que los mutantes nulos deberían ser resistentes a este antibiótico. Este mismo experimento se realizó disecionando las tétradas en placas de YES suplementadas con el estabilizador osmótico sorbitol. En esta ocasión las cuatro esporas formaron colonias, dos de ellas de tamaño bastante reducido y capaces de crecer en placas de YES suplementadas con sorbitol y geneticina (resultado no mostrado).

2.1. La estabilización osmótica del medio rescata la letalidad del mutante *clc1Δ*

Para determinar si *clc1⁺* era necesario para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*, o sólo lo era para la germinación de las esporas, se realizó un ensayo de crecimiento para determinar la supervivencia del mutante *clc1Δ* en ausencia de un estabilizador osmótico en el medio. Células de una estirpe silvestre y de la estirpe mutante, incubadas en medio YES líquido suplementado con sorbitol, se lavaron y se transfirieron a un medio libre del estabilizador osmótico. En estas condiciones se tomaron alícuotas a las 0 horas (células creciendo en medio con sorbitol) y después de estar incubadas sin estabilización osmótica durante 12, 24 y 36 horas. Por cada muestra recogida se sembraron un total de 600 células en placas de YES con sorbitol que se incubaron durante 5 días a 28°C. Transcurrido ese tiempo se cuantificó el número de colonias formadas. Como se muestra en la gráfica de la **Figura 13B**, tras 12 horas de crecimiento en ausencia de sorbitol en el medio la viabilidad de las células del mutante *clc1Δ* se redujo hasta el 30%. A las 24 horas de estar creciendo en esas mismas condiciones prácticamente la totalidad de las células mutantes estaban muertas, hecho que no ocurría al analizar el crecimiento de colonias en la cepa silvestre. Mediante una tinción con azul de metileno se observó que aproximadamente un 50% de las células mutantes estaban lisadas tras 12 horas de incubación en YES sin sorbitol (**Figura 13B**, ejemplos mostrados en el panel situado a la derecha).

Con estos datos se asumió que la delección del gen *clc1⁺* era letal y que la estabilización osmótica del medio era capaz de rescatar esta letalidad, permitiendo el crecimiento y la división de las células.

Posteriormente a la realización de estos experimentos, en el año 2010 Kim y colaboradores en su estudio titulado "Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*" (Kim *et al*, 2010) determinaron que tanto la delección de *clc1⁺* como la de *chc1⁺* eran letales para *S. pombe*, corroborando así nuestros resultados.

Dado que el análisis del mutante *clc1Δ* sólo podía ser realizado empleando medios estabilizados osmóticamente, los experimentos presentados en este trabajo en los que se empleó el mutante *clc1Δ* se realizaron utilizando medios suplementados con sorbitol 1,2 M. Las cepas utilizadas como controles se incubaron en las mismas condiciones que la estirpe *clc1Δ*.

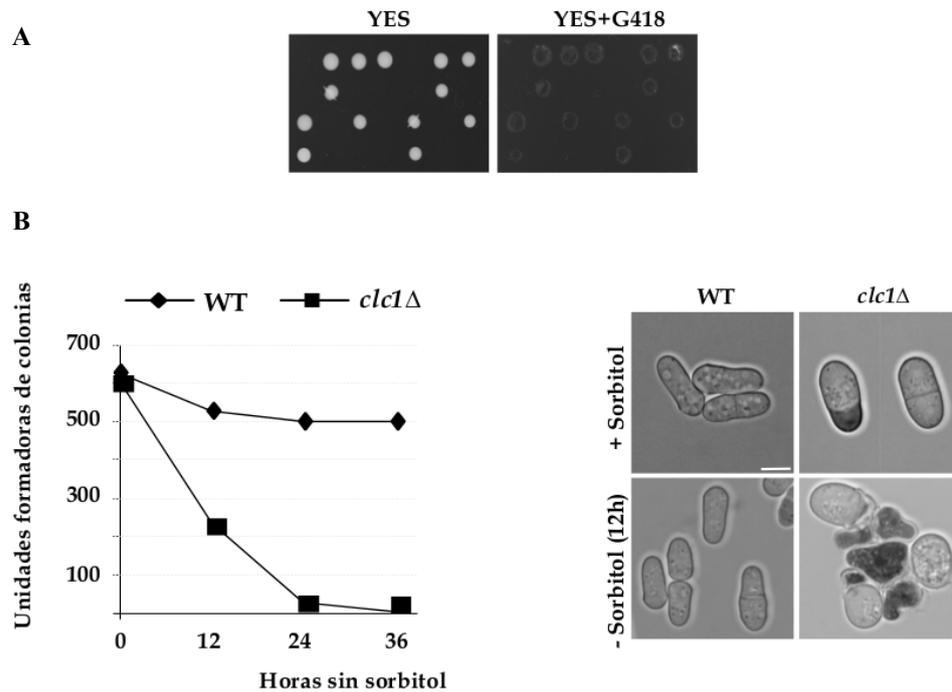


Figura 13. La delección *clc1Δ* es letal en ausencia de sorbitol. A. Placas que muestran el resultado del análisis de tétradas; se diseccionaron esporas de una estirpe diploide *clc1⁺/clc1::KAN* en placas de YES y se hicieron réplicas en placas de YES+geneticina (G418) que se incubaron a 28°C durante 5 días. B. Panel izquierdo, gráfica que muestra la cantidad de unidades formadoras de colonias (CFU) de una estirpe silvestre y del mutante *clc1Δ* capaces de crecer en placas de YES+sorbitol tras haber sido transferidas desde YES+sorbitol a medio YES y haber sido cultivadas durante los tiempos indicados (en horas) a 28°C. Se representan las medias de los valores obtenidos. Panel derecho, micrografías de células de las cepas indicadas incubadas en presencia y ausencia de sorbitol durante 12 horas y teñidas con azul de metileno. Imágenes obtenidas con un microscopio óptico convencional. Barra de escala, 5 μm.

3. LAS CÉLULAS DEL MUTANTE *clc1Δ* PRESENTAN MORFOLOGÍA ABERRANTE

Las células *clc1Δ* presentaban morfología aberrante cuando se incubaban en un medio suplementado con sorbitol. Éstas poseían diferente morfología sin seguir ningún patrón definido. Como se observa en la **Figura 14A** algunas eran redondeadas, mientras que otras mostraban formas multipolares con tres y cuatro polos de crecimiento. También se encontraron células con un polo más ancho que otro; el polo más estrecho, en ocasiones, presentaba lisis celular (constatado por tinción con azul de metileno, resultado no mostrado). Estas células habitualmente formaban agregados y, generalmente eran de mayor tamaño que las de la estirpe control. Además se pudo apreciar que el tiempo de generación de la cepa mutante era notablemente mayor ($\tau = 3,5-4$ h en YES+sorbitol a 28°C) que el de una cepa silvestre en las mismas condiciones de crecimiento, que suele ser de 2,5 horas.

Para conocer cuál era el motivo que causaba los defectos vistos en la morfología de las células de *clc1Δ*, se llevó a cabo el análisis del citoesqueleto de actina y de la pared celular, que son dos elementos esenciales para la morfología de las células.

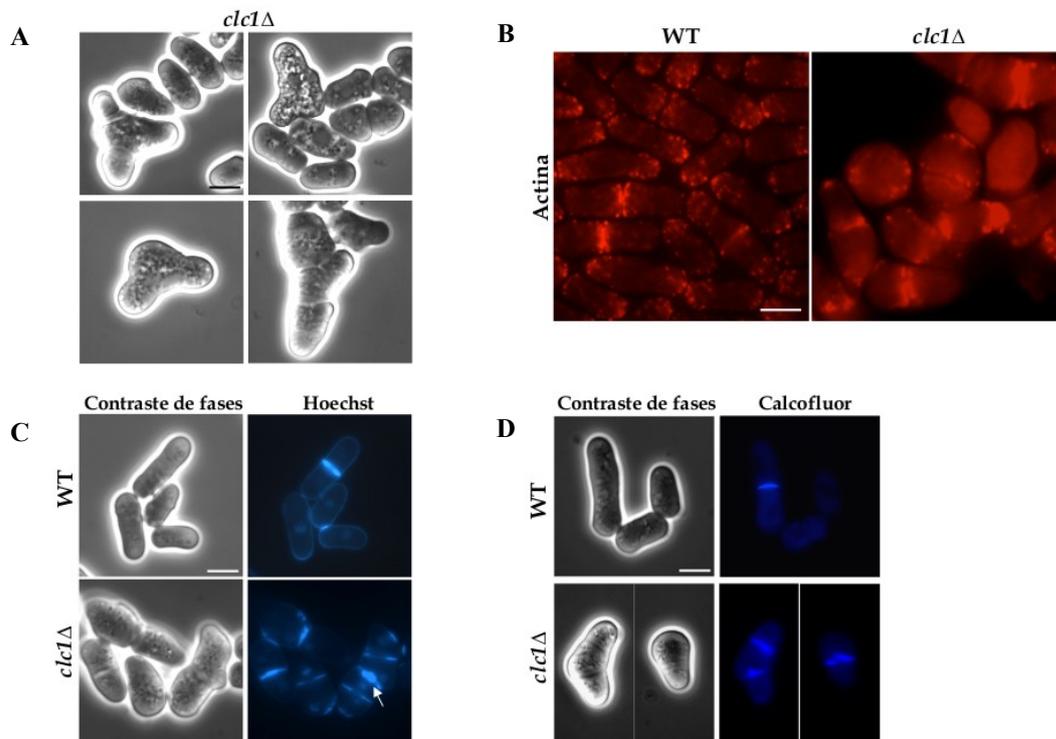


Figura 14. El mutante *clc1Δ* tiene defectos en morfogénesis A. Micrografías de contraste de fases que muestran células de la estirpe *clc1Δ* cultivadas en medio YES+sorbitol. B. Células de las estirpes silvestre y *clc1Δ* incubadas en YES+sorbitol, fijadas y teñidas con rodamina-faloídina para observar la distribución de la actina. C. Células de las mismas estirpes teñidas con Hoechst 33258 para observar la pared celular y los núcleos. D. Células de las mismas estirpes teñidas con Calcofluor para observar la pared celular de forma específica. La barra de escala representa 5 μ m.

3.1. Análisis del citoesqueleto de actina en el mutante *clc1Δ*

Al realizar una tinción con rodamina-faloídina para analizar la distribución del citoesqueleto de actina, se observó que en la cepa silvestre utilizada como control la mayoría de la actina se detectaba como parches discretos localizados en los polos y en la zona ecuatorial de las células (**Figura 14B**). En el caso de la cepa mutante se pudo observar una notable disminución del número de parches de actina, aunque la mayoría de ellos seguían distribuyéndose de forma relativamente polarizada. En muchas ocasiones las células carentes de *clc1⁺* presentaban grandes acúmulos de actina que eran mucho mayores que los parches de la estirpe silvestre. Estas anomalías en la distribución de la actina podrían estar contribuyendo a que se desarrollase un patrón de crecimiento aberrante que contribuiría al defecto en morfología observado en el mutante *clc1Δ*.

3.2. Análisis de la pared celular en el mutante *clc1*Δ

El hecho de que las células necesiten un estabilizador osmótico para poder crecer sugería que la cepa *clc1*Δ podría tener defectos en la síntesis de la pared celular. Además, no sólo los defectos presentes en el citoesqueleto de actina explicarían la morfología de esta estirpe, ya que defectos similares han sido observados en mutantes con problemas en la síntesis de pared celular (Ribas *et al*, 1991).

3.2.1. Distribución de la pared celular en el mutante *clc1*Δ

Al teñir las células mutantes con el colorante Hoechst 33258, que permite observar simultáneamente el núcleo y la pared celular, no se vieron diferencias en la tinción de los núcleos con respecto a la cepa silvestre, lo cual indicaría que estas células no tenían defectos en el proceso de división nuclear (**Figura 14C**). Sin embargo, al observar la tinción inespecífica de la pared celular con este colorante se vieron diversos defectos en las células carentes de *clc1*⁺. La mayoría de éstas presentaban grandes acumulaciones de pared celular, siendo especialmente evidente la aparición de engrosamientos en las regiones centrales de los septos ya cerrados (en la **Figura 14C** la flecha señala un septo engrosado). Con esta tinción también se observó que más del 50% de las células poseían más de un septo de división. Estos defectos se confirmaron mediante la tinción de las células con el colorante específico de pared Calcofluor White, tal y como se muestra en la **Figura 14D**. El Calcofluor se une específicamente al $\beta(1,3)$ glucano lineal, que en el caso de *S. pombe* se encuentra localizado en el septo primario.

Para analizar el estado de la pared celular en mayor detalle se realizaron fotografías de microscopía electrónica de transmisión de las cepas silvestre y mutante. En las micrografías mostradas en la **Figura 15** se puede observar que la ausencia de Clc1p causaba defectos tanto en la morfología de las células como en la distribución de la pared celular. Estas anomalías incluían diferente grosor de la pared lateral y de los septos, deformidad de éstos y engrosamientos en su región central (en la **Figura 15**, los triángulos en la imagen **b** señalan anomalías en los septos). También se observaron células multiseptadas y otras que, tras la división celular, aún permanecían unidas sin que hubiese un septo de división entre ellas (**Figura 15**, imagen **e**; las flechas señalan zonas por las que las células siguen unidas tras la citocinesis). Los defectos en la separación celular podrían contribuir a la formación de agregados celulares.

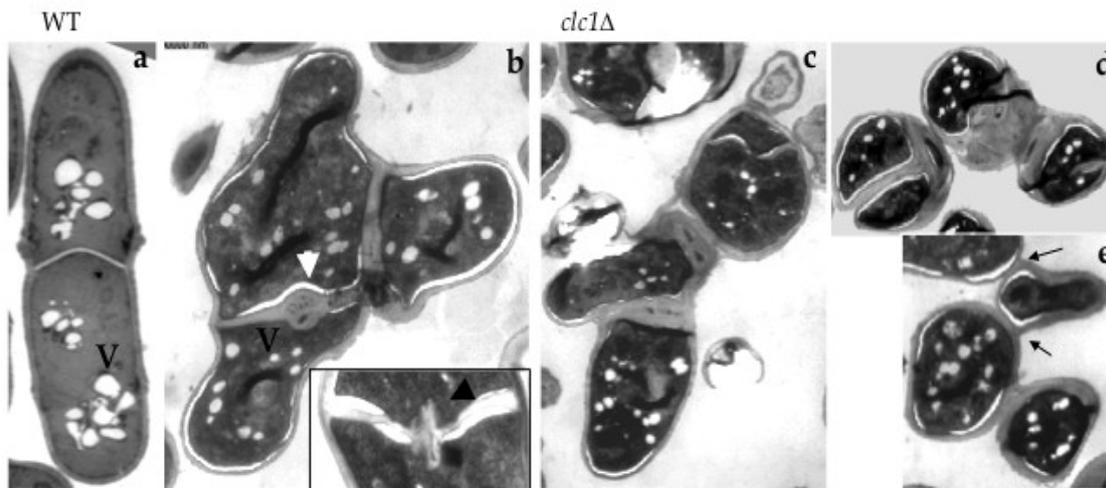


Figura 15. Microscopía electrónica de la estirpe *clc1Δ*. Fotografías de microscopía electrónica de células de una cepa silvestre y de *clc1Δ* incubadas en presencia de sorbitol en el medio. Se muestra una célula de la cepa silvestre (imagen **a**) y diferentes células del mutante nulo *clc1Δ* (imágenes **b-e**). Los triángulos en la imagen **b** señalan los septos que están engrosados en su región central; las flechas de la imagen **e** indican los restos de pared celular que permanecen unidos tras la división celular.

3.2.2. Composición de la pared celular en las células *clc1Δ*

Para caracterizar mejor el defecto en la síntesis de pared celular del mutante *clc1Δ* se analizó su composición y se comparó con la de una cepa silvestre. La **Figura 16A** muestra que la incorporación de glucosa marcada con ^{14}C en la pared celular, con respecto al total de ^{14}C incorporado, fue significativamente menor en la cepa *clc1Δ* que en la cepa control (36% en la cepa silvestre y 29% en el mutante). Así mismo, en esta gráfica se puede observar la proporción de cada uno de los polímeros que componen la pared celular. Se encontró una reducción significativa de $\beta(1,3)$ glucano en el mutante *clc1Δ* ($19\% \pm 2,0\%$ y $11,1 \pm 1,5\%$ para las cepas silvestre y mutante respectivamente); los niveles de α -glucano eran similares en ambas estirpes ($12,4 \pm 1,6\%$ y $11,7 \pm 1,4\%$ en cepas silvestre y *clc1Δ* respectivamente) y la cepa mutante presentaba mayor cantidad de manano que la cepa silvestre ($4,6 \pm 0,7\%$ y $7,1 \pm 0,9\%$ en la cepa silvestre y mutante respectivamente). Con estos datos se puede asumir que la composición de la pared en el mutante nulo de *clc1+* estaba alterada debido, principalmente, a defectos en la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano y manoproteínas.

3.2.3. Actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa en el mutante *clc1* Δ

Al cuantificar la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa *in vitro* se observó un descenso del 20% de la actividad en el mutante *clc1*⁺ con respecto a una cepa control (**Figura 16B**). Los defectos encontrados en la síntesis de β -glucano valorada *in vivo*, y en la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa medida *in vitro* eran más fuertes que los detectados en algunos mutantes de las enzimas $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1p/Cps1p y Bgs4p (Cortes *et al*, 2005; Ishiguro *et al*, 1997).

Posteriormente se analizó la distribución de las proteínas de fusión GFP-Bgs1, GFP-Bgs3 y GFP-Bgs4 en el mutante *clc1* Δ y en una estirpe silvestre para conocer si los defectos vistos en la síntesis del glucano en el mutante de *clc1*⁺ se debían a una localización aberrante de las enzimas encargadas de su síntesis. En la cepa control las tres enzimas se localizaban en las zonas de crecimiento activo de las células, tanto en los polos como en el ecuador celular, y en algunas vesículas dispersas por el citoplasma (**Figura 16C**, panel situado a la izquierda). En el caso del mutante *clc1* Δ ninguna de las tres se detectó en la superficie celular sino que tal y como se aprecia en el panel de la izquierda de la **Figura 16C**, GFP-Bgs1 y GFP-Bgs3 parecían localizarse en las vacuolas y GFP-Bgs4 en estructuras tubulares dispersas por el citoplasma. Mediante una tinción simultánea con el colorante lipofílico FM4-64 se confirmó que la fluorescencia asociada a Bgs1p y Bgs3p se localizaba en las vacuolas, mientras que la fluorescencia asociada a Bgs4p no coincidía ni con las vacuolas ni con endosomas (en el panel situado a la derecha en la **Figura 16C**, las flechas seguidas de una V señalan vacuolas).

En resumen, la ausencia de la proteína Clc1p alteraba el tráfico vesicular de las tres enzimas esenciales $\beta(1,3)$ glucán sintasa provocando graves defectos en la síntesis de la pared celular. Estos defectos junto con la distribución anómala del citoesqueleto de actina podrían contribuir en gran medida a la morfología aberrante de las células del mutante *clc1* Δ .

4. ANÁLISIS DEL TRÁFICO VESICULAR EN LAS CÉLULAS MUTANTES *clc1* Δ

El papel principal descrito para la clatrina es formar la envuelta de vesículas que participan en el proceso de endocitosis y en la distribución de proteínas desde la red trans-Golgi hacia los diferentes compartimentos celulares. Por ese motivo era relevante analizar cómo y en qué grado estaban afectados estos procesos en el mutante de delección *clc1* Δ . Los datos que se presentan a continuación muestran la situación general de los procesos de secreción y endocitosis en el mutante carente de la cadena ligera de la clatrina.

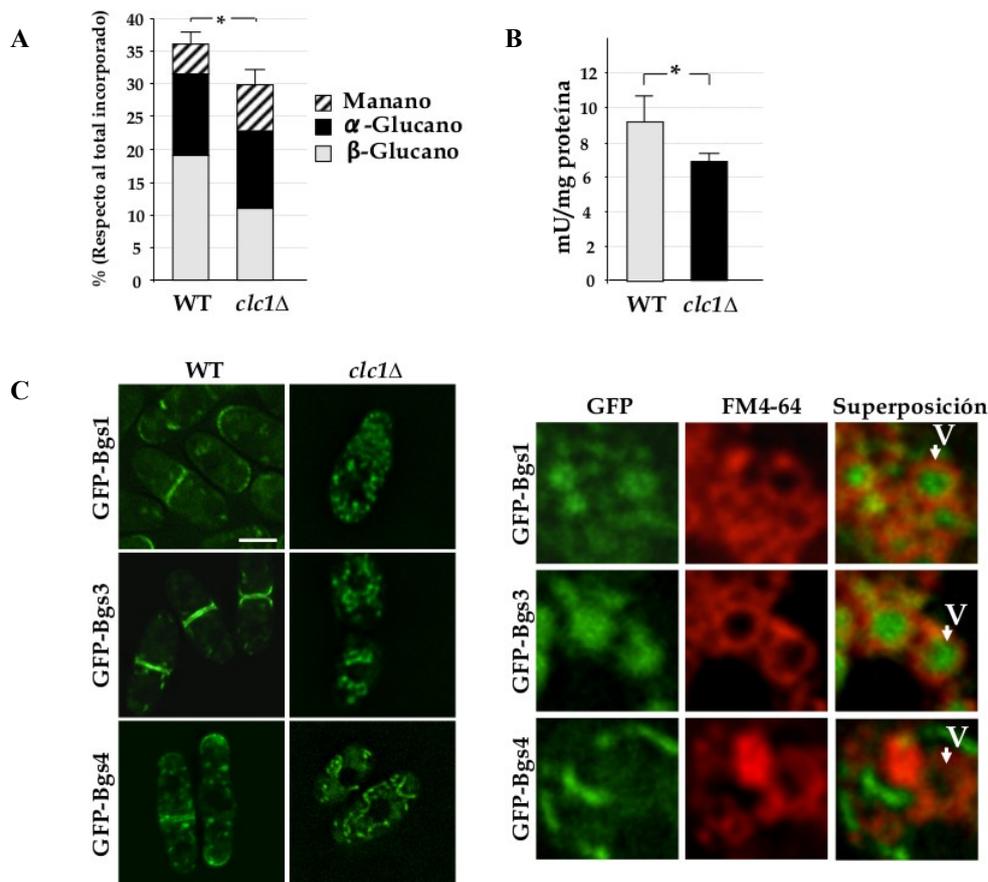


Figura 16. Las células *clc1Δ* muestran defectos en la síntesis de pared celular. A. Análisis de la pared celular de células de una cepa silvestre y del mutante *clc1Δ*. La gráfica representa el porcentaje de incorporación de radiactividad en los polisacáridos de la pared celular de cultivos celulares incubados en YES+sorbitol y en presencia de ^{14}C -glucosa. El experimento se realizó un mínimo de cinco veces con duplicados. Se muestra la desviación estándar y la significación estadística de la diferencia de la incorporación total de glucosa en la pared celular (*, $p < 0.05$. Test t-Student). B. Actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa *in vitro* de células silvestres y de *clc1Δ* incubadas en medio YES+sorbitol. El experimento se realizó un mínimo de 5 veces con duplicados. En la gráfica se muestran los valores medios, las desviaciones estándar y la significación estadística de la diferencia entre cepas (*, $p < 0.001$. Test t-Student). C. El panel situado a la izquierda muestra micrografías de fluorescencia (secciones medias) de la localización de las $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1p, Bgs3p, y Bgs4p en las cepas silvestre y *clc1Δ* cultivadas en YES+sorbitol. En el panel situado a la derecha se muestran las vacuolas en células *clc1Δ* marcadas con el colorante FM4-64. La letra V marca una vacuola. Las fotografías se adquirieron con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μm .

4.1. La ausencia de *clc1+* provoca defectos en el proceso de endocitosis

Para conocer si la ausencia de Clc1 afectaba a la endocitosis en *S. pombe* se analizó la toma de dos colorantes diferentes en una cepa silvestre y en la cepa mutante *clc1Δ*.

En primer lugar se empleó el colorante FM4-64, que es un compuesto orgánico, lipófilo y con propiedades fluorescentes, que permite observar el proceso endocítico *in vivo* desde su incorporación a la membrana plasmática hasta su llegada a la membrana vacuolar, pasando previamente por la ruta endosomal (Betz *et al*, 1992; Vida & Emr, 1995; Betz *et al*, 1996).

Para examinar la cinética del transporte de este colorante se siguió el protocolo descrito en la sección “Materiales y métodos”. Como se muestra en la **Figura 17A**, las células de *clc1Δ* incorporaban el FM4-64 a la membrana plasmática y lo introducían en la célula al igual que lo hacían las células de la cepa silvestre. Sin embargo, aunque el colorante llegaba hasta las vacuolas, su endocitosis parecía estar retrasada con respecto a la cepa silvestre, ya que cuando el colorante se detectaba en el interior de las células silvestres, en las del mutante de *clc1⁺* aún se observaba en la superficie celular (**Figura 17A**, comparar las cepas silvestre y mutante a los 10’ de haber realizado la tinción). Esta tinción también permitió observar que, en algunas ocasiones, en el mutante *clc1Δ* el colorante no marcaba la membrana vacuolar sino el lumen de estos orgánulos (**Figura 17A**, la flecha señala una vacuola).

Por otra parte se estudió la endocitosis de fase fluida mediante la tinción con Lucifer Yellow, que es un colorante impermeable a la membrana plasmática, soluble y de bajo peso molecular, que se toma por endocitosis y se almacena en el lumen vacuolar. Tras 90 minutos de incubación con el Lucifer Yellow se observó que la estirpe silvestre tenía teñidas las vacuolas, mientras que en el mutante *clc1Δ* no se apreciaba ninguna señal del colorante (**Figura 17B**). Con este dato se puede afirmar que la ausencia de la cadena ligera de la clatrina provoca alteraciones en la célula que bloquean la endocitosis de fase fluida, o al menos la reducen hasta niveles indetectables por microscopía.

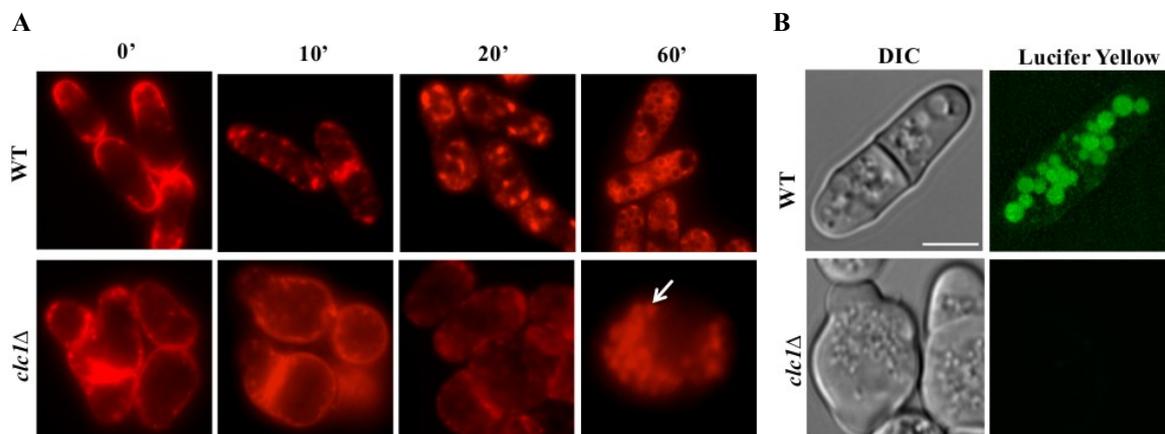


Figura 17. Análisis del proceso de endocitosis en el mutante *clc1Δ*. A. Micrografías de fluorescencia de células de las cepas indicadas teñidas con el colorante FM4-64 e incubadas a 32°C; las muestras se tomaron a los tiempos indicados (minutos desde el momento de la tinción). La flecha indica la señal del colorante en el interior de la vacuola. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. B. Células de las mismas estirpes que en A teñidas con el colorante Lucifer Yellow. Las imágenes son proyecciones máximas adquiridas con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μ m.

4.2. El mutante *clc1* Δ no presenta defectos aparentes en la secreción de fosfatasa ácida

Para analizar el proceso de exocitosis se valoró la secreción de la enzima fosfatasa ácida en el mutante *clc1* Δ y se comparó con la de una estirpe silvestre. Así mismo, se valoró la secreción de esta enzima en la cepa mutante *apm1* Δ , en la que se han descrito defectos en este proceso (Kita *et al*, 2004).

En *S. pombe* aproximadamente el 40% de la fosfatasa ácida producida es secretada al medio de cultivo por lo que esta proteína es un buen indicador de la función secretora (Wang *et al*, 2002). Inicialmente se valoró la cantidad de actividad secretada al medio de cultivo (ver “Materiales y métodos”). Como se puede observar en la gráfica situada a la izquierda en la **Figura 18**, la actividad fosfatasa detectada en los sobrenadantes de los cultivos correspondientes a los mutantes *clc1* Δ y *apm1* Δ era muy inferior a la cantidad detectada en los cultivos de la estirpe control en diferentes puntos de crecimiento, indicando un defecto drástico en este proceso. Se ha descrito que la invertasa y la fosfatasa ácida son dos enzimas secretadas casi al mismo nivel en las estirpes silvestres y en los mutantes *chc1* Δ de *S. cerevisiae* y *D. discoideum* (Payne & Schekman, 1985; Payne *et al*, 1987; Ruscetti *et al*, 1994), mientras que en el mutante *apm1* Δ de *S. pombe* la secreción de la fosfatasa ácida está muy reducida (Kita *et al*, 2004). La actividad fosfatasa ácida está altamente regulada y depende tanto de la composición del medio de cultivo como de las condiciones de crecimiento a las que están sometidas las células (Schweingruber *et al*, 1992; Miyata & Miyata, 1978). Por esta razón, una posible explicación para esta discrepancia en la secreción de fosfatasa ácida entre los diferentes organismos podría deberse a que en los primeros casos (*S. cerevisiae* y *D. discoideum*) las actividades se midieron tanto en las células como en los medios de cultivo, mientras que en el caso del mutante *apm1* Δ de *S. pombe* la actividad se cuantificó sólo en el medio de cultivo.

Conociendo esta información era posible que en los mutantes *clc1* Δ y *apm1* Δ de *S. pombe* que presentaban defectos de crecimiento, el bajo nivel de actividad detectado no se debiera simplemente a una menor tasa de secreción, sino a que también pudiese haber una menor síntesis de la enzima. Así pues, con el fin de estimar más correctamente la secreción de la actividad fosfatasa ácida en estas cepas, se procedió a valorar dicha actividad en el medio y en extractos celulares. Cuando se calculó la actividad secretada respecto al total de actividad producida (medio + extractos celulares), se observó que la cepa *clc1* Δ presentaba una secreción de la enzima similar a la de la cepa silvestre (**Figura 18**, gráfica de la derecha). Sorprendentemente, el mutante *apm1* Δ presentaba un nivel de secreción superior al del control. Estos resultados indicarían que el mutante *clc1* Δ , en principio, no presentaba defectos en la secreción de la fosfatasa ácida. No obstante, observando los datos de la cantidad de enzima procedente de los extractos celulares (**Figura 18**, gráfica central) se puede observar claramente cómo la producción de fosfatasa ácida estaba drásticamente disminuida en los mutantes de delección de *clc1*⁺ y *apm1*⁺.

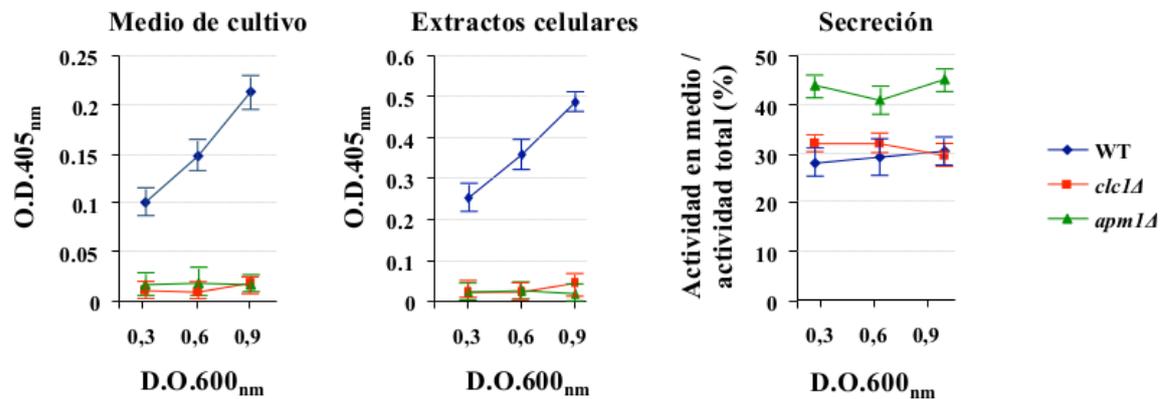


Figura 18. La secreción de la enzima fosfatasa ácida no está alterada en el mutante *clc1Δ*. La actividad fosfatásica de las estirpes señaladas se valoró en el medio de cultivo y en los extractos celulares tal y como se indica en la sección Materiales y métodos. Los valores se normalizaron por ml de cultivo. Las muestras se tomaron de cultivos celulares incubados en YES+sorbitol creciendo en fase logarítmica cuando cada cultivo alcanzó la D.O._{600nm} indicada. La gráfica de la izquierda muestra la actividad fosfatasa ácida valorada en el medio de cultivo. La gráfica central muestra la actividad fosfatasa ácida valorada en los extractos celulares. La gráfica de la derecha muestra el porcentaje de secreción de cada cepa. Para estimar el porcentaje de secreción se calculó el porcentaje de actividad en el medio con respecto al total de la actividad medida (actividad en el medio + actividad en los extractos celulares).

5. EL MUTANTE NULO DE LA CADENA LIGERA DE LA CLATRINA POSEE DIFERENTES DEFECTOS EN LAS VACUOLAS

En algunos de los experimentos que se han descrito anteriormente se pudo observar cómo las vacuolas de la estirpe mutante *clc1Δ* presentaban diferentes defectos. En el caso de la tinción con FM4-64 se vio que en algunas ocasiones el colorante no teñía solamente la membrana de la vacuola sino también el lumen (**Figura 17A**, la flecha señala una vacuola). También, mediante microscopía electrónica se observó que las células mutantes poseían mayor número de vacuolas que una cepa silvestre y que además éstas eran de menor tamaño (**Figura 15**, en la fotografía b la V indica una vacuola).

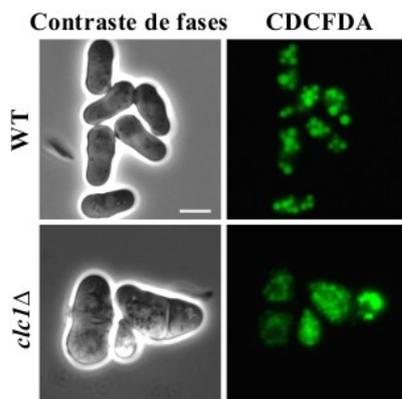


Figura 19. Las vacuolas del mutante *clc1Δ* presentan morfología aberrante. Tinción vacuolar con el colorante CDCFDA de células de la estirpe silvestre y del mutante nulo *clc1Δ* cultivados en YES+sorbitol. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

Para corroborar estos defectos se realizó una tinción con el colorante CDCFDA. Éste es un derivado del diacetato de fluoresceína (FDA) que se hidroliza a pH ácido, por lo que se libera en la vacuola tiñendo específicamente su lumen. Además, su entrada en las células es independiente de endocitosis, ya que se introduce mediante mecanismos de difusión pasiva a través de la membrana plasmática, lo cual no impediría, en principio, la tinción de las vacuolas del mutante *clc1Δ* (Gachet *et al*, 2005). Esta tinción confirmó que las vacuolas de la cepa mutante *clc1Δ* eran más numerosas y de menor tamaño que las de la cepa silvestre (Figura 19). Este fenotipo podría estar indicando que el mutante *clc1Δ* presentaba una fragmentación vacuolar al igual que la vista en otros mutantes con defectos en tráfico vesicular (O'Halloran & Anderson, 1992; Kita *et al*, 2004; Gachet *et al*, 2005; Ma *et al*, 2009).

6. EL MUTANTE DE DELECCIÓN *clc1Δ* PRESENTA IMPORTANTES DEFECTOS EN LOS PROCESOS DE CONJUGACIÓN Y ESPORULACIÓN

Teniendo en cuenta los graves defectos morfológicos de la cepa mutante *clc1Δ*, los problemas observados en el proceso de endocitosis, y el poco éxito con el que se conseguían realizar cruces unilaterales con esta estirpe era posible que *clc1Δ* tuviese algún tipo de problema en los procesos de diferenciación sexual. Por este motivo se analizó la eficiencia de conjugación y de esporulación en las cepas silvestre, *clc1Δ* y *end4Δ* (esta última se empleó como cepa control que posee defectos en endocitosis) (Iwaki *et al*, 2004). Para realizar estos experimentos se emplearon cepas homotéticas (*h⁹⁰*) de cada una de las estirpes a estudiar.

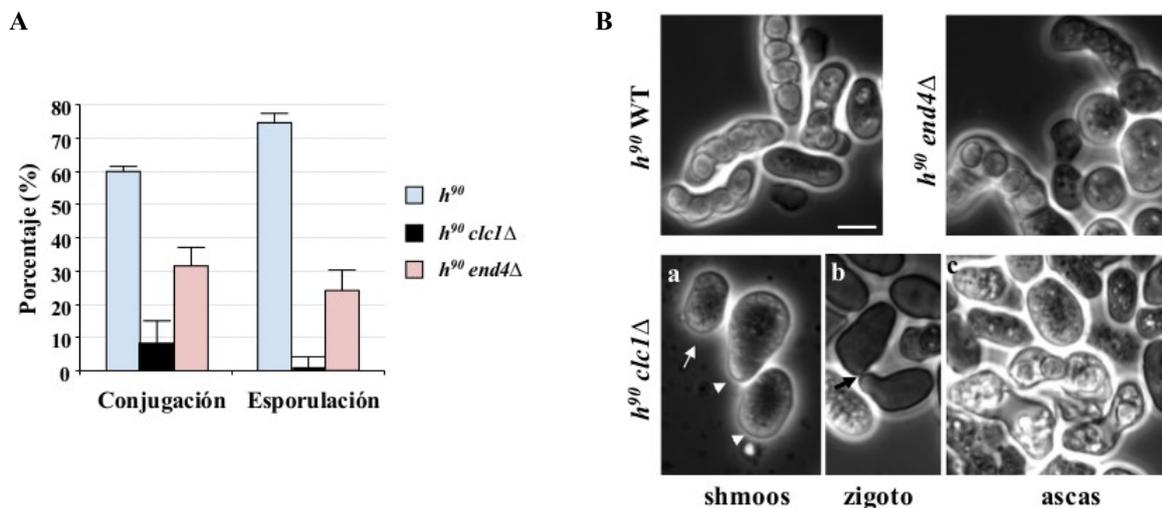


Figura 20. Las células *clc1Δ* tienen defectos en los procesos de conjugación y esporulación. A. Gráfica de la eficiencia de conjugación (número de zigotos + ascas / número de zigotos + ascas + células) y eficiencia de esporulación (número de ascas con cuatro esporas maduras / número de ascas + zigotos) de las cepas indicadas. B. Micrografías de contraste de fases de las cepas indicadas bajo condiciones de esporulación. a, b y c son fotografías de *clc1Δ* que muestran la morfología de los *shmoos* (a; los triángulos señalan *shmoos* con hipertrfia), zigotos sin fusionar (b; la flecha señala la región de contacto entre células) y ascas (c). Barra de escala, 5 μ m.

Como se muestra en la gráfica representada en la **Figura 20A**, el mutante *clc1Δ* presentaba una reducción en la eficiencia de conjugación con respecto a la cepa silvestre ya que sólo iniciaron este proceso el 9% de las células incubadas en YES+sorbitol a 28°C, mientras que los valores del control silvestre alcanzaron el 72%. En el caso del mutante *end4Δ* también se encontró defecto en conjugación aunque éste era menor que en el mutante *clc1Δ* ya que el 30% de la población fue capaz de iniciar la conjugación.

En cuanto a la eficiencia de esporulación el defecto fue mucho más drástico. Menos del 1% de los zigotos de la cepa mutante *clc1Δ* fueron capaces de formar ascas maduras con respecto al 78% que lo consiguieron en la cepa silvestre. En el mutante *end4Δ* el 25% de la población presentaba ascas maduras.

Estos defectos en las eficiencias de conjugación y esporulación estaban acompañados por una morfología aberrante tanto de los zigotos como de las esporas en las estirpes mutantes, lo que podría estar afectando a la correcta viabilidad de estos procesos. Las células de *clc1Δ* eran capaces de formar *shmoos*, aunque el tamaño que presentaban era anormalmente grande (**Figura 20B**, en la imagen **a** los triángulos señalan *shmoos*). También se apreció un considerable número de prezigotos (**Figura 20B**, en la imagen **b** la flecha señala el contacto entre dos células conjugando), algunos zigotos y ascas -aunque ninguna de éstas contenía cuatro ascosporas maduras- (**Figura 20B**, imagen **c**).

Con estos datos se puede asumir que la ausencia de Clc1p también provoca defectos en distintos procesos del ciclo sexual de *S. pombe*.

7. CONSTRUCCIÓN Y ESTUDIO DE UN MUTANTE CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p

Como se ha descrito en los apartados anteriores, el mutante *clc1Δ* poseía graves defectos. Las células tenían morfología aberrante, formaban agregados y crecían muy lentamente. Además, éstas presentaban severos defectos en conjugación y esporulación, y la eficiencia de transformación era extremadamente baja, posiblemente debido a los defectos observados en la pared celular y a la fragilidad de las células. Todo ello impedía analizar con detalle las funciones de Clc1p en *S. pombe*. Así mismo, el tener que realizar los experimentos en presencia del estabilizador osmótico sorbitol podía provocar estrés en las células (Rodríguez-Pena *et al*, 2008) y afectar al proceso de endocitosis, como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Aghamohammadzadeh & Ayscough, 2009; Prosser *et al*, 2011). Con el fin de evitar todos estos problemas se construyó una cepa en la que la cantidad de Clc1p pudiese ser regulada, de manera que su análisis permitiera identificar aquellos procesos celulares que fuesen más sensibles a la deficiencia de Clc1p. Para construir esta cepa se fusionó la ORF del gen *clc1+* al epítopo HA en la región N-terminal de la proteína y se expresó bajo el control de un promotor de expresión media *41Xnmt1+* reprimible por tiamina (ver “Materiales y métodos”).

Mediante Western blot se analizó el nivel de proteína que poseían las células incubadas en ausencia o presencia de la vitamina a diferentes tiempos. Como control se empleó una cepa en la que el alelo *HA-clc1⁺* estaba integrado en el genoma de *S. pombe* y se expresaba bajo el control de su propio promotor. Como se muestra en la **Figura 21A**, incluso en ausencia de tiamina, cuando el promotor no estaba reprimido, la cantidad de Clc1p en la cepa mutante estaba reducida a un 60% con respecto al control. Tras 3 horas de represión la cantidad de Clc1p era el 20% de la cepa control, y a partir de las 6 horas de haber añadido la tiamina al medio la cantidad de proteína era menor del 10%. Tras tiempos de represión largos (más de 12 horas en presencia de la vitamina), el mutante 41XHAclc1 sólo era viable si se incubaba en un medio de cultivo estabilizado osmóticamente, al igual que ocurría con el mutante *clc1Δ*.

7.1. El descenso en la cantidad de Clc1p afecta a la viabilidad celular

La supervivencia celular está ligada a la cantidad de Clc1p ya que la viabilidad del mutante 41XHAclc1 después de estar 3, 6 y 9 horas cultivado en presencia de tiamina fue del $86 \pm 6 \%$, $76 \pm 4 \%$, $63 \pm 5 \%$, y $48 \pm 6 \%$ respectivamente (datos mostrados en la parte inferior de la **Figura 21A**). Estos datos se obtuvieron cuantificando el número de colonias formadas en placas de YES+sorbitol con respecto a las células procedentes de cultivos de MM suplementados con tiamina durante diferentes tiempos (0, 3, 6 y 9 horas) que se sembraron en ellas. En cada caso se realizó el experimento plaqueando 600 células de cada condición de cultivo en tres placas diferentes de medio YES+sorbitol que se incubaron a 28°C durante 4-5 días. Este experimento se realizó tres veces por triplicado de manera independiente.

7.2. Clc1p es necesaria para la estabilidad de Chc1p

Para analizar cómo se veía afectada la cadena pesada de la clatrina por la reducción del nivel de Clc1p en las células se realizó un análisis de Western blot que permitió detectar la proteína de fusión Chc1-GFP en una cepa silvestre y en el mutante 41XHAclc1 durante los diferentes tiempos de represión del gen *clc1⁺*. Tal y como se muestra en la **Figura 21B**, la proteína Chc1-GFP se detectó como una serie de bandas tanto en la cepa mutante como en la silvestre. En esta misma figura se puede apreciar cómo en ausencia de tiamina (condición en la que la cantidad de Clc1p está reducida en un 40%), la cantidad de Chc1p es inferior a la del silvestre. Además tras los diferentes tiempos de represión del gen *clc1⁺* la cantidad de proteína Chc1p seguía disminuyendo a medida que lo hacía la cantidad de Clc1p (cuantificación mostrada en la parte inferior de la **Figura 21B**). Estos resultados indicaban que Clc1p era necesaria para la estabilidad de Chc1p, y apoyaba la idea de que los fenotipos encontrados en el mutante 41XHAclc1 se debían a defectos en clatrina y no a alteraciones producidas por funciones específicas de Clc1p, independientes de su función en la formación de la cubierta proteica de vesículas.

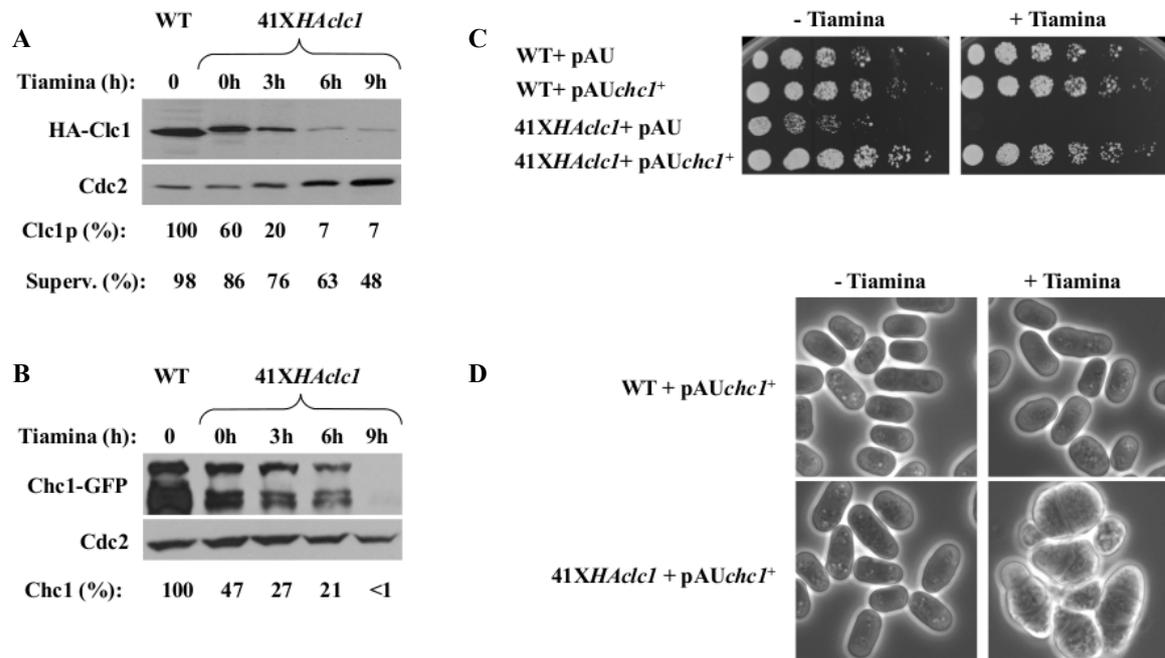


Figura 21. Caracterización de la clatrina en el mutante 41XHAclc1. A. Western blot de extractos celulares de células que portan el gen *clc1*⁺ fusionado al epítipo HA bajo el control de su promotor nativo o del promotor 41X*nmt1*⁺. Los cultivos se incubaron en ausencia de tiamina (condiciones que permiten la expresión del gen *clc1*⁺) o en presencia de esta vitamina (condiciones de represión) durante las horas indicadas (h). La cantidad de Clc1p se calculó considerando que la cantidad de proteína producida por el gen *clc1*⁺ bajo el control de su propio promotor (cepa WT) era el 100%. Como control de carga se empleó la proteína Cdc2p. En la parte inferior del panel se indica el porcentaje de supervivencia de las células que tienen distintos niveles de clatrina. Los datos mostrados corresponden a las medias de los valores obtenidos. B. El mismo experimento que en A pero en este caso las células portaban la proteína de fusión Chc1-GFP. C. Ensayo de crecimiento en el que 3x10⁴ células y diluciones seriadas 1:4 de las estirpes indicadas se inocularon en medio mínimo sin uracilo, sin y con tiamina, y se incubaron durante tres días a 28°C. D. Micrografías de contraste de fases de células de las estirpes y en las condiciones indicadas (sin tiamina y con tiamina 12 horas). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio convencional.

7.3. La sobreexpresión de *chc1*⁺ complementa parcialmente los defectos de crecimiento del mutante 41XHAclc1

Para confirmar la hipótesis de que los defectos observados en los mutantes con una cantidad reducida de Clc1p se debían a una menor cantidad de clatrina se transformaron las cepas silvestre y 41XHAclc1 con el plásmido multicopia pAU y con este mismo vector portando el gen *chc1*⁺. Esto se realizó con el fin de analizar si la sobreexpresión del gen *chc1*⁺ era capaz de suprimir los defectos causados por la disminución de Clc1p. Cuando se realizó un ensayo de crecimiento en el que las células se incubaron en placas de MM sin tiamina o en placas de MM suplementado con la vitamina durante 48 horas, el plásmido multicopia que portaba el gen *chc1*⁺ suprimía los defectos de crecimiento que presentaba el mutante 41XHAclc1 en ambas condiciones (**Figura 21C**). Al analizar la morfología de las células del mutante 41XHAclc1 que portaban el plásmido pAU+*chc1*⁺, procedentes de cultivos líquidos

de MM incubados en ausencia de tiamina (la expresión de *clc1⁺* no está reprimida) o presencia de ésta durante 12 horas (condición en la que la expresión del gen *clc1⁺* está reprimida), se pudo observar que en ausencia de la vitamina las células de la estirpe mutante tenían un aspecto muy similar a las de la cepa control (fotografías situadas en la parte inferior izquierda de la **Figura 21D**). Sin embargo, las células que habían sido incubadas durante 12 horas en presencia de tiamina poseían una morfología totalmente aberrante, muy similar a la del mutante de delección *clc1Δ* (fotografías situadas en la parte inferior derecha de la **Figura 21D**).

Con estos datos se asumió que un incremento en la cantidad de Chc1p era capaz de suprimir ciertos fenotipos provocados por una reducción del 40% de la cantidad de Clc1p en la célula. Sin embargo, cuando la cantidad de la proteína Clc1p era prácticamente nula, Chc1p no era completamente funcional ya que no podía por sí misma suprimir los defectos causados por la ausencia de Clc1p. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en *S. cerevisiae* donde Clc1p es necesaria para la completa funcionalidad de la clatrina y donde *CHC1* sólo es capaz de suprimir alguno de los fenotipos del mutante *clc1Δ* (Chu *et al*, 1996; Huang *et al*, 1997).

7.4. La estabilización osmótica del medio no corrige los defectos en la cantidad ni afecta a la distribución de la clatrina en el mutante 41XHAcl1

Era posible que la supresión de la letalidad de las células carentes de *clc1⁺* por parte del sorbitol se debiese a un incremento en la cantidad de Chc1p causada por la estabilización osmótica del medio. Un análisis de Western blot mostró que la cantidad de Chc1-GFP disminuía en la cepa 41XHAcl1 al añadir tiamina al medio (crecimiento con la vitamina durante 12 horas) tanto al incubar las células en medio mínimo como en medio mínimo con sorbitol (**Figura 22A**). En cuanto a la localización de esta proteína, en una cepa silvestre Chc1-GFP se observaba como una serie puntos intracelulares tanto si estaba creciendo en presencia o en ausencia de sorbitol (fotografías situadas a la izquierda en la **Figura 22B**). Esta localización era similar en el mutante 41XHAcl1 en condiciones en las que el gen *clc1⁺* se estaba expresando, aunque los puntos parecían ser más pequeños que los observados en la cepa control, hecho que estaba de acuerdo con una reducción en la cantidad de Chc1p en la cepa mutante. Como se muestra en la **Figura 22B**, la presencia de sorbitol en el medio de cultivo tampoco parecía producir ninguna alteración en la distribución de Chc1-GFP en el mutante 41XHAcl1. Con estos datos se pudo determinar que la adición de sorbitol al medio de cultivo no parecía incrementar la cantidad de las proteínas HA-Clc1 y Chc1-GFP ni en la cepa silvestre ni en el mutante 41XHAcl1, y tampoco parecía afectar a la distribución de la proteína Chc1p en ninguna de las estirpes.

El hecho de que las células del mutante *41XHAcl1*, incubadas en condiciones en las que el gen *clc1+* no estaba reprimido, fuesen parcialmente deficientes en clatrina permitiría la comparación de sus fenotipos con los observados en una cepa control, y además ayudaría a detectar los procesos y/o elementos celulares más dependientes del tráfico vesicular mediado por clatrina. Por otra parte, el crecimiento del mutante *41XHAcl1* en presencia de tiamina durante diferentes tiempos (condiciones de represión de *clc1+*) permitiría estudiar cómo la disminución de la cantidad de Clc1p iba afectando a los diferentes procesos y elementos celulares.

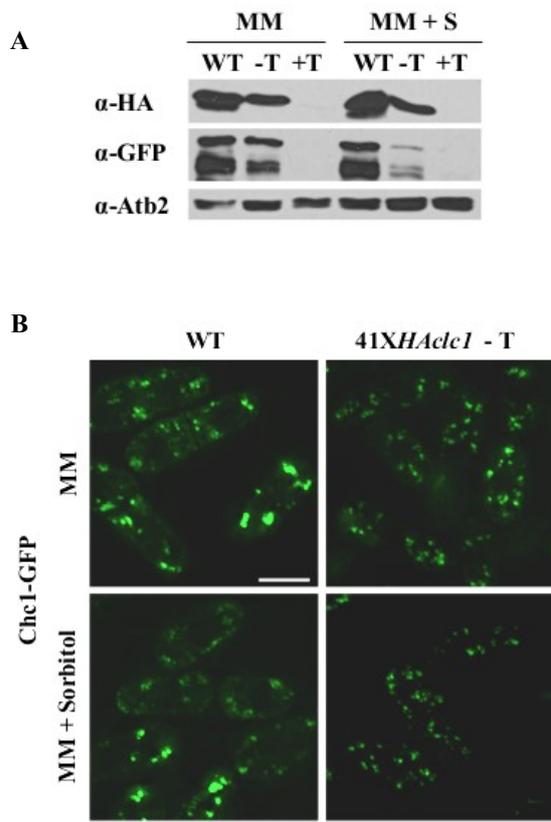


Figura 22. Los defectos del mutante *41XHAcl1* no se corrigen por la presencia de sorbitol en el medio. A. Western blot de extractos celulares de una cepa silvestre y del mutante *41XHAcl1* que portan las proteínas de fusión HA-Clc1 y Chc1-GFP. Las células se incubaron en medio mínimo con o sin sorbitol; la estirpe mutante se cultivó en ausencia (- T) y en presencia (+ T) de la vitamina durante 12 horas. La α -tubulina (Atb2) se empleó como control de carga. B. Micrografías de fluorescencia de células silvestres y del mutante *41XHAcl1* que portan la proteína de fusión Chc1-GFP, incubadas en medio mínimo o medio mínimo con sorbitol en ausencia de tiamina. Las imágenes corresponden a proyecciones máximas de planos adquiridos con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μ m.

En los experimentos que se describen a continuación, los diferentes fenotipos se analizaron empleando una cepa control, donde el gen *clc1+* se encontraba bajo el control de su propio promotor, y la cepa mutante *41XHAcl1* incubada en ausencia de tiamina (leve reducción en la cantidad de Clc1p) y/o en presencia de la vitamina a diferentes tiempos (3, 6, 9, 12, 15 horas), donde la reducción de Clc1p era más drástica a medida que aumentaba el tiempo de represión. En cada uno de los experimentos detallados se muestran solamente aquellos tiempos en los que se encontraron diferencias significativas con sus respectivas cepas control para facilitar la lectura y comprensión de cada sección.

8. MORFOLOGÍA CELULAR DEL MUTANTE CON NIVELES REDUCIDOS DE CLATRINA

Al observar mediante microscopía de contraste de fases las células del mutante 41XHA*clc1* en condiciones en las que la expresión del gen *clc1*⁺ no estaba reprimido, se vio que aproximadamente el 15% de estas células poseían morfología aberrante, con los polos y/o regiones centrales abombadas (**Figura 23A**). A las 6 horas de represión, el 23% del total de las células analizadas presentaban estos fenotipos y tras 15 horas en presencia de tiamina, aproximadamente el 75-80% de ellas tenían morfología aberrante. Este fenotipo era un claro indicador de un patrón de crecimiento anormal y/o de una pared celular debilitada.

Adicionalmente, mediante una tinción con el colorante Hoechst 33258, se observó que un pequeño porcentaje de células mutantes incubadas en condiciones en las que el gen *clc1*⁺ no estaba reprimido (4%) poseían un engrosamiento en la región central de sus septos ya cerrados (panel situado en la parte superior izquierda de la **Figura 23B**). Este fenotipo comenzó a hacerse más patente a partir de las 6 horas de represión, cuando ya el 35% de la población poseía engrosamientos en la región central del septo de división (**Figura 23B**, en la gráfica situada a la derecha se muestra la cuantificación de células con septos aberrantes en las diferentes estirpes y condiciones estudiadas). Estos engrosamientos eran un rasgo característico de las células mutantes, ya que a partir de las 9 horas de represión más del 80% de la población mostraba este fenotipo.

Como se ha mostrado en apartados anteriores, la aparición de engrosamientos en la región central de los septos ya cerrados también era un fenotipo característico del mutante *clc1* Δ (**Figura 15**, célula mostrada en la imagen **b**). Al observar estas estructuras en el mutante condicional 41XHA*clc1* mediante microscopía electrónica de transmisión se pudo ver que la región central del septo estaba engrosada y tenía una estructura aberrante que parecía estar formada por la acumulación de pared celular (**Figura 23B**, panel inferior izquierdo), al igual que parecía ocurrir en el mutante nulo *clc1* Δ (**Figura 15**, panel inferior de la imagen **b**).

9. ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR EN LAS CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p

9.1. Composición de la pared celular

Para caracterizar en más detalle el proceso de síntesis de la pared celular en las células que poseían niveles reducidos de clatrina, se analizó la composición de esta estructura en una cepa silvestre y en la cepa mutante 41XHA*clc1* incubada en ausencia de tiamina (condición en las que la expresión del gen *clc1*⁺ no está reprimida). En la cepa mutante la incorporación de glucosa marcada radiactivamente a los polímeros de la pared estaba reducida

hasta un 64% con respecto al valor obtenido en la cepa silvestre (Figura 23C). Esta reducción afectaba a los tres polímeros por igual ya que los valores porcentuales obtenidos para las cepas silvestre y mutante respectivamente, fueron: $\beta(1,3)$ glucano $21,2 \pm 2,1\%$ y $14,1 \pm 1,8\%$; α -glucano $12,4 \pm 1,6\%$ y $7,7 \pm 0,6\%$; manano $8,7 \pm 1,9\%$ y $4,7 \pm 0,6\%$.

Como se ha indicado en secciones anteriores, el mutante nulo *clc1* Δ también mostraba reducción de alguno de los polímeros de la pared celular. Los datos obtenidos al analizar el mutante nulo y el mutante condicional no se pueden comparar directamente ya que los experimentos se realizaron empleando medios de cultivo diferentes (medio mínimo en el caso del mutante 41XHA*clc1* y YES+sorbitol cuando se analizó *clc1* Δ).

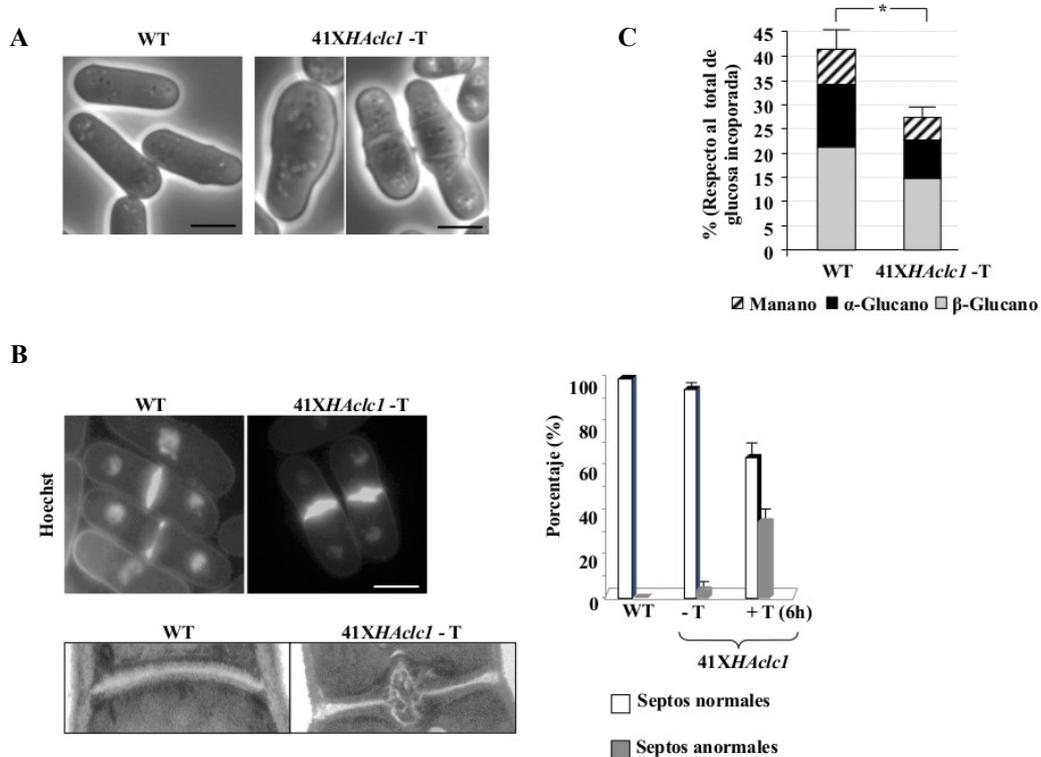


Figura 23. La morfología celular y la síntesis de la pared celular están alteradas en las células 41XHA*clc1*. A. Microscopía de contraste de fases de células silvestres y células del mutante condicional 41XHA*clc1* incubadas en ausencia de tiamina (condiciones que permiten la expresión del gen *clc1*⁺). Las imágenes se adquirieron con un microscopio óptico convencional. Barra de escala, 5 μ m. B. Panel superior izquierdo, tinción con Hoechst 33258 de células del control y del mutante 41XHA*clc1* cultivadas en ausencia de tiamina. Gráfica situada a la derecha, cuantificación de septos normales y anormales en células silvestres y mutantes incubadas en ausencia y presencia de tiamina durante 6 horas; se cuantificaron un mínimo de 100 septos en cada uno de los tres experimentos independientes que se realizaron. Panel inferior, microscopía electrónica de los septos de las estirpes anteriormente mencionadas. C. Análisis de la composición de la pared celular de una cepa silvestre y del mutante 41XHA*clc1* en condiciones en las que el gen *clc1*⁺ se está expresando. La gráfica representa el porcentaje de incorporación de radiactividad en los polisacáridos de la pared celular en cultivos incubados en ausencia de tiamina y presencia de ¹⁴C-glucosa. El experimento se realizó cinco veces con duplicados. Se indican la desviación estándar y la significación estadística de la incorporación total en la pared celular (*, p<0.01. Test t-Student).

9.2. Valoración de la actividad β -glucán sintasa *in vitro*

Para obtener más información sobre la naturaleza de la regulación de la síntesis de la pared celular por mecanismos de transporte dependientes de clatrina se analizó el efecto que tenía la alteración en la exocitosis y/o endocitosis en la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa medida *in vitro*. Para ello se comparó esta actividad en el mutante 41XHA*clc1* incubado en condiciones en las que la expresión del gen *clc1*⁺ no estaba reprimida y en las que había sido reprimida durante 6 horas, con la de una cepa silvestre, la del mutante *apm1* Δ defectivo en exocitosis (Kita *et al*, 2004), y la del mutante de endocitosis *end4* Δ (Iwaki *et al*, 2004). Este experimento se realizó cinco veces con duplicados; en todos los experimentos la tendencia de los valores obtenidos fue la misma.

La media del valor de la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa obtenida para el mutante 41XHA*clc1* cultivado en ausencia de tiamina fue del 66% con respecto a la cepa control y disminuyó hasta el 59% cuando las células se incubaron durante 6 horas en condiciones de represión. En el mutante *apm1* Δ la actividad detectada fue del 56% con respecto al control, y el mutante *end4* Δ poseía una actividad media del 170% con respecto a la estirpe silvestre (Figura 24A).

Estos datos mostraban que el nivel de actividad del mutante condicional de *clc1*⁺ era más parecido al obtenido para el mutante que tiene alterado el transporte entre el Golgi y los endosomas y por lo tanto tiene problemas en secreción, que para el mutante defectivo en el proceso de endocitosis. Los resultados obtenidos podrían estar indicando que el mutante condicional de *clc1*⁺ poseía problemas en el transporte de las enzimas encargadas de la síntesis del β -glucano hacia la membrana plasmática.

9.3. Distribución de las enzimas β -glucán sintasa

Bgs1p es la $\beta(1,3)$ glucán sintasa responsable de la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano lineal, que se detecta con Calcofluor White en el septo de división y en los polos (Cortes *et al*, 2007), y Bgs4p está descrita como la $\beta(1,3)$ glucán sintasa responsable de la mayoría de la actividad detectada *in vitro* (Ishiguro *et al*, 1997; Cortes *et al*, 2005).

De acuerdo con esta información se analizó la distribución de estas proteínas tanto en la cepa control como en la cepa mutante 41XHA*clc1* en distintas condiciones de expresión del gen *clc1*⁺. Para ambas enzimas la señal en los polos era más débil en la cepa mutante incubada en ausencia de tiamina que en la cepa control. Cuando el mutante condicional se cultivó en condiciones de represión durante 6 horas, la señal de las enzimas Bgs era prácticamente inexistente en los polos celulares (Figura 24B). No obstante, en el mutante condicional 41XHA*clc1* la señal interna de GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4 era mayor que en la estirpe silvestre, localizándose principalmente en las vacuolas. Estos resultados sugerían que las enzimas Bgs1p y Bgs4p se deslocalizaban cuando había una reducción del nivel de clatrina en las

células. Este mismo ensayo se realizó para analizar la localización de la enzima GFP-Bgs3 y se observó que ésta se distribuía por la célula del mismo modo que las otras dos β -glucán sintasa estudiadas (resultado no mostrado).

Recientemente se ha descrito que en el mutante *apm1* Δ hay una reducción de la enzima Bgs1p en los polos celulares apoyando la idea de que defectos en la exocitosis mediada por clatrina disminuyen la secreción de las enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular (Yu *et al*, 2012).

Otro resultado que apoyaba la idea de que la clatrina está implicada en el transporte de las enzimas Bgs es que mediante un análisis de fluorescencia pudimos observar cómo Clc1-GFP co-localizaba con la proteína de fusión To-Bgs1 en vesículas intracelulares (Figura 24C).

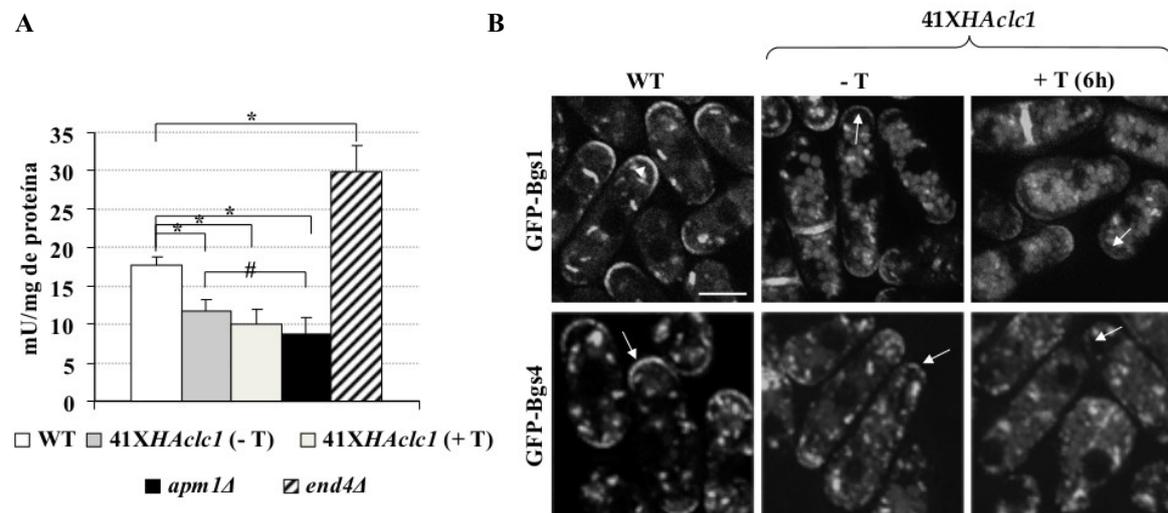


Figura 24. La actividad y la localización de las β -glucán sintasa se alteran por el descenso de clatrina en las células. A. Actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa de las estirpes indicadas medida *in vitro*. Las células se incubaron en medio mínimo sin tiamina, excepto la muestra 41XHAcl1 (+T) que se incubó con la vitamina durante 6 horas. El experimento se realizó 5 veces con duplicados; se representan los valores medios, las desviaciones estándar y la significación estadística (*; $p < 0,0001$. #; $p < 0,01$. Test t-Student, confirmado con el test Wilcoxon-Mann-Whitney) B. Distribución de las proteínas de fusión GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4 en células de una cepa silvestre y del mutante 41XHAcl1 incubadas en ausencia o en presencia de tiamina durante 6 horas. Las flechas señalan los polos celulares. Las imágenes son proyecciones máximas de planos adquiridos en series z con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μ m. C. Co-localización entre las proteínas Clc1-GFP y RFP-Bgs1. Los triángulos marcan estructuras de Golgi/endosomas donde la fluorescencia de ambas proteínas co-localiza.

9.4. El transporte de las enzimas $\beta(1,3)$ glucán sintasa hacia la membrana está alterado en el mutante *41XHAcl1*

Para confirmar la hipótesis de que la secreción de las enzimas Bgs podría estar reducida en el mutante *41XHAcl1* se realizaron experimentos de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) para comprobar si el recambio de las enzimas β -glucán sintasa en la membrana de la región de los polos se producía eficientemente. En estos experimentos se fotoblanquearon los polos de células de las estirpes silvestre y mutante *41XHAcl1*, que se habían incubado en medio mínimo sin tiamina y que portaban las proteínas de fusión GFP-Bgs1 o GFP-Bgs4. Una vez realizado el “blanqueo” de los polos se midió el tiempo medio de recuperación de la fluorescencia de cada una de las proteínas en la superficie celular. En la cepa silvestre la fluorescencia de GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4 se recuperó con un tiempo medio ($t_{1/2}$) de 81 y 73 segundos respectivamente. En la cepa mutante, sin embargo, se recuperó algo de fluorescencia en la región citoplasmática que había sido fotoblanqueada pero no hubo recuperación de ésta en la superficie de los polos celulares incluso 300 segundos después de haber realizado blanqueamiento. Estos resultados se muestran en las gráficas de la **Figura 25A** donde se puede observar la tasa de recuperación de las proteínas en ambas estirpes. En la parte superior de la **Figura 25A** también se pueden ver dos ejemplos de las fotografías obtenidas en estos experimentos. Estos resultados mostraban un recambio lento o incluso inexistente de las enzimas Bgs en los polos celulares de la cepa mutante, lo que indicaba un transporte defectuoso de estas proteínas hacia la superficie celular.

9.5. La secreción de la endo- $\beta(1,3)$ glucanasa Eng1p está alterada en el mutante que posee una cantidad reducida de clatrina

También se investigó si la regulación de la síntesis de la pared celular a través de la clatrina estaba limitada al control de las $\beta(1,3)$ glucán sintasa o afectaba a otras enzimas relacionadas con esta estructura. Para abordar esta cuestión se analizó el efecto que provocaba la disminución de la cantidad de clatrina en la secreción de la endo- $\beta(1,3)$ glucanasa Eng1p, que es necesaria para la separación celular. Eng1p se sintetiza en el citoplasma y necesita ser secretada para degradar el septo desde el exterior de la célula (Martin-Cuadrado *et al*, 2003). Mediante un ensayo de Western blot se pudo determinar que en la estirpe utilizada como control la proteína Eng1p sólo se detectaba en la fracción correspondiente al medio de cultivo. Sin embargo, en el mutante condicional *41XHAcl1* (en condiciones en las que la expresión del gen *clc1⁺* no estaba reprimida o en las que se reprimió durante 6 horas) se encontró señal de la endoglucanasa tanto en la fracción correspondiente al medio de cultivo como en la citosólica (**Figura 25B**). La presencia de proteína en el medio no era debida, en ninguno de los casos, a que hubiese lisis celular según se determinó por tinción con el colorante azul de metileno (dato no mostrado). Este resultado demuestra que cuando la cantidad de clatrina está reducida la proporción de Eng1p secretada también lo está.

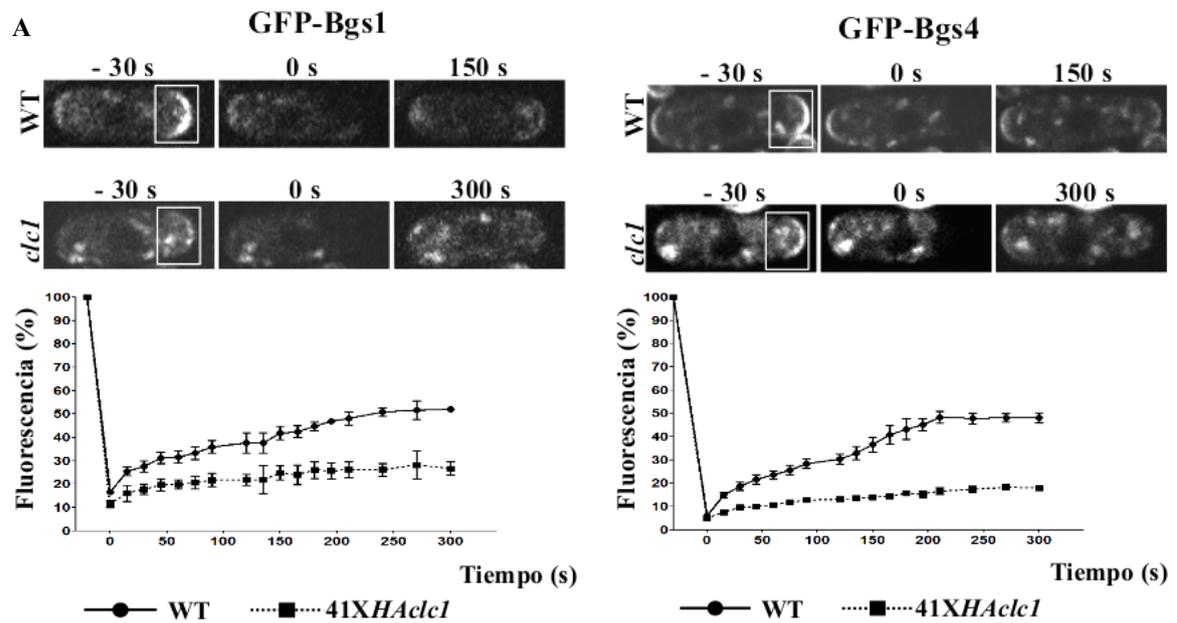


Figura 25. La secreción de enzimas necesarias para la síntesis de pared celular en el mutante *41XHAc1l* es defectuosa. A. Experimento de FRAP donde células de las estirpes indicadas portan las proteínas de fusión GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4. Las células fueron fotoblanqueadas en las regiones acotadas por el cuadro blanco (tiempo 0) y posteriormente se tomaron imágenes a lo largo del tiempo (se muestran algunos ejemplos en los paneles superiores). En los paneles inferiores se muestra la cuantificación de la recuperación de la intensidad de la fluorescencia (porcentaje respecto al valor inicial para cada cepa). Cada punto representa el valor medio de un mínimo de siete células obtenidas en cada uno de los tres experimentos realizados. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. B. Western blot de Eng1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante *41XHAc1l* incubado en ausencia o presencia de tiamina durante seis horas. La cantidad de proteína procedente del medio de cultivo o del citosol celular procede del mismo volumen de cultivo original de modo que puede ser comparada directamente. En las muestras correspondientes al citosol la proteína Cdc2p se utilizó como control de carga.

En resumen, una reducción del 40% en la cantidad de Clc1p (cantidad estimada en el mutante condicional cultivado en ausencia de tiamina) tenía un efecto significativo sobre la composición de la pared celular de *S. pombe*. El defecto producido parecía deberse principalmente a una secreción defectuosa de las enzimas necesarias para la síntesis y la remodelación de esta estructura esencial.

10. ANÁLISIS DE LOS CITOESQUELETOS DE ACTINA Y TUBULINA EN CÉLULAS CON UNA CANTIDAD REDUCIDA DE Clc1p

Previamente se había observado que el mutante nulo de *clc1*⁺ poseía serios problemas en la distribución de los parches de actina. Como se ha comentado, probablemente los defectos relacionados con el citoesqueleto de actina podrían ser los causantes de los defectos morfológicos en las células *clc1Δ*. Por este motivo, se quiso analizar cómo el descenso en la cantidad de Clc1p afectaba a los citoesqueletos de actina y tubulina.

10.1. Cuantificación y distribución de los parches de actina

El análisis del citoesqueleto de actina se realizó inicialmente sobre células fijadas y teñidas con rodamina-faloidina. En la cepa mutante 41XHA*clc1* se observó que tanto el número como la distribución de los parches de actina estaban alterados. Como se puede ver en la **Figura 26A**, cuando se cuantificó el número de parches por célula (en un mínimo de 500 células de cada estirpe y condición de expresión de *clc1*⁺) se encontró que en la cepa silvestre las células tenían entre 21 y 35 parches, siendo el rango entre 26 y 30 parches el valor más abundante. En el caso del mutante 41XHA*clc1* incubado en condiciones en las que *clc1*⁺ no estaba reprimido (sin tiamina en el medio; 0 horas), el número de parches por célula era significativamente menor; el 63% de las células tenían menos de 21 parches, el 12,5% tenían un máximo de 10 parches y ninguna de las células analizadas tenían más de 30 parches. Tras 3 horas de represión del gen *clc1*⁺, sólo el 19% de las células tenían más de 20 parches de actina y en las restantes la mayoría de ellas presentaban entre 11 y 15 parches; después de 6 horas en presencia de tiamina, el 97% de las células presentaban un máximo de 15 parches y el 41% de éstas solamente de 0 a 5 parches por célula.

Con respecto a la distribución de los parches de actina en las células, en la cepa silvestre estas estructuras se localizaban en las zonas de crecimiento activo, tanto en los polos celulares como en la zona del septo. En el mutante 41XHA*clc1* incubado en ausencia de tiamina el 9,5% de las células tenían los parches dispersos (no polarizados) y el 1% no poseía parche alguno. Esta distribución no parecía variar tras 3 horas de represión del gen *clc1*⁺. No obstante, a partir de las 6 horas de represión se observó una modificación significativa en la distribución de los parches de actina; el 34% de la población celular tenía parches dispersos, el 13% de las células no poseían parches y el 1,2% presentaba grandes acúmulos de actina (**Figura 26B**).

Estos datos indicaban que el descenso de Clc1p afectaba directamente al número de parches formados y que la disminución en la cantidad de clatrina y en el número de parches era proporcional. Además, la ausencia de Clc1p provocaba defectos notables en la distribución de los parches haciendo que en muchos casos se perdiese la polarización de los mismos.

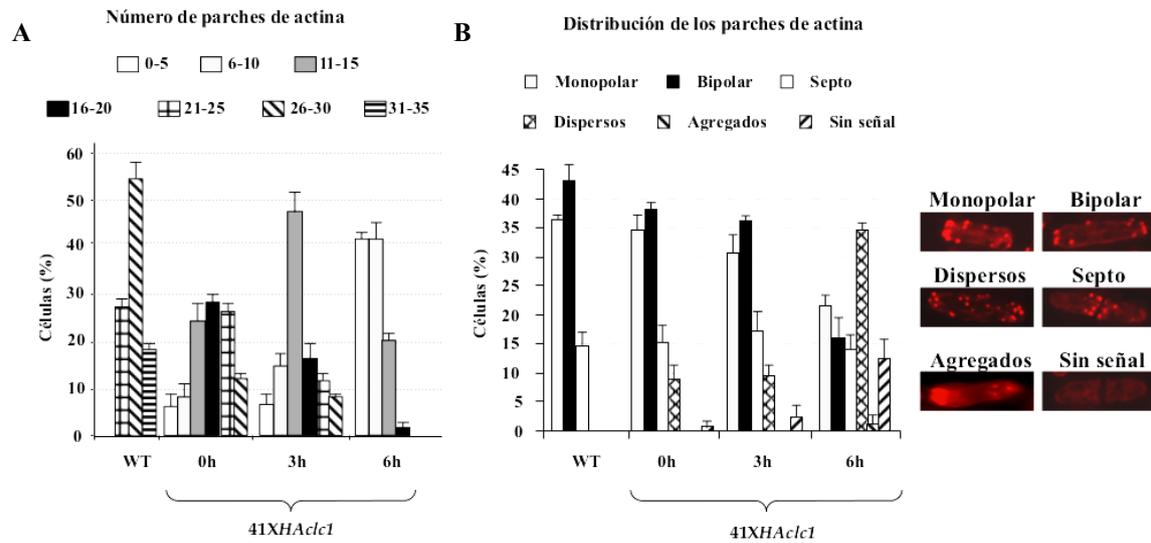


Figura 26. Defectos en los parches de actina producidos por la disminución de clatrina. A. Cuantificación del número de células con diferente número de parches de actina por célula con respecto al total de células en las estirpes y condiciones indicadas. B. Cuantificación del número de células con distinto patrón de distribución de los parches de actina con respecto al número total de células. Panel derecho, micrografías mostrando los diferentes patrones de distribución que se han cuantificado; las células se tiñeron con rodamina-faloïdina. Los experimentos se realizaron tres veces; se cuantificaron un mínimo de 500 células en cada uno de ellos.

En este contexto también se analizó la distribución de la proteína de fusión Arc5-GFP. Arc5p es un componente del complejo Arp2/3, necesario para la correcta movilidad e integridad de los parches de actina (Nolen & Pollard, 2008). Tanto en las células de la cepa silvestre como en las del mutante 41XHAcl1 se observó esta proteína como múltiples puntos fluorescentes, próximos a las zonas activas de endocitosis. Sin embargo, en la cepa mutante parecía que había un menor número de puntos por célula (panel situado a la izquierda en la **Figura 27A**). En estas células también se observaron acumulaciones de puntos fluorescentes cerca de la superficie celular; estos focos de puntos eran más frecuentes en la cepa mutante que en la cepa silvestre (regiones indicadas con flechas en el panel situado a la derecha en la **Figura 27A**). Estos fenotipos se encontraron en la estirpe mutante en todos los tiempos de represión estudiados (desde 0 hasta 9 horas). A través de un análisis de Western blot se pudo ver que no existían diferencias significativas entre la cantidad total de esta proteína en una estirpe silvestre y en la estirpe mutante analizada a diferentes tiempos de represión (**Figura 27B**).

Todos estos datos indicaban que un nivel reducido de Clc1p provocaba alteraciones en los parches de actina y en algunas proteínas que regulan la formación de estas estructuras.

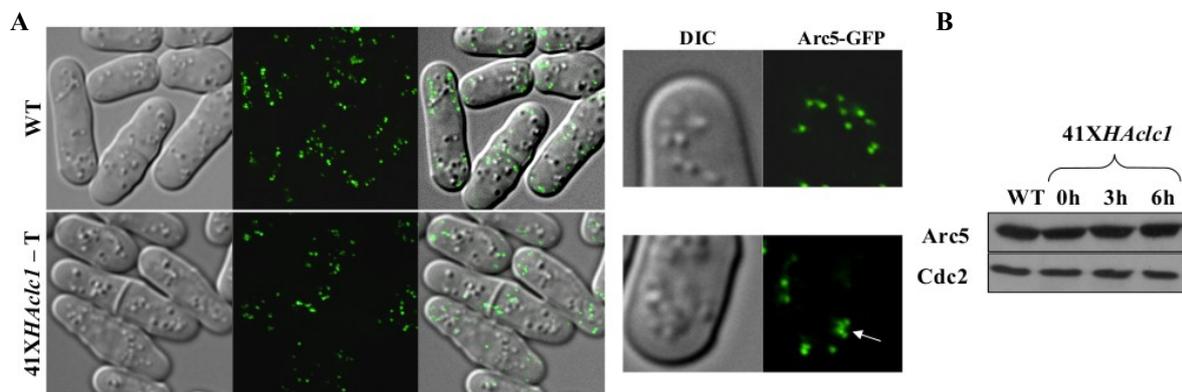


Figura 27. Distribución de Arc5-GFP. A. Distribución de la proteína de fusión Arc5-GFP en células silvestres y del mutante *41XHAcl1* creciendo en ausencia de tiamina. Los paneles a la derecha muestran regiones de los polos celulares ampliadas; la flecha señala un foco. B. Western blot anti-GFP y anti-Cdc2 de extractos celulares de una cepa silvestre y del mutante *41XHAcl1* incubado en presencia de tiamina durante las horas indicadas.

10.2. La estirpe *41XHAcl1* posee cables de actina aberrantes

Mediante un análisis de Western blot se demostró que la reducción en el número de parches de actina no estaba acompañada por una reducción en la cantidad total de actina en las células mutantes (**Figura 28A**, panel situado a la izquierda). En diversos estudios se ha visto que existe un intercambio entre la actina de los cables y de los parches ([Gao & Bretscher, 2008](#)). En el caso del mutante *41XHAcl1*, el descenso en la cantidad de actina presente en los parches de actina podría estar compensado por un aumento en el número de cables de actina. Una tinción con el colorante Alexa Fluor 488-faloidina reveló que el mutante *41XHAcl1* (cultivado tanto en ausencia como en presencia de tiamina) poseía cables de actina que eran muy irregulares en cuanto al grosor, longitud y orientación al compararlos con los de una estirpe silvestre (**Figura 28A**, panel situado a la derecha). De acuerdo con estos datos, la cantidad de actina “perdida” por la disminución de parches de actina podría estar compensada por una mayor incorporación de monómeros de actina en los cables.

10.3. La formina For3p se ve afectada por la disminución en la cantidad de Clc1p

La formina For3p es necesaria para la formación de los cables de actina en *S. pombe* ([Feierbach & Chang, 2001](#)). En nuestro estudio encontramos que esta proteína era menos abundante en las células *41XHAcl1* que en las células control, incluso en condiciones en las que el gen *clc1+* no estaba reprimido (**Figura 28B**, panel situado a la derecha), y que su distribución era anormal (**Figura 28B**, panel situado a la izquierda). En la cepa silvestre, For3-GFP se detectó como una serie de puntos brillantes concentrados en las zonas de los polos y del septo de división, mientras que en el mutante condicional *41XHAcl1*, el tamaño y la distribución de los puntos fluorescentes era más irregular. Como se observa en el panel izquierdo de

la **Figura 28B**, en la estirpe mutante en condiciones en las que la expresión del gen *clc1+* no estaba reprimido, ya se podían encontrar puntos fluorescentes dispersos por el citoplasma y la totalidad de la superficie celular. Estos defectos en la distribución y en la cantidad total de proteína podrían explicar en gran medida la morfología aberrante de los cables de actina en el mutante *41XHAcl1*.

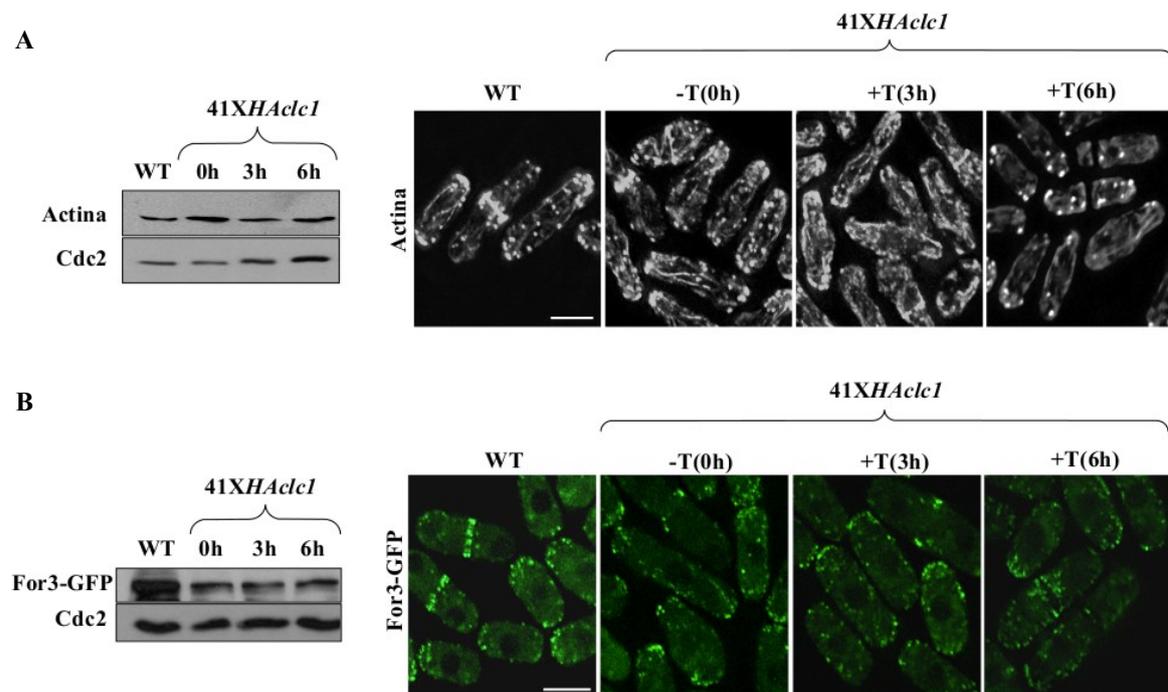


Figura 28. Distribución de los cables de actina y de la formina For3p. A. Panel situado a la izquierda, Western blot de la cantidad de actina presente en extractos celulares de una cepa silvestre y del mutante *41XHAcl1* incubado en medio mínimo en ausencia y en presencia de tiamina durante las horas indicadas. Como control de carga se empleó la proteína Cdc2. Panel de la derecha, tinción con Alexa Fluor 488-faloidina de las cepas indicadas para visualizar los cables de actina. B. Western blot (panel de la izquierda) y distribución (panel de la derecha) de la proteína de fusión For3-GFP en células cultivadas en las mismas condiciones que en A. Barra de escala, 5 μ m. Las imágenes corresponden a proyecciones máximas de planos adquiridos en z con un sistema de microscopía DeltaVision.

10.4. El anillo de actomiosina se ve afectado por la disminución de la cantidad de clatrina

La actina también es un componente del anillo contráctil de actomiosina (CAR). Cuando se observaron los anillos de división en las células fijadas y teñidas para el análisis de los parches y cables de actina, se observó que éstos eran irregulares. Con el fin de obtener información más precisa sobre la morfología de los anillos de actomiosina, se analizó la localización y distribución de la proteína Cdc15-GFP (que está asociada al anillo) en una cepa silvestre y en la cepa mutante. Al cuantificar el número de células con anillos rotos o asimétricos (se analizaron un mínimo de 100 anillos de cada cepa estudiada) se vio que el número de anillos anormales presentes en la cepa silvestre estaba en torno al 2% de la población celular. Este valor era superior en las células mutantes cultivadas en ausencia de tiamina (la expre-

sión del gen *clc1+* no estaba reprimida) siendo aproximadamente del 11%. Tras 6 horas de incubación del mutante *41XHAc1* en condiciones de represión, el 61% de la población celular tenía anillos defectuosos (Figura 29A).

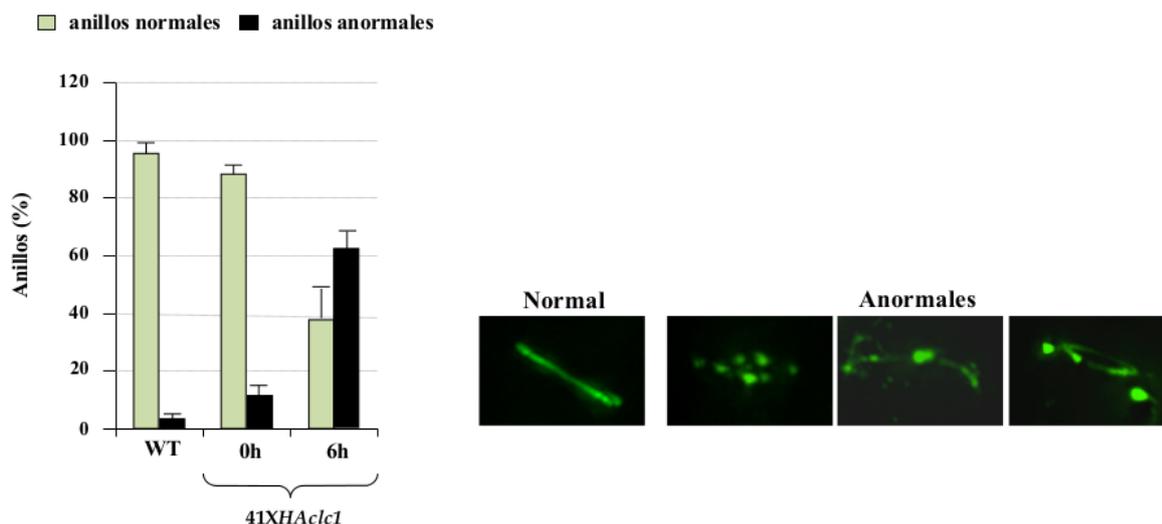


Figura 29. La disminución de clatrina en las células afecta a la correcta distribución del anillo de actomiosina. La gráfica de la izquierda representa la cuantificación de la tipología de los anillos de actomiosina presentes en células silvestres y del mutante *41XHAc1* en las condiciones indicadas, con respecto al total de células. La morfología se observó analizando la localización de la proteína de fusión Cdc15-GFP. Panel de la derecha, micrografías que muestran ejemplos de los tipos de anillos de actomiosina cuantificados para realizar la gráfica anterior. Imágenes adquiridas con un sistema de microscopía DeltaVision.

Este mismo experimento se realizó observando la localización de la proteína Rlc1-GFP, que es la cadena ligera reguladora de una miosina tipo II que interviene en la formación del anillo contráctil. En una estirpe silvestre el porcentaje de células que tenían una localización anormal de esta proteína era solamente el 0,3%. En la estirpe mutante cultivada en ausencia de tiamina la cifra de células que presentaban una localización defectuosa de Rlc1-GFP era superior (1,9% de los anillos). Cuando estas mismas células se incubaron en condiciones de represión, la cantidad de células con defectos en la localización de Rlc1p fue incrementando paulatinamente, siendo de un 6,5% tras 3 horas de represión y de un 15% después de estar creciendo 6 horas en presencia de tiamina (resultado no mostrado).

Todos estos resultados mostraron que el descenso en la cantidad de Clc1p provocaba alteraciones en todas las estructuras que contienen actina, aunque el anillo de actomiosina era el elemento que parecía afectarse en menor grado.

10.5. Los microtúbulos no presentan defectos morfológicos apreciables como consecuencia de una disminución leve de clatrina

Se quiso saber si los microtúbulos se afectaban de algún modo al disminuir la cantidad de clatrina en las células. Para llevar a cabo el análisis de estas estructuras se observó la proteína de fusión GFP-Atb2 en una estirpe silvestre y en el mutante condicional *41XHAcl1* en diferentes condiciones de expresión del gen *clc1*⁺. No se encontraron diferencias aparentes en la distribución, el número o la morfología de los microtúbulos en el mutante condicional antes de las 6 horas de represión cuando se compararon con los de una estirpe silvestre (**Figura 30** y resultados no mostrados). A las 6 horas de estar en presencia de tiamina, aproximadamente el 20% de las células presentaban microtúbulos cortos y desorganizados (flecha en la **Figura 30**) y sólo cuando las células llevaban varios tiempos de generación sin clatrina (12 horas en presencia de tiamina), aproximadamente el 80% de la población celular poseía graves defectos en el citoesqueleto de tubulina (fotografía situada a la derecha en el panel superior de la **Figura 30**). Al analizar la cantidad total de Atb2-GFP presente en las células mediante un análisis de Western blot se observó que ésta no parecía alterarse al disminuir la cantidad de clatrina en las células (**Figura 30**, panel inferior).

Según estos datos, y teniendo en cuenta que no se ha analizado la dinámica de los microtúbulos, se podría concluir que en *S. pombe* la organización y estructura de los microtúbulos no parece depender directamente de la cantidad de clatrina presente en las células.

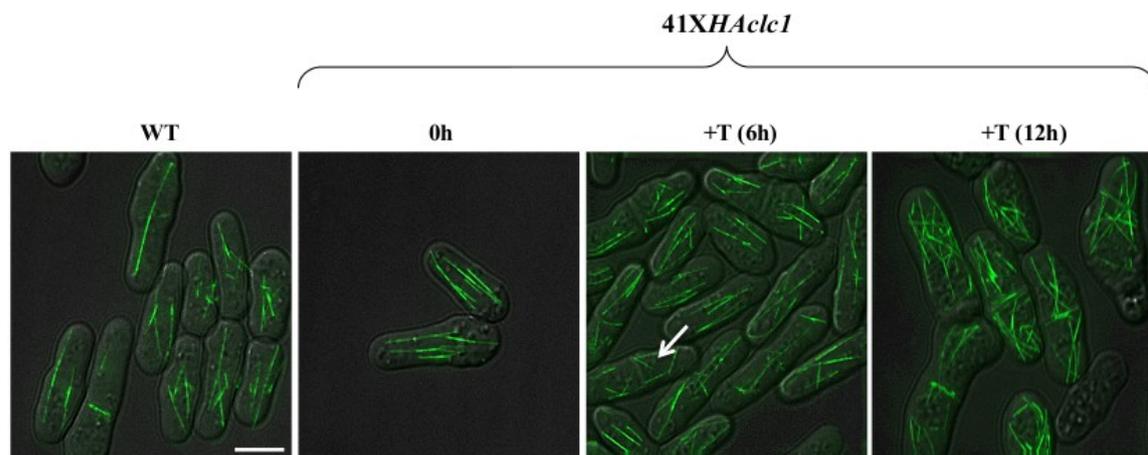
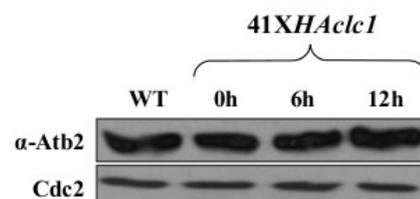


Figura 30. Análisis de los microtúbulos en el mutante *41XHAcl1*. Distribución (panel superior) y Western blot (panel inferior) de la proteína de fusión Atb2-GFP en las células de una estirpe silvestre y del mutante *41XHAcl1* incubadas en ausencia o presencia de tiamina durante los tiempos indicados. Imágenes tomadas con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μ m.



11. ANÁLISIS DEL PROCESO DE SECRECIÓN EN LAS CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p

La clatrina es necesaria para que la secreción y el transporte interno de multitud de proteínas se produzca de forma correcta.

En el Apartado 9 de esta misma sección ya se describió que los fenotipos observados en la pared celular del mutante 41XHA*clc1* se debían principalmente a defectos en el transporte hacia la membrana plasmática de enzimas relacionadas con la biosíntesis y remodelación de esta estructura. Por este motivo se ha querido determinar si los defectos observados eran específicos en el transporte de esas enzimas, o bien eran consecuencia de un defecto general en los procesos de secreción.

Para ello se han caracterizado diversos componentes y procesos celulares relacionados con la secreción y transporte interno de proteínas.

11.1. El complejo adaptador AP-1 no pierde la afinidad por Chc1p cuando hay un descenso en la cantidad de Clc1p en las células

La distribución del complejo adaptador de clatrina AP-1, que está relacionado con el tráfico bidireccional de vesículas entre el trans-Golgi y los endosomas, se observó analizando la localización de su subunidad Apm1p fusionada a la proteína fluorescente GFP. Esta construcción se observó en las células como puntos citoplasmáticos que co-localizaban en su inmensa mayoría con la proteína de fusión Chc1-mCherry (**Figura 31A**). De acuerdo con la reducción de Chc1p que sufría el mutante defectivo en Clc1p, los puntos de Chc1-mCherry eran más pequeños en esta estirpe que en la cepa control, como ya se había visto previamente con la construcción Chc1-GFP (**Figura 22B**). Sin embargo, incluso después de 6 horas de represión del gen *clc1*⁺, Chc1p y Apm1p co-localizaban tal y como se puede observar en la **Figura 31A**. Este resultado indicaría que, aparentemente, la reducción de Clc1p no eliminaba la capacidad de reclutamiento de Chc1p y Apm1p a las membranas.

11.2. Análisis del exocisto en la cepa 41XHA*clc1*

Cuando se analizó la distribución de la proteína del exocisto Sec8-GFP, se pudo ver que ésta se localizaba en los polos celulares de células en interfase y en la zona del ecuador de las células en división, tanto en la estirpe silvestre como en la estirpe mutante 41XHA*clc1* incubada en ausencia de tiamina (**Figura 31B**, panel izquierdo). Este fenotipo persistía tras 3 horas de represión del gen *clc1*⁺, y sólo después de 6 horas de represión se pudo apreciar que alrededor del 50% de las células mostraban una deslocalización del exocisto de las zonas de crecimiento, observándose la señal de la GFP de una forma difusa por el citoplasma (**Figura 31B**, fotografía situada a la derecha en el panel izquierdo). Esta deslocalización de Sec8-GFP

estaba acompañada de una leve reducción de la cantidad total de la proteína, tal y como se vio al realizar un análisis de Western blot (**Figura 31B**, panel derecho). Así, una reducción del 40% en la cantidad de clatrina no tiene un efecto aparente en la localización del exocisto.

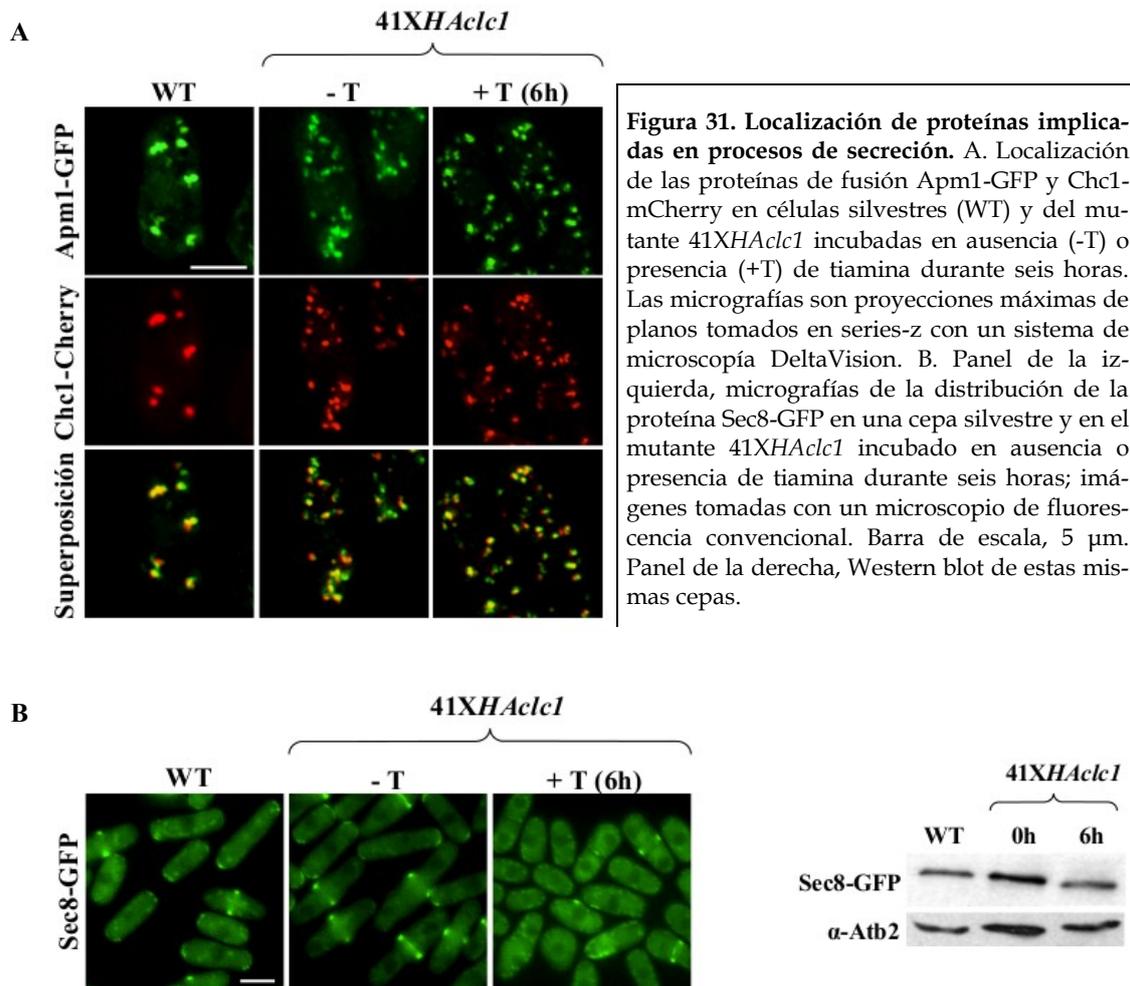


Figura 31. Localización de proteínas implicadas en procesos de secreción. A. Localización de las proteínas de fusión Apm1-GFP y Chc1-mCherry en células silvestres (WT) y del mutante 41XH*Acl1* incubadas en ausencia (-T) o presencia (+T) de tiamina durante seis horas. Las micrografías son proyecciones máximas de planos tomados en series-z con un sistema de microscopía DeltaVision. B. Panel de la izquierda, micrografías de la distribución de la proteína Sec8-GFP en una cepa silvestre y en el mutante 41XH*Acl1* incubado en ausencia o presencia de tiamina durante seis horas; imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m. Panel de la derecha, Western blot de estas mismas cepas.

11.3. Análisis de la distribución de los complejos SNARE

Al llevar a cabo el análisis de la localización del v-SNARE Syb1-GFP no se encontró ninguna diferencia aparente en la distribución de esta proteína entre la cepa silvestre y la cepa mutante 41XH*Acl1*, cultivada en ausencia o en presencia de tiamina durante 3 e incluso 6 horas. En ambas Syb1-GFP se localizaba en la superficie de los polos y el ecuador celular, y en vesículas dispersas por el citoplasma (**Figura 32A**, panel superior). Se ha descrito que la pérdida del complejo AP-1 perturba la distribución de Syb1-GFP, de manera que en este mutante Syb1p no se observa en la superficie celular (Kita *et al*, 2004). En el caso del mutante 41XH*Acl1* la deslocalización de Syb1-GFP en la superficie sólo se observó tras incubar las células en presencia de tiamina durante 48 horas (en medio mínimo suplementado con sorbi-

tol; **Figura 32A**, panel inferior), condición equivalente a la delección de *clc1*⁺. Este resultado indicaba que los defectos en la maquinaria que media la secreción es mayor en el mutante *apm1Δ* que en el mutante *41XHAclc1* incubado en ausencia de tiamina y concordaba con nuestra observación previa de que en la cepa *41XHAclc1* el defecto en la actividad β(1,3) glucán sintasa era menor que en el mutante *apm1Δ*, incluso tras 6 horas de represión.

También se analizó la distribución de la t-SNARE Psy1p fusionada a la proteína fluorescente GFP. En este caso, la localización de GFP-Psy1 en la estirpe *41XHAclc1* tampoco mostraba diferencias con respecto a la de la cepa control, incluso después de 6 horas de represión del gen *clc1*⁺ (**Figura 32B**).

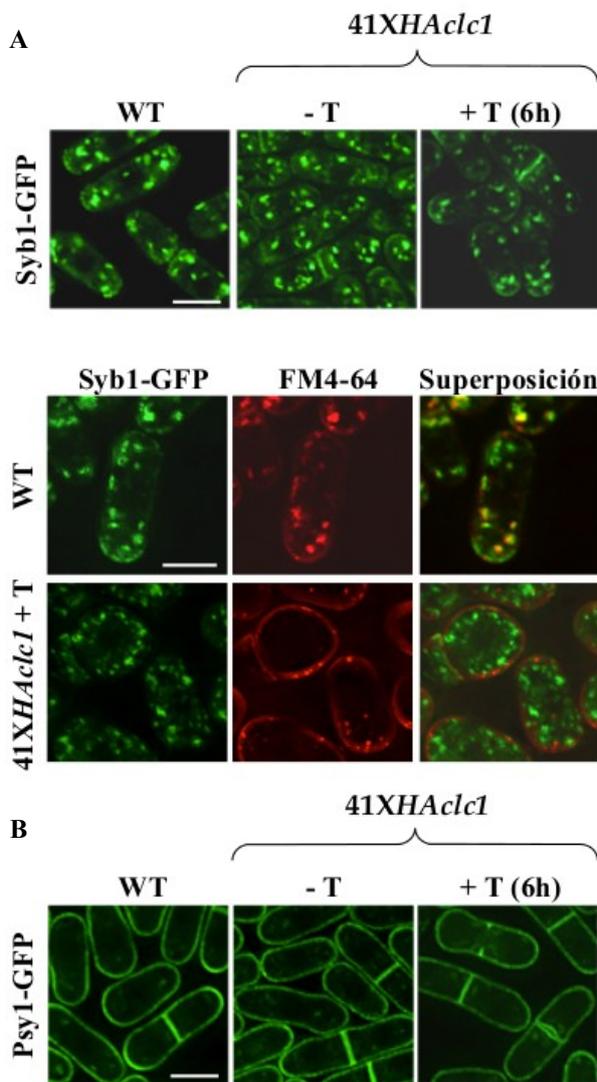


Figura 32. Distribución del v-SNARE Syb1p y del t-SNARE Psy1p. A. Panel superior, micrografías de células de las estirpes silvestres (WT) y mutante *41XHAclc1* que portan la proteína Syb1-GFP incubadas en medio mínimo en ausencia (-T) y en presencia (+T) de tiamina durante 6 horas. Panel inferior, el mismo ensayo que en el panel superior pero en este caso las células se incubaron en presencia de tiamina y de sorbitol durante 48 horas. B. Distribución de la proteína GFP-Psy1 en las estirpes silvestre y *41XHAclc1* cultivadas en ausencia o en presencia de tiamina durante 6 horas. Todas las imágenes son secciones medias y se realizaron con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μm.

11.4. Análisis de la secreción de fosfatasa ácida en la estirpe con niveles reducidos de clatrina

Para analizar la secreción de la enzima fosfatasa ácida en el mutante *41XHAcl1* se empleó la misma aproximación bioquímica que se utilizó con el mutante de delección *cl1Δ*. Al analizar la actividad de la enzima en el medio de cultivo se encontró que ésta estaba reducida en los mutantes *apm1Δ*, *rho3Δ* y *41XHAcl1* (incubada tanto en ausencia como en presencia de tiamina durante 6 horas). Se obtuvieron resultados similares cuando se cuantificó la actividad en extractos celulares de estas mismas estirpes (gráfica situada a la izquierda en la **Figura 33A** y resultados no mostrados). Cuando se calculó la proporción entre la actividad detectada en el medio y la actividad total (medio + extractos celulares) se encontró que no había diferencias significativas entre la estirpe silvestre y la mutante *41XHAcl1* incluso bajo condiciones de represión del gen *cl1⁺* (6 horas en presencia de tiamina), como se observa en la gráfica situada a la derecha en la **Figura 33A** (en esta gráfica se muestran solamente los datos referentes al mutante de *cl1⁺* incubado bajo condiciones de represión durante 6 horas). Este resultado fue similar al obtenido en el mutante *cl1Δ* cultivado en presencia de sorbitol, indicando que los mutantes del gen *cl1⁺* no parecían tener defectos en la secreción de la enzima fosfatasa ácida. Utilizando este método de valoración tampoco se detectó un defecto de secreción en el mutante *apm1Δ*, pero sí en el mutante *rho3Δ*.

11.5. El mutante *41XHAcl1* no muestra defectos aparentes en el tráfico intracelular de la carboxipeptidasa Y

El análisis del transporte de la hidrolasa carboxipeptidasa Y (Cpy1p) hacia la superficie celular se emplea frecuentemente para detectar un posible defecto en el tráfico vesicular entre el Golgi y las vacuolas. El hecho de que esta hidrolasa se secrete al exterior celular pone de manifiesto problemas en el tráfico interno de la célula. Mediante la realización de un análisis Dot-blot de colonias (Conibear & Stevens, 2002), se observó que la estirpe *41XHAcl1* en condiciones en las que el gen *cl1⁺* no estaba reprimido, no secretaba la proteína Cpy1p al medio (**Figura 33B**). Este ensayo no pudo realizarse reprimiendo el gen *cl1⁺* con tiamina durante diferentes tiempos porque las placas de crecimiento necesitaban incubarse durante varios días en estas condiciones, hecho que era incompatible con la viabilidad de las células del mutante *41XHAcl1*.

Todos los resultados descritos en esta sección mostraron que una reducción del 40% de la cantidad de Clc1p en las células (cantidad de proteína estimada en células mutantes creciendo en ausencia de tiamina) no conducían a un defecto general en los procesos de secreción. Sin embargo, una mayor disminución de la cantidad de Clc1p estaba acompañada de alteraciones adicionales en la maquinaria de secreción.

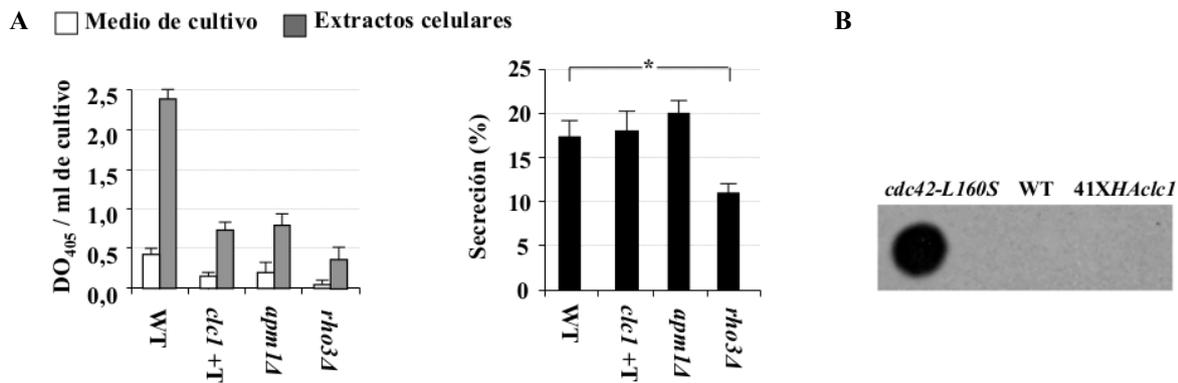


Figura 33. La secreción de fosfatasa ácida y el transporte de la carboxipeptidasa Cpy1p parecen no afectarse por la disminución de clatrina en las células. A. Actividad fosfatasa ácida valorada en el medio de cultivo y en extractos celulares. Todas las muestras se recogieron de cultivos celulares que estaban creciendo logarítmicamente a una densidad de 2×10^7 células/ml. Panel situado a la izquierda, actividad medida en el medio de cultivo y en extractos celulares de las cepas indicadas. Panel derecho, la secreción de fosfatasa ácida se calculó como el porcentaje de actividad obtenida en los cultivos con respecto al total de actividad detectada (actividad en el medio + actividad en los extractos celulares). El experimento se realizó un mínimo de cinco veces con duplicados; se muestra la significación estadística (*; $p < 0.05$; Test t-Student). B. Detección de la carboxipeptidasa Cpy1p secretada mediante un análisis de Western Dot-blot de las cepas indicadas, incubadas en medio mínimo sin tiamina durante cinco días a 28°C .

12. ANÁLISIS DEL PROCESO DE ENDOCITOSIS EN CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE CLATRINA

Al igual que para la secreción, la clatrina es un elemento necesario para que se lleve a cabo el proceso de endocitosis correctamente. Contar con un mutante que permitiese modular la cantidad de clatrina en la célula hizo posible el análisis de este proceso de un modo detallado. Se realizaron diferentes aproximaciones que permitieron determinar el grado de afectación de la maquinaria endocítica en función de los diferentes niveles de clatrina presentes en la célula.

12.1. Análisis del complejo AP-2

El análisis de la localización de la proteína Apl3p que forma parte del complejo adaptador AP-2, relacionado con la endocitosis, mostró que en una estirpe silvestre esta proteína se distribuía principalmente como una serie de pequeños puntos concentrados en los polos o en el ecuador celular (**Figura 34A**, panel superior). Observando la localización de Apl3-GFP en el mutante condicional *41XHAc1* incubado en condiciones en las que la expresión del gen *clc1+* no estaba reprimida, no se encontraron muchas diferencias con respecto a la localización de esta proteína en las células de una estirpe control, aunque en algunas células era posible observar puntos de Apl3-GFP de mayor tamaño que los de la estirpe silvestre. Cuando la cantidad de Clc1p se redujo más drásticamente utilizando el mutante condicional

41XHAcl1 incubado en condiciones de represión durante seis horas, las células parecían tener menos puntos de Apl3-GFP (**Figura 34A**, panel superior). Además, en la estirpe mutante la mayoría de los puntos se observaban principalmente en la superficie celular, sugiriendo que su movilidad podía estar reducida, o bien que su tiempo de permanencia en la membrana era mayor. Esta alteración era más evidente en condiciones de represión. Mediante un análisis de Western blot también se pudo apreciar que la cantidad total de Apl3-GFP en las células estaba ligeramente reducida en el mutante 41XHAcl1 (**Figura 34A**, panel inferior).

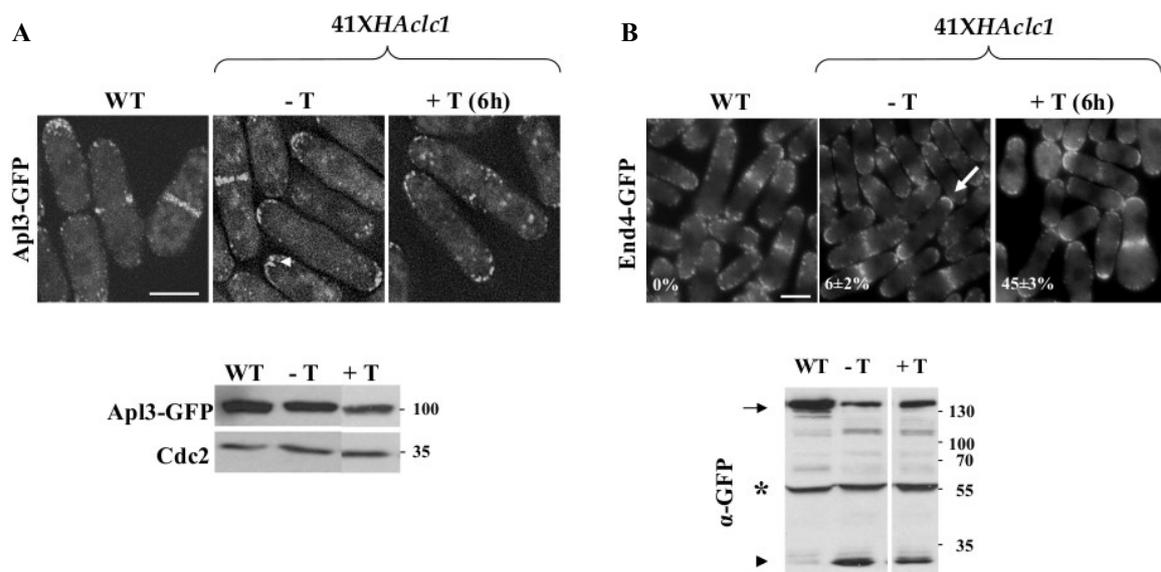


Figura 34. Análisis de proteínas implicadas en la endocitosis mediada por clatrina. A. Panel superior, distribución de Apl3-GFP en una estirpe silvestre (WT) y en la estirpe 41XHAcl1 incubada en ausencia (-T) y en presencia (+T) de tiamina durante 6 horas; el triángulo blanco indica un agrupamiento de puntos de Apl3-GFP. Barra de escala, 5 μ m. Panel inferior, Western blot anti-GFP y anti-Cdc2 de extractos celulares obtenidos de las mismas muestras que en el panel superior. B. Panel superior, distribución de la proteína End4/Sla2-GFP en las mismas condiciones que en A. La flecha señala una célula que tiene fluorescencia continua en la superficie celular. En cada fotografía se indica el porcentaje de células con esta distribución continua de End4-GFP. Barra de escala 5 μ m. Panel inferior, Western blot de extractos celulares procedentes de las mismas muestras. La flecha indica la señal de End4-GFP, el triángulo señala una banda que podría corresponder a la GFP y el asterisco indica una banda inespecífica.

12.2. Distribución de End4p

Cuando se llevó a cabo el análisis de la localización de End4/Sla2-GFP, una proteína adaptadora que permite la unión de la actina a la clatrina y es necesaria para la endocitosis (Iwaki *et al*, 2004; Castagnetti *et al*, 2005), se vio cómo en una cepa silvestre esta proteína se distribuía como puntos concentrados principalmente en las zonas de los polos y del septo de división (fotografía situada a la izquierda en el panel superior de la **Figura 34B**). En la cepa mutante incubada en ausencia de tiamina esta localización era similar, pero aproximadamente el 6% de las células mostraban una señal continua de End4-GFP en la superficie de las áreas de crecimiento (la flecha de la fotografía central del panel superior de la **Figura 34B** se-

ñala la señal continua de la proteína). El porcentaje de células con este fenotipo fue aumentando al añadir tiamina al medio, desde el 22% a las 3 horas de represión, hasta el 45% tras estar 6 horas en presencia de la vitamina (**Figura 34B**, panel superior). Este porcentaje siguió incrementando a medida que pasaba el tiempo en el que las células estaban en presencia de tiamina. Mediante un ensayo de Western blot se observó que la cantidad total de End4-GFP estaba reducida en las células 41XHAcl1 (panel inferior de la **Figura 34B**, la flecha indica la señal de End4-GFP). Además, en las muestras correspondientes a la cepa mutante se pudo observar una banda que podría corresponder a la GFP procedente de la proteína de fusión End4-GFP, que no aparecía en la muestra de la cepa silvestre (panel inferior de la **Figura 34B**, la banda está señalada por un triángulo negro). La aparición de esta banda podría estar indicando degradación proteica de End4-GFP en las muestras de las estirpe 41XHAcl1. La banda señalada con un asterisco en el panel inferior de la **Figura 34B** corresponde a una banda inespecífica.

En *S. cerevisiae* está descrito que Clc1p se une a Sla2/End4 y promueve la progresión de los parches de actina en los sitios de endocitosis regulando este proceso eficientemente (Newpher & Lemmon, 2006; Boettner *et al*, 2011). En nuestro caso, según los datos obtenidos, la disminución de la cantidad de clatrina en *S. pombe* también podría estar ralentizando la progresión de los parches en los sitios de endocitosis, haciendo que la proteína End4-GFP fuese más inestable.

12.3. Un descenso del 40% en la cantidad de clatrina no afecta de forma significativa a la internalización de material de membrana plasmática

Para comprobar el efecto que podría causar la disminución de clatrina en la endocitosis de proteínas de la membrana plasmática se llevó a cabo un análisis de la incorporación del colorante FM4-64 en las células. La tinción se realizó en cultivos mixtos de células del mutante 41XHAcl1 y de una estirpe silvestre que portaban la proteína del cuerpo polar del huso fusionada con la proteína verde fluorescente (Sad1-GFP) para poder diferenciar ambas estirpes. Los cultivos se incubaron en ausencia o presencia de tiamina durante 3 y 6 horas; las fotografías mostradas en la **Figura 35A** se tomaron a los 0, 2 y 30 minutos después de haber añadido el FM4-64 al medio (ver “Materiales y métodos”). En los cultivos mixtos donde no se añadió tiamina, tanto en la cepa silvestre (células con un punto verde fluorescente) como en la mutante, el colorante se observaba en la superficie celular a tiempo 0, en endosomas internos a los 2 minutos, y marcando la membrana vacuolar a los 30 minutos de haber estado a 32°C en presencia del colorante. Al realizar la tinción en células que habían sido incubadas en presencia de tiamina durante 3 horas, no se apreciaron diferencias significativas en las diferentes etapas de transporte del colorante entre ambas cepas. Cuando se analizó la endocitosis del FM4-64 en cultivos mixtos que habían estado sometidos a 6 horas de represión, se observó que las células de las dos estirpes presentaban teñidas su membrana plasmática (tiempo 0'). Tras dos minutos de estar en presencia del colorante, éste se observaba en el in-

terior de las células silvestres (células que poseen un punto verde fluorescente en su interior), pero no en las células mutantes. Después de 30 minutos de incubación a 32°C en presencia del colorante, las vacuolas de la cepa control estaban marcadas, sin embargo en las células mutantes el colorante todavía se podía observar en la superficie (fotografías en la parte inferior de la **Figura 35A**). En estas condiciones solamente se pudo apreciar una leve tinción en el interior celular en un reducido número de células del mutante condicional de *clc1*⁺ (flechas en la **Figura 35A**). Con estos datos se puede asumir que una reducción del 40% de Clc1p no afectaba a la toma de FM4-64 y sólo al disminuir en más del 90% la cantidad de esta proteína en las células se detectaba un retraso bastante notable en el proceso, aunque éste no parecía bloquearse totalmente.

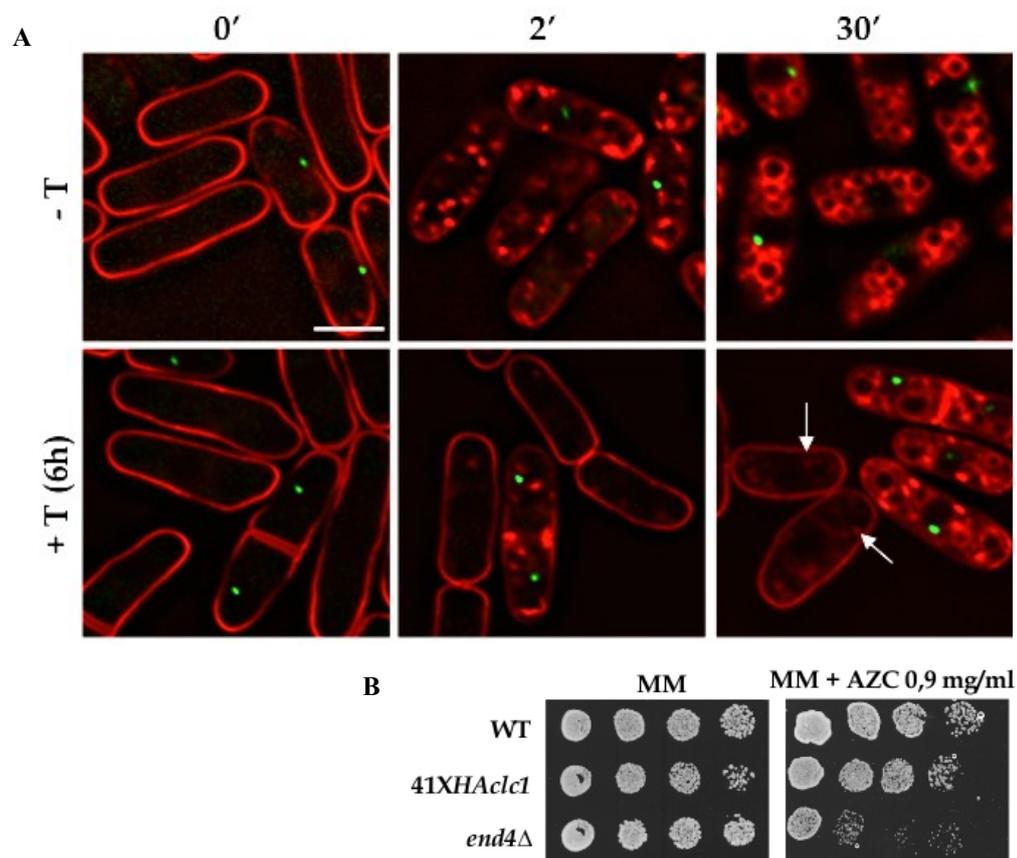


Figura 35. Análisis de la endocitosis en células de la estirpe 41XHAcl1. A. Incorporación del colorante FM4-64 en cultivos mixtos de células silvestres que poseen la proteína Sad1-GFP y células del mutante 41XHAcl1 crecidas en ausencia o presencia de tiamina durante 6 horas. Las células se tiñeron con el colorante y se fotografiaron tras el tiempo indicado (en minutos) de incubación a 32°C; las flechas indican la internalización del FM4-64. Las imágenes de fluorescencia son secciones medias que se obtuvieron con un sistema de microscopía DeltaVision. La barra de escala representa 5 µm. B. Ensayo de crecimiento donde 3x10⁴ células y diluciones seriadas 1:4 de las estirpes indicadas que se inocularon en placas de medio mínimo y medio mínimo suplementado con 0,9 mg/ml del análogo de L-prolina, ácido L-azetidina-2-carboxílico (AZC) y se incubaron a 28°C durante cinco días.

Por otra parte también se llevaron a cabo estudios de crecimiento en presencia del compuesto L-azetidín-2-carboxílico (AZC), que es un análogo tóxico del aminoácido L-prolina. Estos ensayos permiten evaluar la endocitosis del transportador de membrana plasmática de este aminoácido (ver “Materiales y métodos”).

Está descrito que el AZC inhibe el crecimiento celular en el mutante *end4/sla2Δ* debido a que los defectos en la endocitosis del transportador del aminoácido hacen que las células incorporen más análogo, lo que provoca una inhibición del crecimiento (Iwaki *et al*, 2004). Cuando se estudió qué ocurría con el mutante *41XHAcl1*, en condiciones en las que la expresión de *cl1+* no estaba reprimida (células creciendo sin tiamina en el medio), no se encontró ninguna diferencia en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre (**Figura 35B**). Este experimento no se pudo realizar en medio mínimo con tiamina debido a que la mayoría de las células del mutante *41XHAcl1* morían antes de 24 horas de incubación en presencia de la vitamina.

En resumen, una reducción de hasta el 40% de Clc1p en la célula no provoca un defecto generalizado en la internalización de material asociado a la membrana plasmática

12.4. Influencia de la estabilización osmótica del medio sobre la internalización del colorante FM4-64

Como se ha indicado en el punto anterior, las células del mutante condicional *41XHAcl1* incubadas durante 6 horas con tiamina no eran capaces de internalizar el colorante FM4-64 correctamente. Estas células prácticamente sólo presentaban teñida la membrana plasmática incluso tras 30´ minutos de incubación a 32°C en presencia del colorante (fotografía inferior derecha de la **Figura 35A**). No obstante, cuando realizamos esta misma tinción en células del mutante nulo *cl1Δ* habíamos observado que el FM4-64 sí era capaz de entrar en las células, aunque con cierto retraso (**Figura 17A**). El hecho de que el mutante nulo de *cl1+* pudiese internalizar el colorante y el mutante condicional *41XHAcl1* no, podría deberse a que las células de *cl1Δ* estaban incubadas en un medio suplementado con sorbitol, ya que en *S. cerevisiae* se ha visto que la estabilización osmótica del medio afecta directamente a la endocitosis (Aghamohammadzadeh & Ayscough, 2009). Para analizar esta posibilidad, se llevó a cabo la tinción con el colorante FM4-64 de células de una estirpe silvestre y del mutante condicional *41XHAcl1*, incubadas en condiciones de represión durante 9 horas, y cultivadas en medio mínimo o en medio mínimo suplementado con sorbitol (**Figura 36**). Como se observa en el panel de la izquierda de la **Figura 36**, las células de la estirpe silvestre incubadas en medio mínimo presentaban teñidas las vacuolas tras pasar 15 y 30 minutos en presencia del colorante. En estas mismas condiciones, las células del mutante condicional mostraban teñida principalmente la membrana plasmática, incluso tras estar 30 minutos en contacto con el FM4-64. Cuando este mismo experimento se realizó en medio mínimo suplementado con sorbitol (panel situado a la derecha en la **Figura 36**) se observó que las células silvestres

incorporaban el colorante con la misma eficiencia que en un medio sin sorbitol. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en un medio sin estabilización osmótica, el mutante condicional incubado durante 9 horas en condiciones de represión era capaz de internalizar el FM4-64 tras estar 15 minutos en presencia del colorante, aunque parecía existir cierto retraso con respecto a la estirpe silvestre analizada en las mismas condiciones (fotografía superior derecha del panel situado a la derecha en la **Figura 36**), ya que mientras que en las células silvestres ya había alcanzado la membrana vacuolar, en las mutantes éste se observaba en la superficie celular y en endosomas. Tras 30 minutos de incubación de las células del mutante en presencia del FM4-64, se pudo apreciar el marcaje de las vacuolas (fotografía situada en la parte inferior derecha del panel situado a la derecha en la **Figura 36**), al igual que ocurría en las células del mutante nulo *clc1Δ* (**Figura 17A**). Sin embargo, aún se observaban numerosos endosomas, lo que confirmaba el retraso.

Estos datos confirmaban nuestra hipótesis de que la estabilización osmótica del medio afectaba a la endocitosis en *S. pombe*, o al menos a la incorporación del colorante FM4-64 de manera que, en estas condiciones, la clatrina no es estrictamente necesaria para el proceso, aunque sí lo es para que ocurra eficientemente.

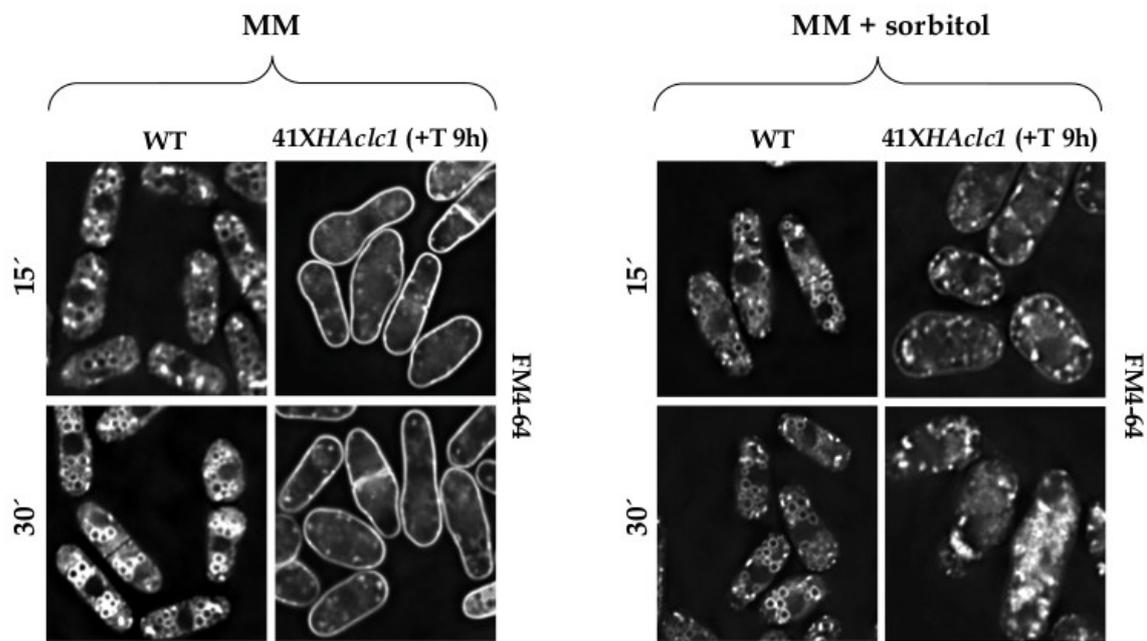


Figura 36. Influencia de la estabilización osmótica del medio de cultivo en la endocitosis del FM4-64 en *S. pombe*. El panel de la izquierda muestra células de la cepa silvestre y del mutante *41XHAcl1 (+T 9h)* cultivadas en presencia de tiamina durante 9 horas en medio mínimo e incubadas con el colorante FM4-64 durante 15 y 30 minutos. Panel derecho, células de las mismas estirpes y en las mismas condiciones, cultivadas en medio mínimo suplementado con sorbitol e incubadas con el colorante FM4-64 durante 15 y 30 minutos. Las imágenes son planos únicos adquiridos con un sistema de microscopía DeltaVision.

13. LAS PROPIEDADES DE LAS VACUOLAS ESTÁN ALTERADAS EN LAS CÉLULAS CON NIVELES REDUCIDOS DE Clc1p

Se había observado que las células del mutante nulo *clc1Δ* poseían vacuolas pequeñas o fragmentadas (**Figuras 13 y 14**). Por ese motivo también se analizaron las características de las vacuolas en las células que tenían un nivel reducido de clatrina

13.1. Defectos en la morfología y el número de las vacuolas

La tinción de las vacuolas con el colorante CDCFDA mostró que incluso en las células del mutante *41XHAclc1* cultivadas en ausencia de tiamina (disminución del 40% de Clc1p), estos orgánulos eran de menor tamaño y más numerosos que los de la cepa silvestre (**Figura 37A**). Para confirmar estos resultados, en primer lugar se cuantificó el número de vacuolas por célula que tenían ambas estirpes. En el caso de la cepa silvestre se contaron 768 vacuolas en un total de 48 células (media de 16,4 vacuolas por célula) y para el mutante *41XHAclc1* se detectaron 449 vacuolas pertenecientes a 15 células (media de 29,9 vacuolas por célula). Por otra parte, se midieron los diámetros de las vacuolas en la estirpe silvestre y en la cepa condicional del gen *clc1+* sin reprimir para valorar si existían diferencias en el tamaño de estos orgánulos entre ambas cepas. La **Figura 37B** muestra los resultados de la distribución de los diámetros vacuolares en cada población celular analizada. En las células silvestres la mayoría de las vacuolas poseían un diámetro entre 0,2 y 1,19 μm , siendo los valores comprendidos entre 0,8 y 0,99 μm los más representados, aunque existía un pequeño número de vacuolas de mayor tamaño con un diámetro superior a 2,0 μm . En el mutante *41XHAclc1* la mayoría de las vacuolas tenían un diámetro comprendido entre 0,2 y 0,99 μm , y los tamaños entre 0,4 y 0,79 μm eran mayoritarios. El número de vacuolas con un diámetro superior a 0,99 μm fue significativamente menor que en la cepa silvestre, mientras que el número de vacuolas con un diámetro menor a 0,2 μm fue mayor que en esta cepa. En resumen, las células mutantes tenían más vacuolas y éstas eran de menor tamaño que las que presentaba la estirpe silvestre.

Adicionalmente se realizó microscopía electrónica de transmisión para observar en más detalle la morfología de las vacuolas en estas cepas. Como se puede observar en la **Figura 37C**, en el mutante *41XHAclc1* incubado en ausencia de tiamina, algunas de las vacuolas poseían apariencia silvestre (vacuola señalada por una flecha en la fotografía marcada como 0h), mientras que otras, sobre el 60%, poseían contenido en su interior y/o eran de forma irregular (un ejemplo está señalado por un triángulo blanco en la misma fotografía). A partir de las 3 horas de represión del gen *clc1+*, la mayoría de las vacuolas aparecían como cuerpos multivesiculares lo que podría estar indicando problemas en la fusión de las vacuolas.

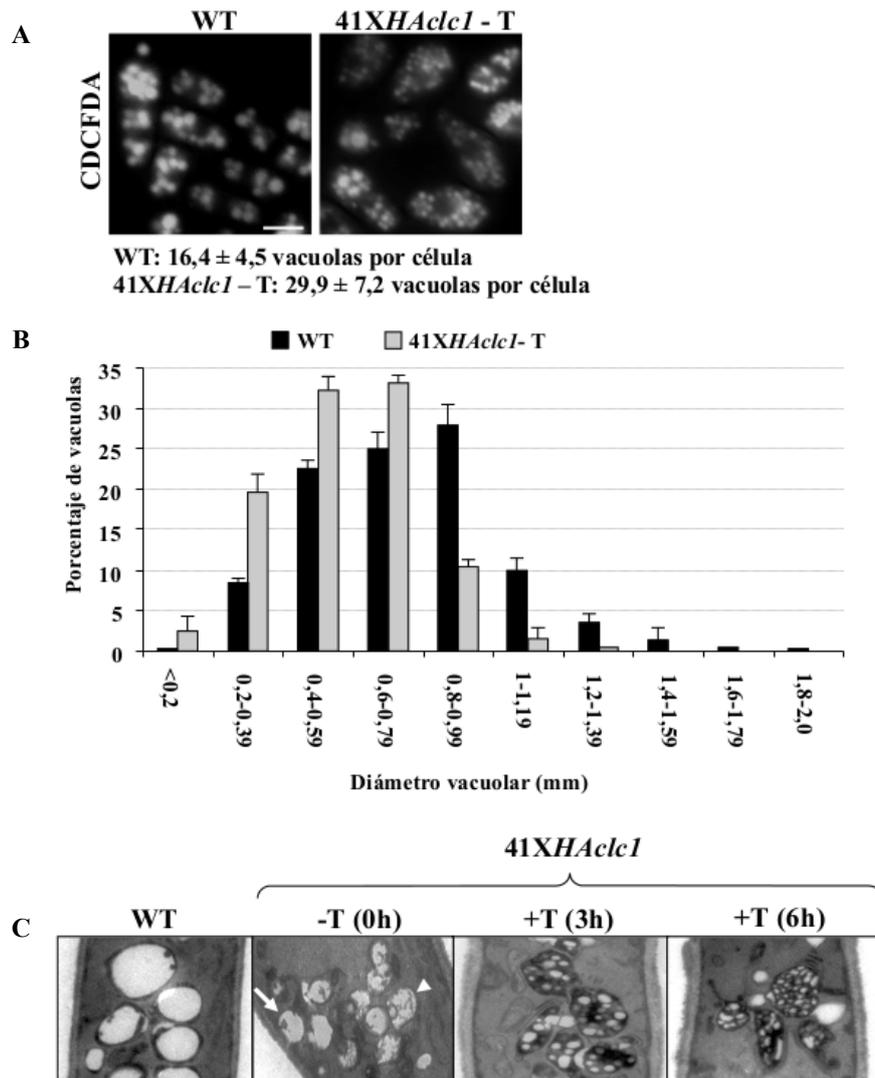


Figura 37. Las vacuolas de la estirpe mutante 41XHAcl1 presentan defectos de tamaño y morfología. A. Vacuolas de una cepa silvestre y del mutante 41XHAcl1 incubado en condiciones en las que el gen *clc1*⁺ se está expresando (sin tiamina en el medio), teñidas con diacetato carboxi-2',7'-diclorofluoresceína (CDCFDA); en la parte inferior del panel se indica la media del número de vacuolas por célula para cada estirpe. Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m. B. Gráfica que muestra el porcentaje de vacuolas clasificadas según la medida de su diámetro con respecto al número total de vacuolas cuantificadas en células de una estirpe silvestre y del mutante 41XHAcl1 incubado en ausencia de tiamina. C. Fotografías de microscopía electrónica de vacuolas en la cepa silvestre y en el mutante 41XHAcl1 cultivado en condiciones de expresión del gen *clc1*⁺ (0h) y bajo condiciones de represión del mismo durante 3 y 6 horas.

13.2. El descenso de Clc1p provoca defectos en la fusión homotípica de las vacuolas y altera sus propiedades

Se analizó si las vacuolas en el mutante *41XHAcl1* eran capaces de llevar a cabo la fusión homotípica cuando las células eran sometidas a un choque hiposmótico. Al transferir células de una estirpe silvestre de medio mínimo a agua, e incubarlas en esas condiciones durante 90 minutos, el tamaño de las vacuolas incrementó en el 86% de las células analizadas (**Figura 38**, panel izquierdo). Cuando se realizó este mismo ensayo con las células del mutante condicional incubado en condiciones en las que el gen *clc1⁺* no estaba reprimido (sin tiamina en el medio) se observaron dos hechos: i) sólo el 32% de las células eran capaces de llevar a cabo la fusión vacuolar (un ejemplo de una vacuola fusionada -con un tamaño superior al de una vacuola media- está señalado por un triángulo en el panel central de la **Figura 38**); ii) algunas de las vacuolas no se tiñeron con el colorante CDCFDA, o la tinción que presentaban era muy débil (ejemplos señalados por flechas en el panel central de la **Figura 38**). Tras tres horas de crecimiento en condiciones de represión, sólo se detectó un pequeño número de vacuolas de gran tamaño en las células incubadas en agua durante 90 minutos (**Figura 38**, panel derecho). En una fotografía de DIC el triángulo señala una vacuola). Además, bajo estas condiciones el colorante CDCFDA no proporcionó una clara tinción vacuolar; las células mutantes exhibían una fluorescencia difusa por todo el citoplasma e incluso, en ocasiones, las células no presentaban fluorescencia indicando que las propiedades de las vacuolas se alteraban cuando se reducía la cantidad de clatrina en las células.

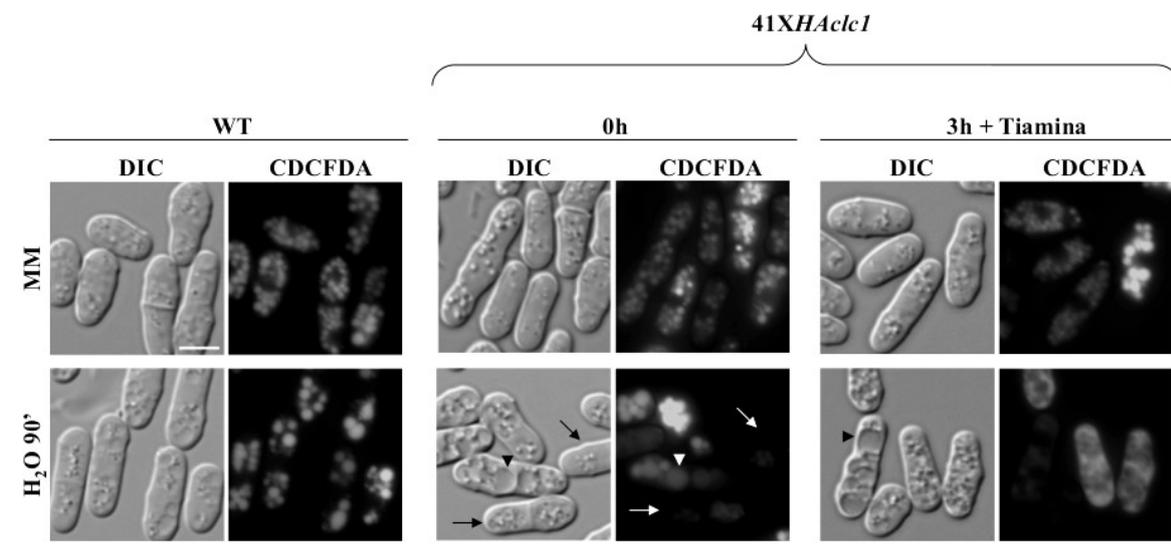


Figura 38. Las vacuolas del mutante *41XHAcl1* tienen alteradas sus propiedades. Las fotografías superiores muestran imágenes de DIC y de fluorescencia donde se observan las vacuolas de una cepa silvestre y del mutante *41XHAcl1* incubado en medio mínimo en ausencia (0h) o en presencia de tiamina durante tres horas (3h), teñidas con el colorante CDCFDA. En las fotografías inferiores se muestran imágenes de DIC y de fluorescencia de células de cada cultivo indicado, que se transfirieron de medio mínimo a agua y se incubaron durante 90 minutos en presencia de CDCFDA. Las flechas señalan células que no se tiñeron; los triángulos muestran vacuolas fusionadas. Barra de escala, 5 μ m.

14. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Apl3p

Con el fin de analizar si el complejo AP-2, asociado a las vesículas endocíticas de clatrina, juega algún papel en la síntesis de la pared celular y/o en la morfogénesis de *S. pombe*, se ha caracterizado la proteína Apl3p que corresponde a la subunidad α de dicho adaptador.

En la base de datos de *S. pombe* (<http://www.pombase.org>) el gen anotado como SPBC691.03c aparece como la ORF del gen *apl3+*, que codifica una proteína conservada en eucariotas que se corresponde con Apl3p. Para proceder a su estudio se clonó este gen y se construyeron diferentes plásmidos integrativos en los que *apl3+* estaba marcado con distintos epítomos en su extremo carboxilo terminal (ver “Materiales y métodos”). Mediante un análisis de Western blot se determinó que este gen se expresa en *S. pombe* y que codifica una proteína con un tamaño de aproximadamente 100 kDa, tal y como se esperaba según la información registrada en <http://www.pombase.org> (ver **Figura 34A**, panel inferior).

En cuanto a su localización celular, la proteína de fusión Apl3-GFP se distribuía a modo de pequeños puntos fluorescentes en las zonas de los polos y el ecuador celular, además de en pequeñas vesículas intracelulares dispersas por el citoplasma (**Figura 34A**, panel superior). Puesto que los polos y el ecuador celular corresponden a los sitios de endocitosis activa, la localización de Apl3p estaba de acuerdo con una posible intervención de esta proteína en dicho proceso.

14.1. Relación de Apl3p con Clc1p

Como se ha comentado con anterioridad *apl3+* codifica la subunidad α del complejo tetramérico AP-2, conocido por su asociación con la clatrina en la membrana plasmática. En mamíferos la subunidad α es la parte del complejo encargada de interactuar con las cabezas de fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato, que es un lípido muy abundante en la membrana plasmática (Collins *et al*, 2002; Gaidarov *et al*, 1996; Rohde *et al*, 2002; Reider & Wendland, 2011). Sin embargo, la interacción de los adaptadores con la clatrina se produce a través de las subunidades β , según diversos análisis realizados (Dell’Angelica *et al*, 1998; Gallusser & Kirchhausen, 1993). En el caso de *S. cerevisiae* solamente se ha visto interacción de la clatrina con el adaptador AP-1, pero no con los otros dos adaptadores que se han descrito para levaduras, AP-2 y AP-3 (Yeung *et al*, 1999).

En *S. pombe* no se había estudiado la interacción del complejo AP-2 con la clatrina, pero por predicciones informáticas y diversos análisis estructurales se sabe que la subunidad Apl1p, la adaptina $\beta 2$ del complejo AP-2, no posee ninguna región de unión a clatrina (Clathrin Binding Box o CBB) (ELM Motif: <http://elm.eu.org>). Apl3p sí que posee este motivo, lo cual indica que esta subunidad podría interactuar con la clatrina.

Para analizar esa posibilidad se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Apl3p y Clc1p. Se incubaron los extractos celulares procedentes de una cepa silvestre (en la que ninguna de las proteínas a estudio estaba marcada) y de las cepas que portaban las proteínas de fusión Apl3-GFP, Clc1-HA, o ambas en presencia del anticuerpo monoclonal anti-GFP. Tras realizar la inmunoprecipitación (ver “Materiales y métodos”), se realizaron ensayos de Western blot empleando anticuerpos anti-GFP o anti-HA para detectar la presencia de Apl3p o Clc1p en los inmunoprecipitados y en los extractos celulares. Como se puede observar en la **Figura 39**, Clc1-HA se detectó en los inmunoprecipitados procedentes de la cepa que portaba ambas proteínas marcadas pero no en los procedentes de las estirpes empleadas como controles. Este resultado indicaría que ambas proteínas interactuaban directa o indirectamente en *S. pombe*, y pondría de manifiesto la capacidad de la subunidad α del complejo AP-2 para interactuar con la clatrina, a diferencia de lo que se sabe hasta ahora en *S. cerevisiae*.

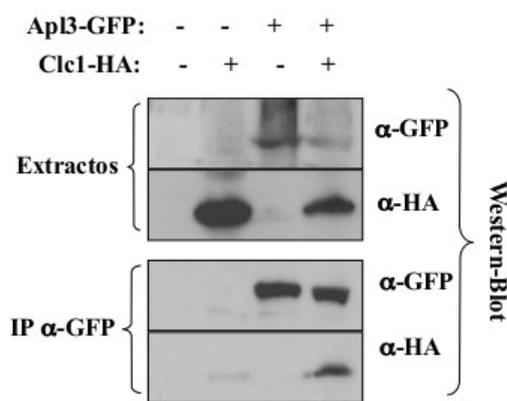


Figura 39. Clc1p y Apl3p co-inmunoprecipitan. Extractos celulares de estirpes que expresan las proteínas de fusión Apl3-GFP y/o Clc1-HA se analizaron mediante Western blot empleando los anticuerpos monoclonales anti-GFP (α -GFP) o anti-HA (α -HA). Alícuotas de los extractos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo policlonal anti-GFP para la inmunoprecipitación (IP) y se analizaron por Western blot con anticuerpos anti-HA y anti-GFP.

14.2. Apl3p es necesaria para la estabilidad del complejo AP-2

Al analizar la localización de Apl1-GFP (subunidad β 2 de AP-2) en el mutante de delección de *apl3*⁺ y la de Apl3-GFP en el mutante *apl1* Δ observamos que en ambos casos se perdía la localización de las proteínas en los sitios activos de crecimiento (**Figura 40**). Este dato indicaba que la pérdida de una de las subunidades mayores de AP-2 desestabilizaba el complejo adaptador en *S. pombe*. En el caso de mamíferos y de *S. cerevisiae* ya se había estudiado con anterioridad que la ausencia de alguna de las cuatro subunidades afectaba drásticamente a la formación de un complejo estable (Panek *et al*, 1997; Dell’Angelica *et al*, 1999). Además, se sabe que en *S. cerevisiae* la delección de *APL3* hace que se pierda la unión entre las subunidades Apl1p y Apl2p, impidiéndose la formación del complejo AP-2 (Yeung *et al*, 1999). Como se ha podido comprobar en *S. pombe*, AP-2 presentaba un comportamiento similar al de otras especies estudiadas.

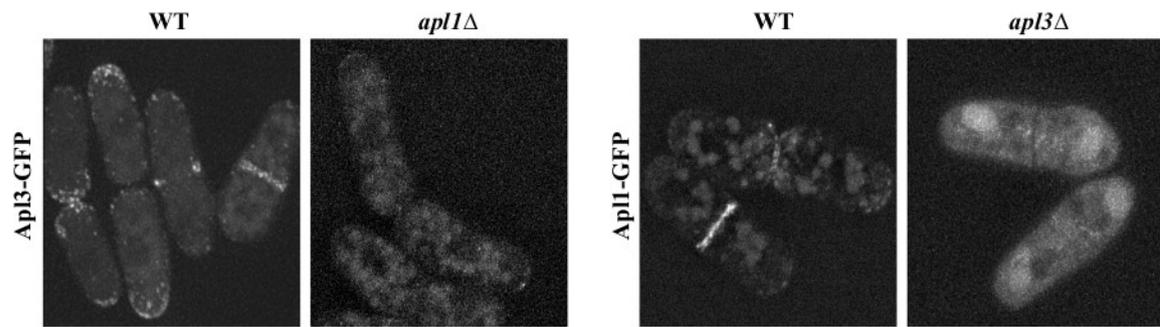


Figura 40. El complejo AP-2 es inestable en ausencia de alguna de sus subunidades mayores (α y β). Localización de las proteínas de fusión Ap13-GFP y Ap11-GFP en una estirpe silvestre y en los mutantes *apl1* Δ y *apl3* Δ respectivamente. Proyecciones máximas de planos adquiridos en series z con un sistema de microscopía DeltaVision.

15. ANÁLISIS DEL MUTANTE *apl3* Δ

Como se ha explicado en la “Introducción”, Apl3p está descrito como una subunidad perteneciente a un complejo adaptador de clatrina que se asocia a la membrana plasmática e interviene en el proceso de endocitosis. Por este motivo quisimos determinar ésta y otras posibles funciones de esta proteína en *S. pombe*. Para conocer la función de *apl3*⁺ se llevó a cabo la construcción del mutante nulo *apl3::KAN* del modo que se explica en la sección “Materiales y métodos”. Se transformó una cepa haploide de *S. pombe* con el casete de delección y se obtuvieron diferentes transformantes capaces de crecer en medio rico suplementado con G418, lo que indicaba *a priori* que a diferencia de lo que ocurría con el gen *clc1*⁺, la delección de *apl3*⁺ no era letal para las células de *S. pombe*.

Para detectar posibles defectos morfológicos o de crecimiento en el mutante *apl3* Δ se realizaron fotografías de contraste de fases de muestras de cultivos de *apl3* Δ que se incubaron en diferentes medios de cultivo (medio rico YES y medio mínimo) y a diferentes temperaturas (17°C, 28°C, 32°C y 37°C). En ninguna de las condiciones observadas se encontraron defectos morfológicos ni de crecimiento al comparar las células del mutante *apl3* Δ con las de una estirpe silvestre (resultados no mostrados).

A continuación se procedió a analizar el papel de Apl3p en los distintos procesos implicados en el tráfico vesicular y en la regulación de la síntesis de la pared celular.

15.1. La ausencia de Apl3p podría afectar a la distribución de las vesículas de clatrina

En primer lugar se analizó cómo se distribuía la clatrina en las células carentes del adaptador AP-2. Para ello se observó la proteína Clc1-GFP en el mutante de delección de *apl3*⁺ y se vio que ésta se distribuía en puntos dispersos por el citoplasma, al igual que en una estirpe silvestre. No obstante, en algunas células de la población mutante se pudo apreciar cómo algunos puntos de la señal de Clc1-GFP se localizaban de forma más nítida en zonas próximas a la membrana plasmática de los sitios activos de endocitosis (polos y zona del septo). En la **Figura 41** se muestran dos ejemplos de células del mutante *apl3* Δ donde se observa la localización de la proteína de fusión Clc1-GFP y se compara con la vista en una estirpe silvestre. En la fotografía de *apl3* Δ situada a la izquierda (imagen **b**) se muestra la localización de Clc1-GFP más común observada en las células de la estirpe mutante. La fotografía de la derecha (imagen **c**) muestra una célula en la que se puede apreciar la acumulación de clatrina junto a la superficie celular (regiones señaladas con flechas). En otras células sólo 2 ó 3 puntos de Clc1-GFP se localizan en la periferia celular (resultado no mostrado). Clc1-GFP sólo se observa de forma nítida próxima a la membrana plasmática en una estirpe silvestre si ésta se ha sometido a un tratamiento con la droga Brefeldina A, tal y como se muestra en la **Figura 12A**. Por otra parte, esta acumulación de vesículas de clatrina en la membrana plasmática también pudo observarse en el mutante *end4* Δ (**Figura 12B** panel situado a la izquierda), seguramente como consecuencia de los graves problemas de esta estirpe en el proceso de endocitosis.

Estas diferencias en la localización de Clc1-GFP entre algunas células de la población del mutante *apl3* Δ y el silvestre nos llevaron a pensar que la ausencia de AP-2 podría estar afectando, en cierta medida, al comportamiento de las vesículas de clatrina.

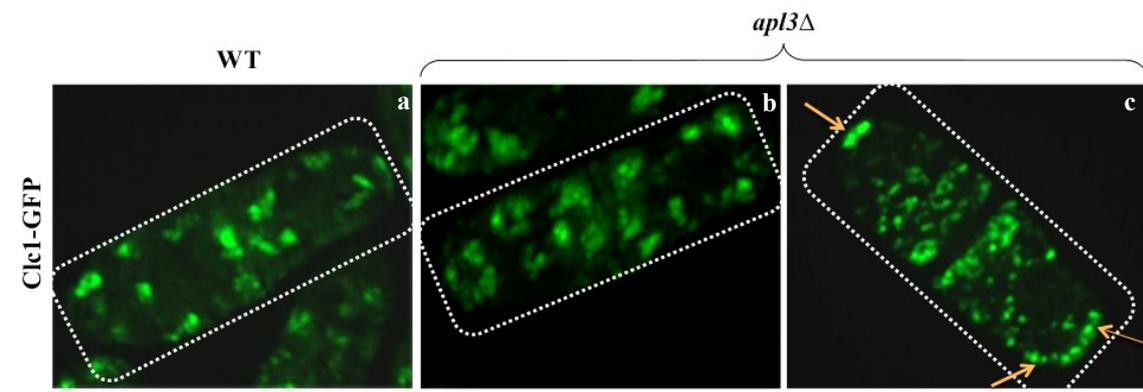


Figura 41. La distribución de Clc1-GFP es ligeramente diferente en el mutante *apl3* Δ . Localización de la proteína de fusión Clc1-GFP en una estirpe silvestre y en un mutante *apl3* Δ . La imagen **a** corresponde a la localización de la proteína de fusión en una estirpe silvestre, mientras que las imágenes **b** y **c** muestran la distribución de Clc1-GFP en la estirpe mutante *apl3* Δ . La célula de la fotografía **b** es un ejemplo de la distribución más común de la clatrina observada en *apl3* Δ . La célula de la fotografía **c** es un ejemplo del tipo de células que muestran señal de Clc1-GFP en la superficie de la célula; las flechas indican la localización de Clc1-GFP en los polos celulares. Las imágenes son proyecciones máximas adquiridas con un sistema de microscopía DeltaVision.

15.2. El proceso general de endocitosis no parece afectarse por la ausencia de Apl3p

Posteriormente, se analizó la incorporación y el transporte del colorante FM4-64 en las células del mutante *apl3Δ* y se comparó con las de una cepa silvestre que portaban la proteína Sad1-GFP (de manera que las células presentan un punto verde fluorescente en su interior). Para que las condiciones experimentales fueran lo más parecidas posibles la tinción se realizó en cultivos mixtos de células silvestres y mutantes. Como se muestra en la **Figura 42A**, las células del mutante *apl3Δ* (carentes del punto verde fluorescente) no mostraban diferencias apreciables con las células silvestres en la tinción de la membrana plasmática (0'), transporte por la ruta endosomal (2'), e incorporación del colorante a la membrana vacuolar (30').

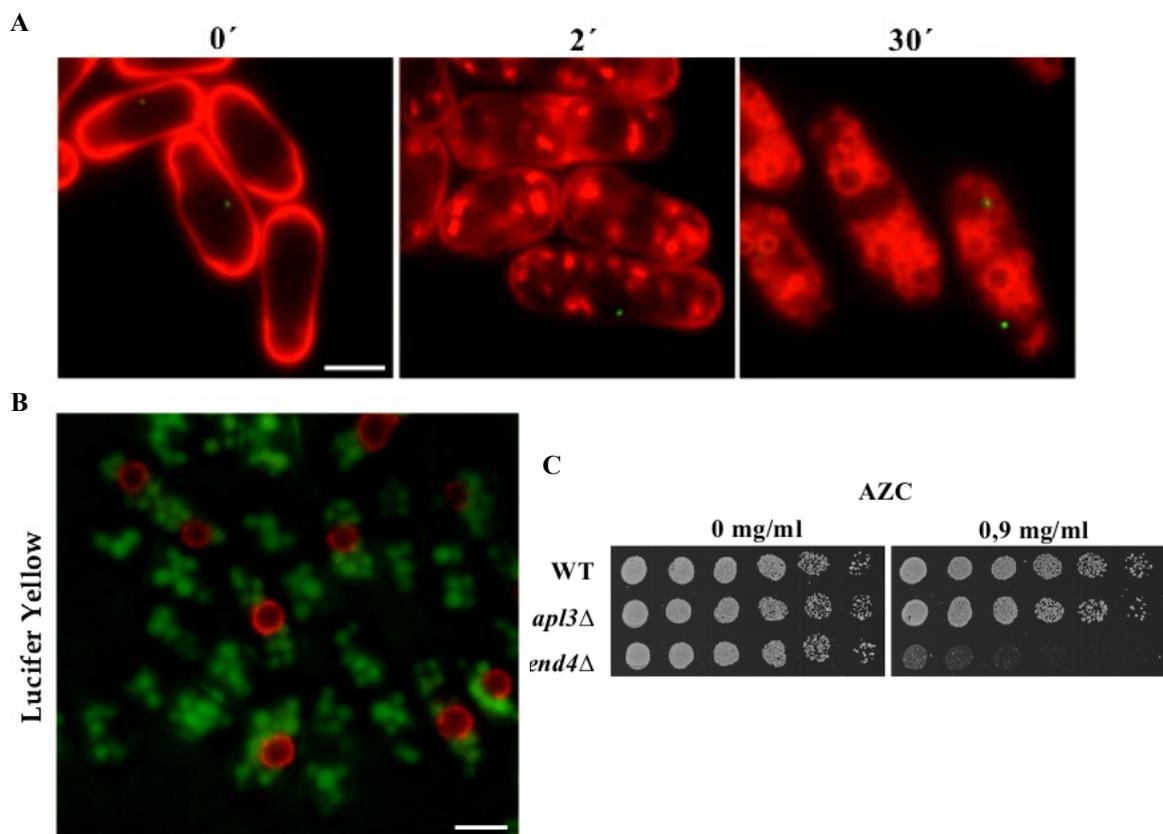


FIGURA 42. El mutante *apl3Δ* no presenta defectos apreciables en el proceso de endocitosis. A. Incorporación del colorante FM4-64 en cultivos mixtos de células silvestres que poseen la proteína Sad1-GFP (células con un punto verde fluorescente) y células del mutante *apl3Δ*, cultivadas en medio YES. Las células se tiñeron con el colorante y se fotografiaron tras el tiempo indicado (en minutos) de incubación a 32°C. B. Tinción con el colorante Lucifer Yellow en cultivos mixtos de células de una cepa silvestre que portaba la proteína de fusión Cut11-RFP (células con la membrana nuclear marcada en rojo), y del mutante *apl3Δ*. C. Ensayo de crecimiento donde 3x10⁴ células y diluciones seriadas 1:4 de las estirpes indicadas se inocularon en placas de YES y YES suplementado con el análogo de L-prolina, ácido L-azetidina-2-carboxílico (AZC), a una concentración de 0,9 mg/ml y se incubaron a 32°C durante tres días.

Además de utilizarse el colorante FM4-64 para analizar el proceso de endocitosis de proteínas asociadas a la membrana plasmática, se estudió la incorporación del colorante Lucifer Yellow, que permite valorar la eficiencia de la endocitosis de fase fluida. La tinción con este colorante se realizó en cultivos mixtos de células silvestres que portaban la proteína de fusión Cut11-RFP, que marca la periferia nuclear, y del mutante *apl3Δ*. El motivo por el cual se ha realizado el ensayo en cultivos mixtos es porque esta estrategia permite detectar pequeñas diferencias en la incorporación del colorante sin que éstas se deban a variaciones experimentales. En la **Figura 42B** se puede observar cómo no existían diferencias apreciables entre las células silvestres (con la periferia nuclear marcada en rojo) y las células mutantes, ya que tras 90 minutos de incubación en presencia del colorante ambas estirpes tenían las vacuolas teñidas.

Por otra parte se analizó el crecimiento de *apl3Δ* en presencia de L-azetidin-2-carboxílico (AZC), que como ya se ha explicado con anterioridad es un compuesto tóxico análogo al aminoácido L-prolina. Tal y como se aprecia en la **Figura 42C**, al realizar este experimento se comprobó que el mutante *apl3Δ* no era sensible a este compuesto. Este resultado indicaba que la ausencia del adaptador AP-2 no producía defectos apreciables en la endocitosis del transportador de L-prolina.

Todos estos datos sugerían que, en principio, en *S. pombe* el proceso de endocitosis no parecía verse afectado por la ausencia del complejo adaptador de clatrina AP-2, al igual que se ha descrito en *S. cerevisiae*.

15.3. El complejo AP-2 es necesario para que el proceso de endocitosis sea plenamente eficiente

El hecho de no haber encontrado defectos aparentes en la endocitosis no eximía a AP-2 de influir en el proceso ya que éste podría estar jugando un papel muy sutil. Para estudiar esta posibilidad se analizó el efecto que generaba sobre la internalización de material de membrana plasmática la disminución de la cantidad de Clc1p, junto con la ausencia de Apl3p. Para ello se realizó el ensayo de incorporación del colorante FM4-64 en el mutante doble *41XHAclc1 apl3Δ* y como control se utilizó la cepa mutante *41XHAclc1* que portaba la proteína Sad1-GFP (de manera que las células tienen un punto verde fluorescente en su interior). Este experimento se realizó en cultivos mixtos de las dos estirpes, donde se compararon ambos mutantes en condiciones en las que la expresión del gen *clc1+* no estaba reprimida, o bien se había reprimido durante 3 horas. Como se puede apreciar en la **Figura 43**, en condiciones en las que el gen *clc1+* no estaba reprimido (-T) las células del mutante simple y las del mutante doble incorporaban el colorante a la membrana plasmática (tiempo 0'). Sin embargo, tras 2 minutos en presencia del colorante se observó que existía cierto retraso en la entrada de éste a las células del mutante doble al compararlo con la estirpe *41XHAclc1* (células marcadas con un punto verde correspondiente a Sad1-GFP) ya que mientras que la estirpe

41XHAcl1 presentaba bastantes endosomas marcados en el interior de las células, en el mutante doble esto no ocurría. No obstante, a los 30-40 minutos de incubación a 32°C en presencia del colorante lipofílico ambas cepas mostraban marcadas la superficie de sus vacuolas. Cuando este mismo experimento se llevó a cabo en cultivos mixtos que se habían incubado durante 3 horas en presencia de tiamina (condiciones de represión del gen *clc1*⁺, reducción del 80% de la cantidad de clatrina) se pudo observar más claramente el retraso en la toma del colorante en las células que carecían de Apl3p y tenían una cantidad reducida de clatrina. A los 30-40 minutos de incubación en presencia del FM4-64 las células del mutante 41XHAcl1 presentaban endosomas y bastantes vacuolas marcadas, mientras que la mayoría de las células del mutante doble solamente presentaban teñida la membrana plasmática (Figura 43, fotografía inferior derecha). Este resultado, añadido al mostrado en la Figura 35A, donde se observaba que sólo existía un retraso significativo de la internalización del FM4-64 cuando la estirpe mutante 41XHAcl1 estaba sometida a 6 horas de represión del gen *clc1*⁺ en comparación con una estirpe silvestre, demostraba que la presencia del complejo adaptador AP-2 es necesaria para que la endocitosis de este colorante sea totalmente eficiente, sobre todo en los casos en los que las células se ven comprometidas por un descenso de clatrina.

Con todos estos datos se puede llegar a la conclusión de que si bien AP-2 por si solo no parece tener mucha relevancia en la endocitosis, sí es necesario para que este proceso sea plenamente eficiente.

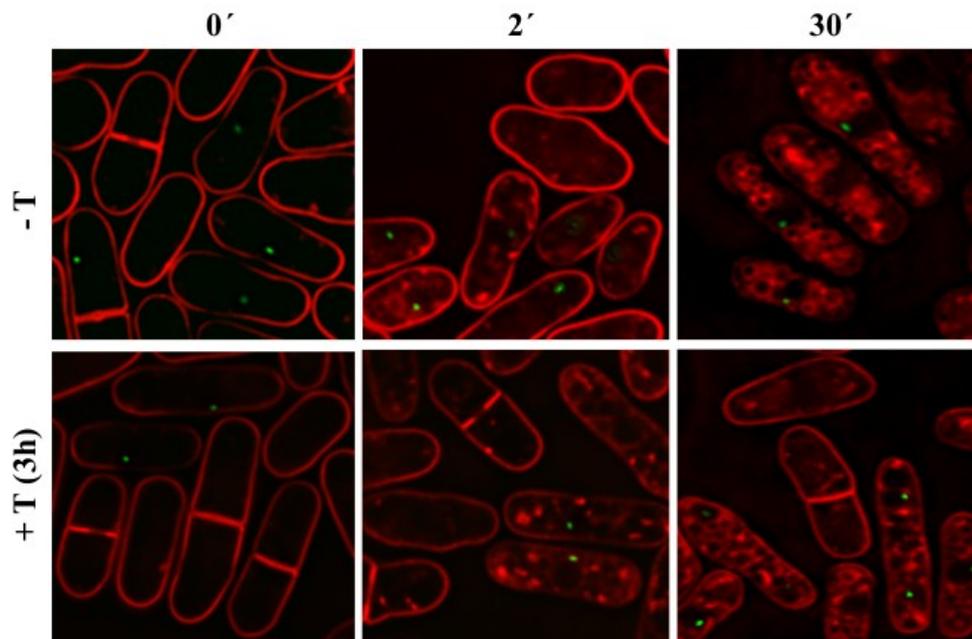


FIGURA 43. El mutante doble 41XHAcl1 *apl3*Δ presenta retraso en la toma de FM4-64 respecto al mutante 41XHAcl1. Incorporación del colorante FM4-64 en cultivos mixtos de células del mutante 41XHAcl1 que poseen la proteína Sad1-GFP (células con el punto verde fluorescente) y células del mutante doble 41XHAcl1 *apl3*Δ, cultivadas en medio mínimo sin tiamina (-T) y con tiamina (+T) durante 3 horas. Las células se tiñeron con el colorante y se fotografiaron tras el tiempo indicado (en minutos) de incubación a 32°C. Las imágenes son planos medios adquiridos con un sistema de microscopía DeltaVision.

15.4. La falta de Apl3p no afecta a la secreción general en *S. pombe*

Aunque en otros organismos el complejo AP-2 no tiene un papel descrito en exocitosis se decidió analizar la secreción de la enzima fosfatasa ácida para valorar un posible defecto en este proceso, ya que por lo que habíamos observado, en *S. pombe* este adaptador no tenía una función esencial en la endocitosis. Además del mutante *apl3Δ* se analizó una estirpe silvestre, el mutante condicional de *clc1⁺* que no presentaba defecto en la secreción de esta enzima, y el mutante *rho3Δ* que sí presentaba defectos en este proceso. Tras realizar este ensayo un mínimo de cinco veces (del mismo modo que se llevó a cabo para los mutantes de *clc1⁺*), se llegó a la conclusión de que el mutante *apl3Δ* no poseía defectos en la secreción de la enzima fosfatasa ácida. Cuando se analizó el efecto de la delección de *apl3⁺* en la secreción hacia la superficie de la carboxipeptidasa Y (Cpy1p) tampoco se observó señal alguna de esta proteína en los ensayos de Dot-blot realizados (resultados no mostrados).

En resumen, ninguna de las aproximaciones realizadas determinaron un problema en secreción debido a la ausencia de *apl3⁺*.

15.5. La morfología y las propiedades de las vacuolas no se ven afectadas por la ausencia de *apl3⁺*

Otro aspecto relacionado con el tráfico vesicular que se valoró a la hora de caracterizar el mutante del complejo adaptador AP-2 fue si la ausencia de Apl3p podría afectar a la morfología o a las propiedades de las vacuolas. Mediante la tinción de estos orgánulos con el colorante CDCFDA se observó que ni su tamaño, ni su morfología parecían verse afectados (resultado no mostrado). Posteriormente se analizó la capacidad de fusión de las vacuolas sometiénolas a un choque hipo-osmótico, pasando las células de su medio de cultivo habitual (medio rico YES) a agua durante 90 minutos. Al cuantificar el porcentaje de vacuolas fusionadas en la estirpe silvestre y en la mutante, se pudo observar que ambas presentaban valores similares (entre el 80 y el 90% de las células tenían sus vacuolas fusionadas), lo que sugería que no existían problemas en la fusión homotípica de vacuolas en la estirpe *apl3Δ*.

15.6. Apl3p y su relación con la pared celular

15.6.1. La distribución de la pared celular no presenta defectos aparentes en el mutante *apl3Δ*

Al haber comprobado que la pared celular es uno de los primeros elementos morfológicos que se afectan por una disminución de la cantidad de clatrina en la célula, quisimos analizar si la ausencia de AP-2 generaba algún tipo de defecto en esta estructura celular. En primer lugar se realizó una tinción con el colorante Hoechst 33258 en células del mutante de *apl3⁺* incubadas en medio rico YES a 28°C. Como se puede observar en las fotografías de la **Figura 44**, no se apreció ningún tipo de defecto en la distribución de la pared celular al comparar las células de la estirpe *apl3Δ* con las de una cepa silvestre. Para verificar estos resulta-

dos se realizó una tinción con el colorante específico de pared Calcofluor White, que corroboró la ausencia de defectos aparentes en la pared celular de este mutante (dato no mostrado). La tinción con Hoechst 33258 también permitió observar que la segregación de núcleos no estaba afectada en el mutante *apl3Δ*.

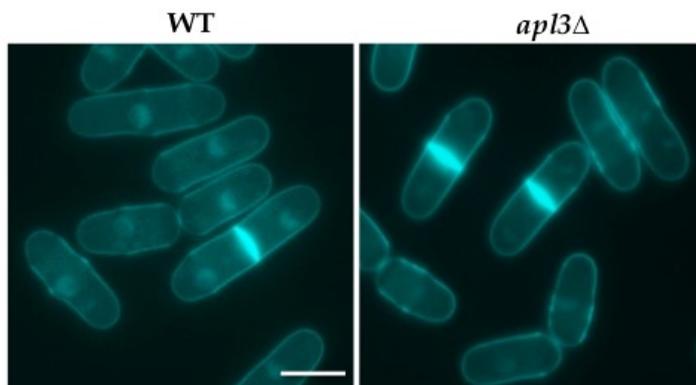


FIGURA 44. Distribución de la pared celular del mutante *apl3Δ*. Células de una estirpe silvestre y del mutante *apl3Δ* incubadas en medio rico YES a 28°C y teñidas con Hoechst 33528. Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

15.6.2. La ausencia de *Apl3p* provoca una disminución de la actividad β -glucán sintasa *in vitro*

Como se ha mostrado anteriormente, hemos probado una relación directa entre el transporte de las enzimas relacionadas con la síntesis de la pared celular y la clatrina. Por ese motivo quisimos analizar si existía una relación entre el complejo AP-2 y las $\beta(1,3)$ glucán sintasas.

Aunque los resultados obtenidos al realizar la tinción de las células de la cepa mutante con Hoechst y Calcofluor no parecían indicar que hubiese defectos aparentes en la síntesis de la pared celular, llevamos a cabo el análisis de la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa *in vitro* en la cepa mutante del complejo adaptador AP-2. Esta actividad se valoró en una cepa silvestre, en el mutante *apl3Δ* y en la estirpe *end4Δ*, como estirpe control que posee defectos en endocitosis. Todas las estirpes se cultivaron en medio rico (YES) a una temperatura de 28°C. Como se muestra en la **Figura 45A**, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad específica de la estirpe silvestre y la del mutante *apl3Δ*, la cual estaba reducida hasta el 79,8%. En el mutante *end4Δ*, defectivo en el proceso de endocitosis, la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa fue mucho mayor a la de la estirpe silvestre, como ya se había podido comprobar en los experimentos realizados con los mutantes de *clc1+*. La tendencia de los datos obtenidos fue la misma en los 5 experimentos que se realizaron.

15.6.3. Sensibilidad del mutante *apl3Δ* a antifúngicos que inhiben la síntesis de β -glucano

La Caspofungina es un antifúngico perteneciente a la familia de las equinocandinas que inhibe la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano y afecta a la integridad de la pared celular. Empleamos esta droga para analizar si el mutante *apl3Δ* tenía problemas en la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano que afectasen a la composición de la pared celular. Para ello se realizaron ensayos de crecimiento en los que se inocularon 3×10^4 células en diluciones seriadas 1:4 de una cepa silvestre, del mutante *apl3Δ*, de la estirpe *cwg1-1* (que es un mutante puntual de la enzima Bgs4p y posee problemas en la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano) y del mutante doble *apl3Δ cwg1-1*, sobre placas de medio YES suplementado con diferentes concentraciones de Caspofungina (0,0 $\mu\text{g/ml}$; 0,75 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$; 2,0 $\mu\text{g/ml}$; 3,0 $\mu\text{g/ml}$; 4,0 $\mu\text{g/ml}$ y 5,0 $\mu\text{g/ml}$) que se incubaron durante 3 días a 32°C. En estas condiciones encontramos que tanto las cepas *cwg1-1* como *apl3Δ cwg1-1* eran más sensibles que la cepa silvestre a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de Caspofungina. Ambas estirpes eran igual de sensibles, y a partir de una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ ya no eran capaces de crecer. En esas mismas condiciones el mutante *apl3Δ* crecía al mismo nivel que la estirpe silvestre y no fue hasta que se incubó en placas con una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Caspofungina, cuando se apreció que *apl3Δ* era levemente más sensible que la cepa silvestre (**Figura 45B**).

Estos resultados sugerían que la composición de la pared celular del mutante *apl3Δ* podía estar alterada, probablemente debido a defectos en β -glucano, aunque éstos no incrementaban los problemas observados en la cepa *cwg1-1*.

15.6.4. Sensibilidad del mutante *apl3Δ* a la digestión por glucanasas

El tratamiento con glucanasas se emplea para valorar a *grosso modo* en qué estado se encuentra la pared celular. En *S. pombe*, la sensibilidad a estas enzimas puede deberse a diversos motivos que comprenden desde una reducción en la cantidad de glucano, hasta a un incremento en la permeabilidad de la pared celular. La sensibilidad a la degradación enzimática puede utilizarse para corroborar otros resultados que sugieren una pared celular defectuosa (Perez & Ribas, 2004).

Este experimento se realizó utilizando la glucanasa Zimoliasa 100T que principalmente degrada el $\beta(1,3)$ glucano y el galactomanano de la pared celular (Perez & Ribas, 2004). Las cepas empleadas para realizar este ensayo fueron una estirpe silvestre y los mutantes *apl3Δ*, *cwg1-1* y *apl3Δ cwg1-1*. Las células analizadas procedían de cultivos incubados en medio YES a una temperatura de 28°C. Posteriormente las células se cultivaron en tampón 50 mM citrato-fosfato en presencia de la β -glucanasa (concentración final 5 $\mu\text{g/ml}$). Ver "Materiales y métodos".

Como se muestra en la **Figura 45C**, las tres estirpes mutantes presentaban una sensibilidad a Zimoliasa 100T mucho mayor que la cepa silvestre. En todos los experimentos realizados, el mutante *apl3Δ* fue el que presentó una mayor sensibilidad, siendo el comportamiento de las cepas *cwg1-1* y *apl3Δ cwg1-1* ligeramente variable de experimento a experimento. Estos resultados indicaban que en el mutante *apl3Δ* existía un defecto en la composición y/o la integridad de la pared celular.

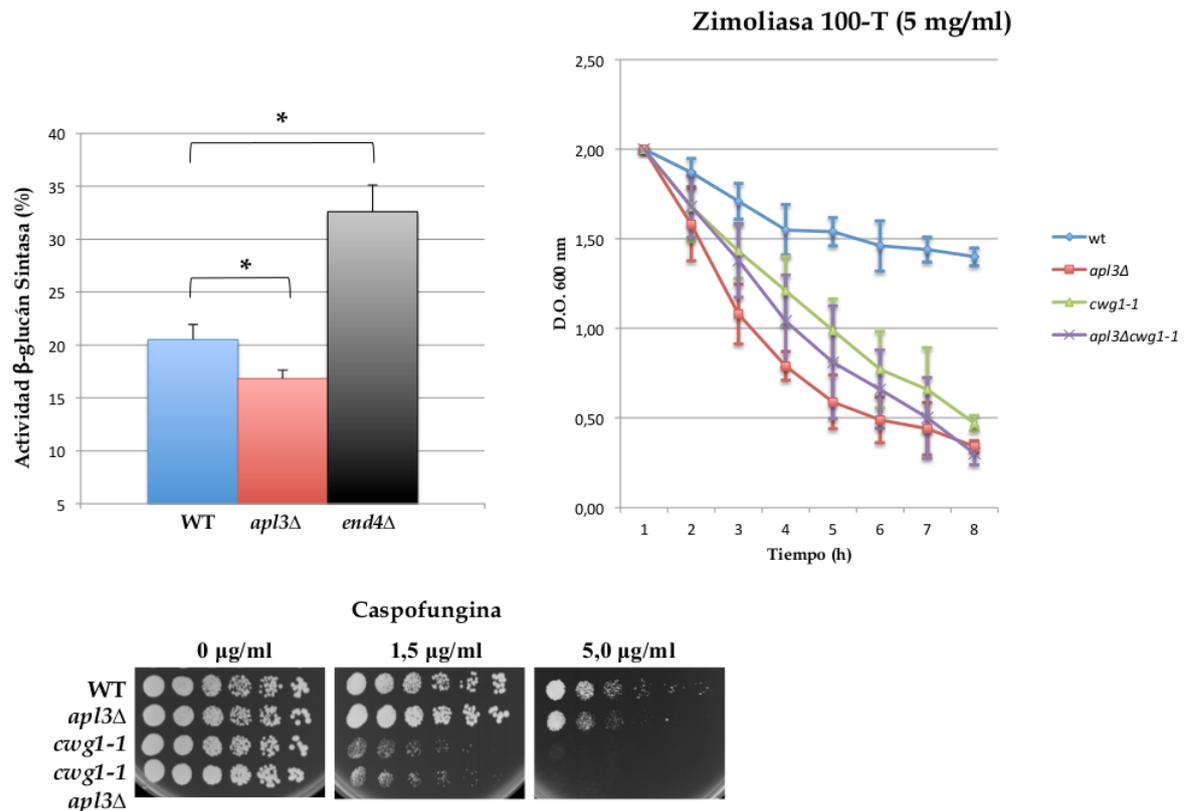


FIGURA 45. El mutante *apl3Δ* posee diferentes defectos en la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano. A. Actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa *in vitro* de células silvestres, de *apl3Δ* y *end4Δ* incubadas en medio YES a 28°C. El experimento se realizó 5 veces con duplicados. En la gráfica se indican los valores medios, las desviaciones estándar y la significación estadística de la diferencia entre cepas (*, $p < 0.05$. Test t-Student) B. Ensayo de crecimiento donde 3×10^4 células y diluciones seriadas 1:4 de las estirpes indicadas se inocularon en placas de YES y YES suplementado con las cantidades indicadas de Caspofungina. Las placas se incubaron durante 3 días a 32°C. C. Densidades ópticas (D.O.) de suspensiones celulares de las estirpes indicadas, cultivadas en medio YES a 28°C. Las células se incubaron en presencia de la cantidad indicada de Zimoliasa 100T; se valoró la D.O._{600nm} de las muestras que se fueron recogiendo cada 30 minutos. El experimento se realizó cinco veces y la tendencia de los datos fue la misma en todos los casos. La gráfica muestra los valores medios para cada punto y sus desviaciones estándar.

15.6.5. Distribución de las enzimas β -glucán sintasa

Tal y como se ha explicado en la “Introducción” y en apartados anteriores de esta misma sección, Bgs1p es una β -glucán sintasa necesaria para la síntesis del β -glucano lineal, y Bgs4 es la responsable de la mayoría de la actividad β -glucán sintasa detectada *in vitro*. Ambas son proteínas de gran tamaño con diversos motivos transmembranales que, en una cepa silvestre, se localizan en la zona de síntesis del septo, en los polos celulares y en vesículas intracelulares (Ishiguro *et al*, 1997; Cortes *et al*, 2002, 2007). Para conocer si la disminución de la actividad β GS estaba asociada a algún tipo de defecto en la localización de las enzimas β (1,3)glucán sintasa se analizó la localización de éstas en la estirpe mutante *apl3* Δ y se comparó con la de una estirpe silvestre. Como se observa en la **Figura 46A**, la distribución de las proteínas de fusión GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4 era muy similar en las células de ambas estirpes.

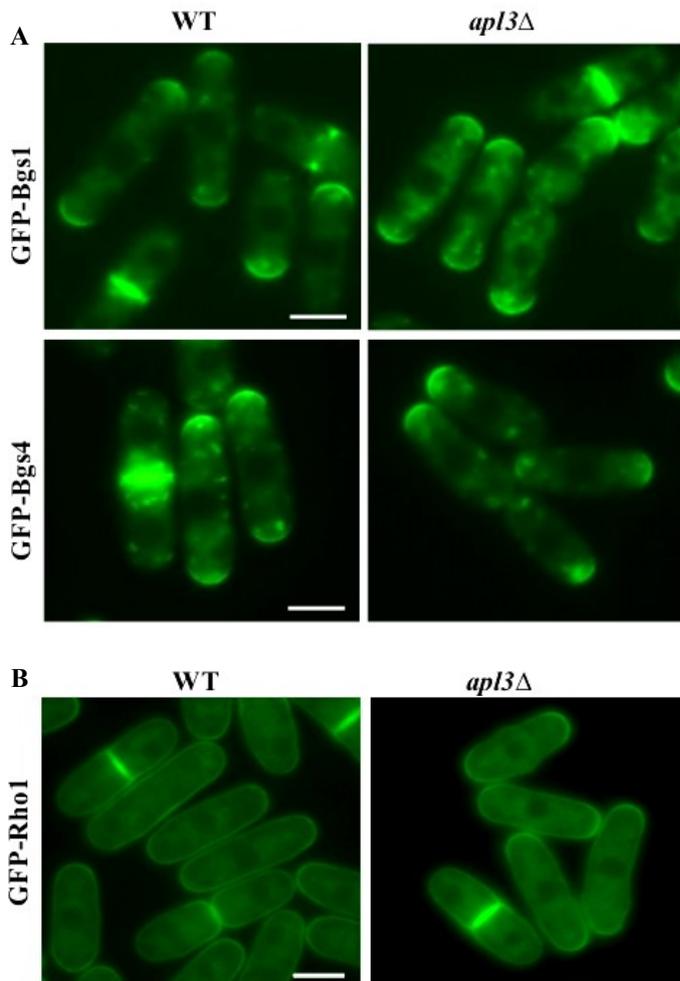


FIGURA 46. La localización de las β (1,3)glucán sintasa Bgs1p y Bgs4p, y de la subunidad reguladora Rho1p parece no alterarse en el mutante *apl3* Δ . A. Distribución de las proteínas de fusión GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4 en células de una cepa silvestre y del mutante *apl3* Δ cultivadas en medio rico YES. B. Localización de la proteína de fusión GFP-Rho1 en las cepas anteriormente citadas. Las imágenes de A y B están adquiridas con microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

15.6.6. Localización de Rho1p en el mutante *apl3Δ*

El hecho de que la actividad β -glucán sintasa estuviese reducida en la estirpe mutante *apl3Δ* pero que ésta no tuviese defectos en la localización de las enzimas Bgs, llevó a pensar que quizás la subunidad activadora de estas enzimas, Rho1p, no estaba llevando a cabo su función correctamente. Cuando se observó la localización de la proteína GFP-Rho1 en el mutante *apl3Δ* se vio que ésta era muy similar a la estirpe silvestre (**Figura 46B**). Esto parecía indicar que el defecto en la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa no se debía a un defecto aparente en la distribución del activador de las enzimas $\beta(1,3)$ glucán sintasa.

15.6.7. *Apl3p* podría estar formando parte de las vesículas que portan las enzimas β -glucán sintasa

Aunque la distribución de Bgs1p y Bgs4p no parecía estar alterada significativamente en el mutante *apl3Δ*, quisimos averiguar si estas enzimas podrían ser cargos de las vesículas de transporte en las que el complejo AP-2 actuaba como adaptador.

Para ello se llevó a cabo la cuantificación de la co-localización de la proteína de fusión *Apl3-GFP* con respecto a la proteína To-Bgs1 en células de una estirpe silvestre que portaba ambas construcciones. Como se muestra en la gráfica situada a la izquierda en la **Figura 47A**, el 70% de los puntos de *Apl3-GFP* presentes en la superficie celular (septo y polos) co-localizaban con To-Bgs1. Este porcentaje era de un 18% en el interior celular, debido a que en condiciones normales de incubación la cantidad de vesículas de Bgs1p en el interior celular es bastante baja. Al cuantificar la cantidad de puntos de To-Bgs1 que co-localizaban con puntos de *Apl3-GFP*, el porcentaje disminuía en la superficie celular hasta el 47% y en el citoplasma hasta el 5% (gráfica situada a la derecha en la **Figura 47A**). Esto se debía a que el número de puntos de To-Bgs1 presentes en las células era mayor que el de *Apl3-GFP*. Para realizar este experimento se cuantificó la co-localización de ambas proteínas en un mínimo de 100 células (ejemplos de las células analizadas mostrados en el panel inferior de la **Figura 47A**).

Por otra parte, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas *Apl3p* y Bgs1p (ver "Materiales y métodos"). Los extractos celulares procedentes de una cepa silvestre (en la que ninguna de las proteínas a estudio estaba marcada) y de las cepas que portaban las proteínas de fusión *Apl3-HA*, GFP-Bgs1, o ambas se incubaron en presencia del anticuerpo monoclonal anti-GFP. Tras realizar la inmunoprecipitación se realizaron ensayos de Western blot empleando anticuerpos anti-GFP o anti-HA para detectar la presencia de Bgs1p o *Apl3p* en los inmunoprecipitados y en los extractos celulares. Como se puede observar en la **Figura 47B**, *Apl3-HA* se detectó en los inmunoprecipitados procedentes de la cepa que portaba ambas proteínas marcadas, pero no en los procedentes de las estirpes empleadas como controles. Este resultado indicaría que ambas proteínas podían estar interaccionando de forma directa o indirecta, por lo que Bgs1p podría ser un "cargos" de las vesículas cubiertas por clatrina en las que AP-2 actuaría como adaptador.

Los resultados obtenidos sugerían que AP-2 podía estar interviniendo en el transporte de la $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1p, o al menos en su reclutamiento en la membrana plasmática. Respecto a Bgs4p, los resultados obtenidos hasta el momento no han sido concluyentes por lo que no se han recogido en esta memoria.

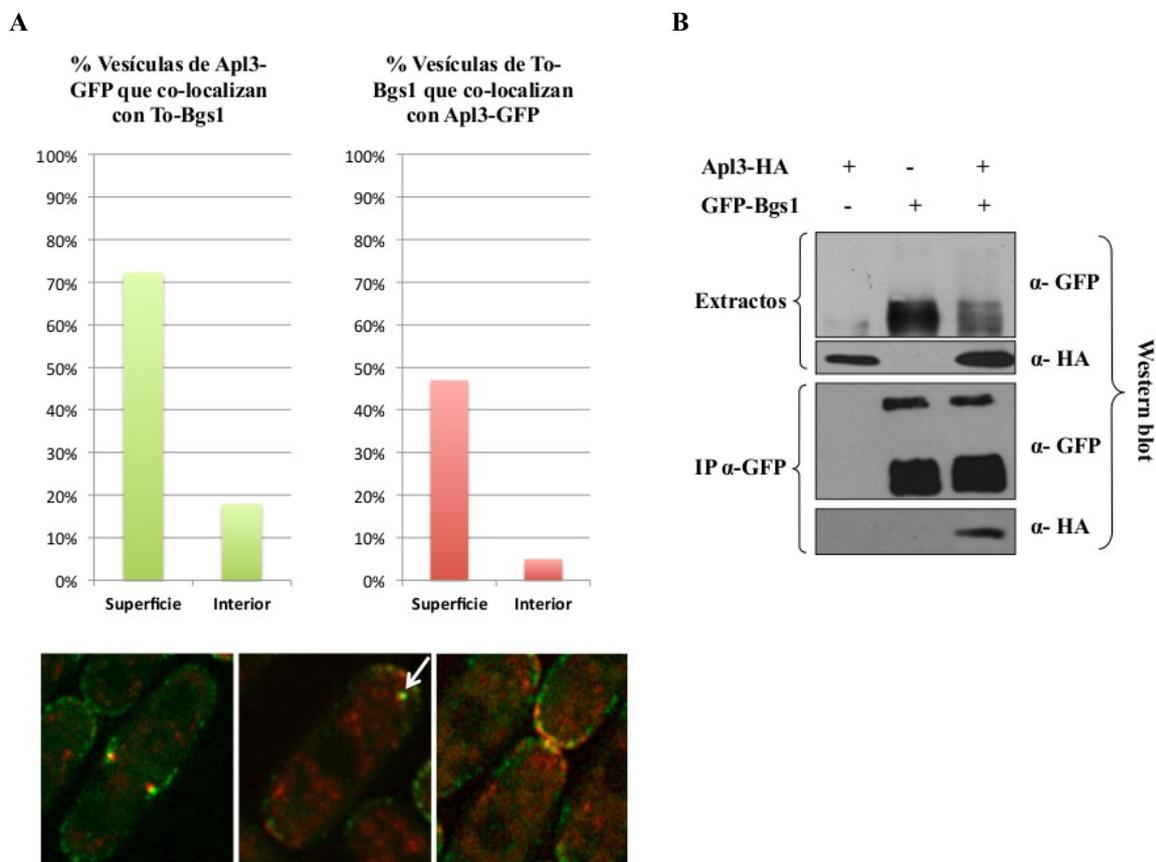


FIGURA 47. Apl3p co-localiza y co-inmunoprecipita con Bgs1p. A. La gráfica situada a la izquierda representa el porcentaje de puntos de Apl3-GFP que co-localizan con puntos de To-Bgs1 en células que expresan ambas proteínas. La gráfica situada a la derecha representa el porcentaje de puntos de To-Bgs1 que co-localizan con puntos de Apl3-GFP en células que expresan ambas proteínas. El panel inferior muestra varios ejemplos de las micrografías analizadas para la cuantificación. Se analizaron un mínimo de 100 células para cada una de las cuantificaciones realizadas. Las imágenes son planos medios adquiridos con un sistema de microscopía DeltaVision. B. Ensayo de co-inmunoprecipitación donde extractos celulares de estirpes que expresan las proteínas de fusión GFP-Bgs1 y/o Apl3-HA se analizaron mediante Western blot. Se emplearon los anticuerpos monoclonales anti-GFP (α -GFP) o anti-HA (α -HA) para revelar el Western blot y el anticuerpo policlonal anti-GFP para realizar la inmunoprecipitación (IP).

16. OTROS FENOTIPOS DEL MUTANTE *apl3Δ*

Además de los fenotipos descritos en el punto anterior se han encontrado otra serie de defectos en el mutante *apl3Δ* los cuales se detallan a continuación:

16.1. Defectos en la membrana plasmática

El Miconazol es un derivado imidazólico que altera la membrana plasmática fúngica al inhibir la biosíntesis de ergosterol y de otros esteroides. Se realizaron ensayos de crecimiento de una estirpe silvestre y del mutante *apl3Δ* en placas de medio rico YES suplementadas con Miconazol a unas concentraciones de 1 μM y 1,25 μM . Estas placas se incubaron a 32°C durante 2-3 días. Como se observa en la **Figura 48A**, el mutante *apl3Δ* presentaba cierta sensibilidad con respecto a la estirpe silvestre. Recientemente se ha publicado que *apl3Δ* es sensible a Anfotericina B y resistente a Clotrimazol y Terbinafina que son compuestos que afectan a la biosíntesis del ergosterol (Fang *et al*, 2012).

Por otra parte, al realizar una tinción con el colorante Filipin (ver "Materiales y métodos"), que en levaduras marca específicamente los esteroides de la membrana plasmática, se observó que en el mutante *apl3Δ* la región de los polos teñida por el colorante era levemente más amplia que la que se teñía en las células de una cepa silvestre (**Figura 48B**).

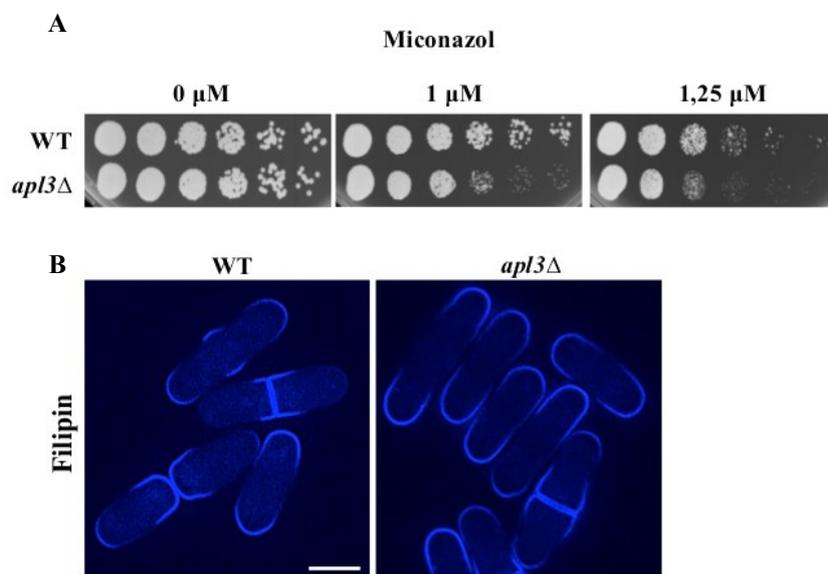


FIGURA 48. El mutante *apl3Δ* podría tener defectos en la membrana plasmática. A. Ensayo de crecimiento en el que 3×10^4 células y diluciones seriadas 1:4 de las estirpes indicadas se inocularon en placas YES y YES suplementado con Miconazol a concentraciones de 1,0 μM y 1,25 μM . Las placas se incubaron a 32°C durante 2-3 días. B. Tinción de células de una estirpe silvestre y del mutante *apl3Δ* con el colorante Filipin a una concentración final de 0,05 mg/ml. Las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μm .

Todos estos datos estarían indicando que el mutante carente de *apl3*⁺ podría tener problemas en la organización y/o estructura de la membrana plasmática, que causaría distinta sensibilidad a compuestos que interfieren con la síntesis de esta estructura.

16.2. Crecimiento en placas suplementadas con diferentes compuestos inductores de estrés

Para conocer la viabilidad de las células del mutante *apl3Δ* incubadas bajo diversas condiciones de estrés se analizó el crecimiento de ésta y otras cepas en placas de YES suplementadas con diferentes concentraciones de KCl, MgCl₂, cafeína, CdCl₂, MnCl₂ y CaCl₂ (ver “Materiales y métodos”). En cada caso se tomaron 3x10⁴ células de cultivos creciendo en fase logarítmica y se hicieron diluciones seriadas 1:4, que se inocularon sobre las placas correspondientes y se incubaron durante 2-3 días a 32°C.

En estos experimentos se analizaron una cepa silvestre, el mutante *apl3Δ* y también el mutante *apl1Δ* para comprobar si ambos componentes de AP-2 presentaban en mismo comportamiento. También se empleó como control la cepa mutante *cfh3Δ*, que es sensible a determinadas condiciones de estrés y está relacionado con la endocitosis de la enzima Bgs1p (Sharifmoghadam & Valdivieso, 2009), y el mutante doble *apl3Δ cfh3Δ*.

En todos los casos analizados los mutantes *apl3Δ* y *apl1Δ* mostraron el mismo comportamiento. Ambas cepas eran levemente sensibles a MgCl₂ 0,08 y 0,09 M, a CdCl₂ 75 μM y a MnCl₂ 3 y 4 mM, (aunque de un modo muy sutil en este último caso), eran hiper-resistentes en placas con altas concentraciones de CaCl₂ (200 mM y 300 mM), y no mostraban diferencias con la estirpe silvestre cuando crecían en presencia de KCl y cafeína (**Figura 49**).

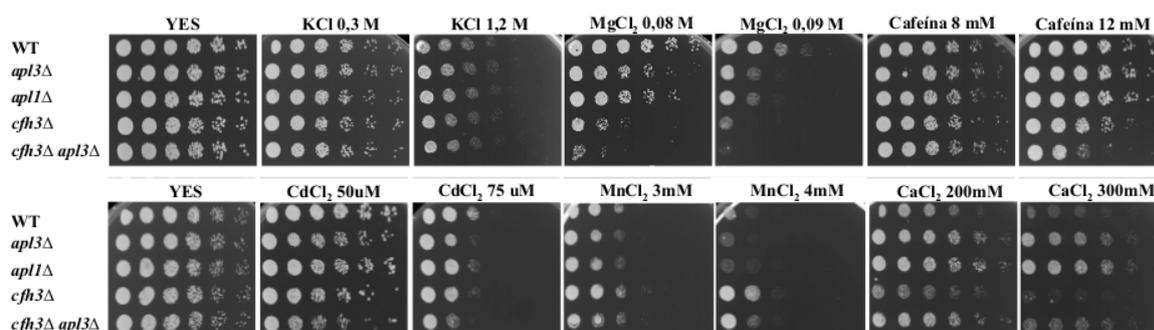


FIGURA 49. Análisis de la sensibilidad de *apl3Δ* al estrés. Ensayos de crecimiento donde 3x10⁴ células y diluciones seriadas 1:4 de las estirpes indicadas se inocularon en placas de YES y YES suplementado con los componentes indicados. Las placas se incubaron durante 3 días a 32°C.

Al comprobar qué ocurría con los mutantes *cfh3Δ* y *apl3Δ cfh3Δ* se pudo ver que el mutante doble *apl3Δ cfh3Δ* era más sensible a MgCl₂, cafeína, CdCl₂ y MnCl₂ que la estirpe *cfh3Δ*. Sin embargo era resistente altas concentraciones de CaCl₂, aunque no tanto como lo eran los mutantes *apl3Δ* y *apl1Δ* (**Figura 49**).

16.3. Disminución de la viabilidad durante la fase estacionaria de crecimiento

A lo largo del análisis de los fenotipos del mutante *apl3Δ* observamos que las células de este mutante perdían viabilidad cuando los cultivos habían estado en fase estacionaria durante varios días. La falta de nutrientes en el medio es una condición que genera estrés a las células. Por este motivo se analizó en detalle la viabilidad de una cepa silvestre y del mutante *apl3Δ* tras la fase estacionaria de crecimiento, ya que durante este período el crecimiento celular se detiene por agotamiento de alguno de los componentes del medio de cultivo, o por acumulación de inhibidores. Como control de este experimento se utilizó la cepa *sty1Δ*, carente de la MAP quinasa responsable de la respuesta a estrés, que es sensible a las condiciones de la fase estacionaria. Las cepas se incubaron durante 0, 1, 3, 5, 7 y 10 días a 32°C en medio YES líquido (ver “Materiales y métodos”). Después de ese tiempo se hicieron diluciones seriadas (1:4) de los cultivos y se inocularon sobre placas de YES (que contenía un 3% de glucosa). Las placas se incubaron durante 2-3 días a 32°C. En el panel superior de la **Figura 50** se muestra la viabilidad de las distintas estirpes después de haber sido incubadas durante 0 y 5 días en medio YES líquido que contenía un 3% de glucosa. Se puede observar cómo los mutantes *apl3Δ* y *sty1Δ*, a diferencia de lo que ocurría en la estirpe silvestre, eran incapaces de generar colonias después de haber sido cultivados durante 5 días en esas condiciones.

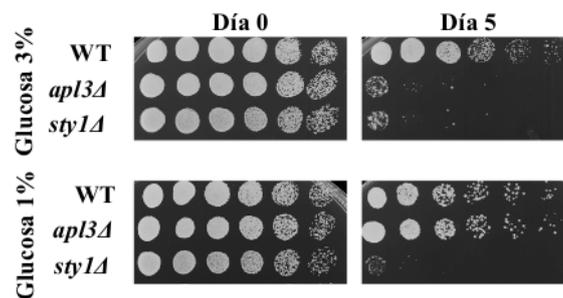
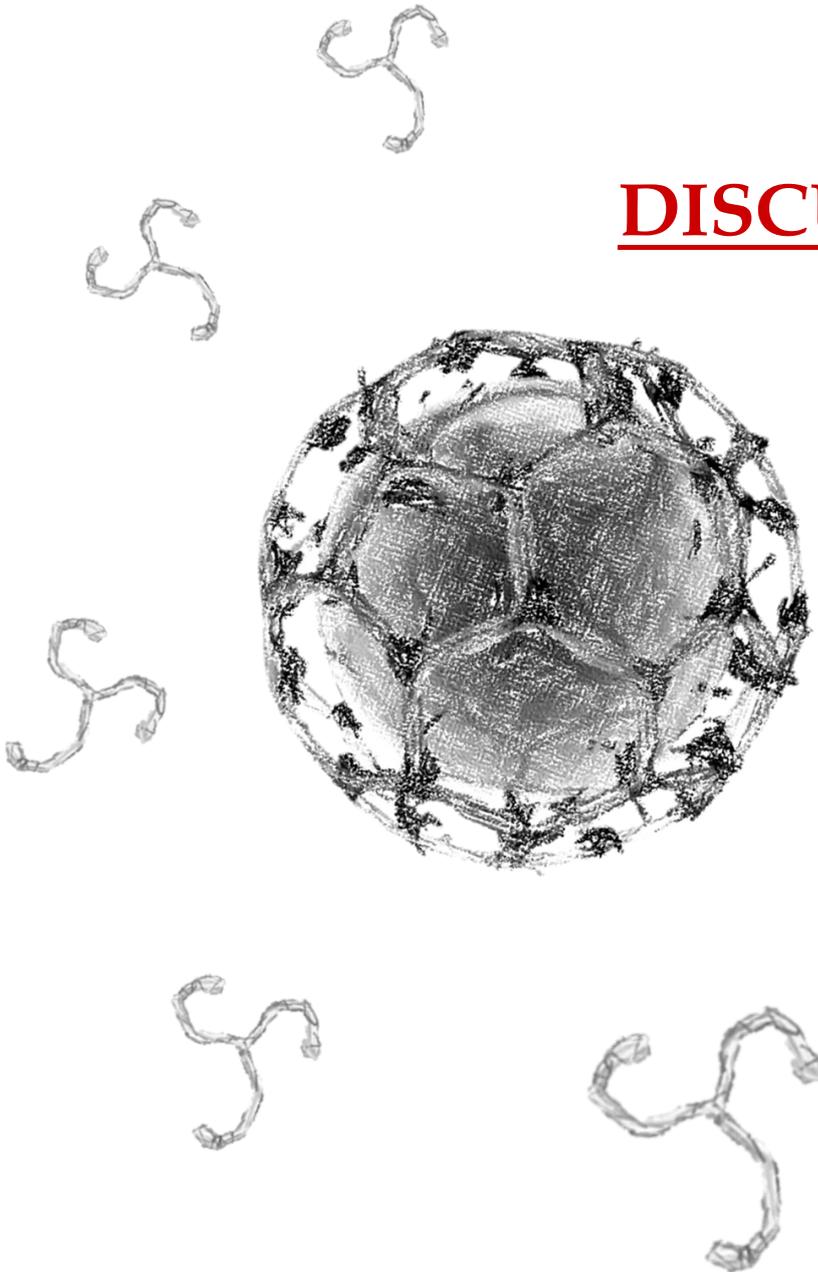


FIGURA 50. La viabilidad en fase estacionaria de *apl3Δ* está reducida. Ensayos de crecimiento en los que 3×10^4 células y diluciones seriadas 1:4 de las estirpes indicadas se inocularon en placas de YES con 3% de glucosa. Paneles superiores, placas de YES donde las estirpes inoculadas se habían cultivado en YES líquido con 3% de glucosa durante los días indicados. Paneles inferiores, placas de YES donde las estirpes inoculadas se habían cultivado en YES líquido con 1% de glucosa durante los días indicados. Todas las placas se incubaron durante 3 días a 32°C.

Se ha demostrado que el crecimiento de *S. pombe* en condiciones de restricción calórica (menor cantidad de glucosa en el medio) favorece la supervivencia de las células durante la fase estacionaria, y este efecto es totalmente dependiente de la activación de la ruta Sty1 (Zuin *et al*, 2010). Por ese motivo realizamos el mismo experimento de viabilidad celular en fase estacionaria, pero esta vez utilizando YES líquido con glucosa al 1% como medio de cultivo para realizar el ensayo de crecimiento en unas condiciones de restricción calórica. Las placas de YES donde se inocularon las diluciones seriadas de los distintos cultivos contenían en todos los casos un 3% de glucosa.

Como se puede ver en el panel inferior de la **Figura 50**, al disminuir la cantidad de glucosa en el medio, el mutante *apl3Δ* era capaz de generar colonias tras 5 días de cultivo en fase estacionaria a diferencia de lo que ocurría cuando se incubaba en un medio con mayor cantidad de glucosa. Este dato podría indicar que Apl3p lleva a cabo algún papel en los procesos de mantenimiento de la longevidad celular en condiciones de alta concentración de glucosa.

DISCUSIÓN



Las vesículas de transporte recubiertas por clatrina están implicadas en la endocitosis de moléculas desde la membrana plasmática y en el transporte de proteínas desde la región trans-Golgi.

Actualmente contamos con un amplio conocimiento del tráfico de membranas y proteínas entre diferentes orgánulos de la célula que está mediado por vesículas cubiertas de clatrina. Esto es así debido a la información existente sobre la bioquímica, la estructura y las proteínas que interaccionan con esta envuelta, así como de las propiedades y características de las cadenas ligeras y pesadas que la constituyen.

Mediante el estudio de los efectos celulares causados por la ausencia de clatrina en diferentes organismos se han podido descubrir nuevas funciones de estas proteínas que van más allá de las relacionadas con el transporte vesicular como, por ejemplo, su implicación en las infecciones bacterianas o en la segregación cromosómica mediante su interacción con los microtúbulos (Cossart & Veiga, 2008; Calabia-Linares *et al*, 2012; Royle, 2011, 2012).

En nuestro caso, nos hemos planteado como objetivo general de este trabajo profundizar en el conocimiento del papel que juegan la clatrina y su complejo adaptador AP-2 en la morfología de las células eucariotas. Para ello hemos utilizando como modelo biológico la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. De manera más concreta, hemos analizado cómo estos elementos influyen en la regulación de la síntesis de la pared celular de este microorganismo.

LA CLATRINA EN *S. pombe*: PAPEL DE Clc1p

En este trabajo hemos analizado el impacto que produce la disminución de la cantidad de clatrina en la morfogénesis de *S. pombe*. Para abordar esta cuestión hemos estudiado el papel que juega la proteína Clc1p en la biología de la levadura de fisión.

Aunque la delección del gen *clc1⁺* resulta letal para las células, los mutantes *clc1Δ* son capaces de crecer si el medio de cultivo está estabilizado osmóticamente. Las células mutantes *clc1Δ* incubadas en un medio suplementado con sorbitol presentan un crecimiento lento, tienen morfología aberrante, poseen defectos en el desarrollo sexual y, generalmente, son de mayor tamaño que las de una estirpe silvestre. En los mutantes *clc1Δ* y *chc1Δ* de *S. cerevisiae* y de *D. discoideum* se han observado fenotipos similares; no obstante, en ambos organismos los mutantes *clc1Δ* son viables en cualquiera de las condiciones analizadas, lo cual indica que la delección de *clc1⁺* es menos deletérea que la de *chc1⁺*. Esta diferencia con respecto a los requerimientos de la cadena ligera de la clatrina en las distintas especies podría ser explicada por el hecho de que, por ejemplo, en *D. discoideum* la ausencia de la cadena ligera no afecta a la cantidad de cadena pesada existente en las células (Wang *et al*, 2003). En *S. cerevisiae*, la delección de *CLC1* hace que disminuya la cantidad de Chc1p y, aunque los trisqueliones formados

bajo estas condiciones son inestables, siguen siendo funcionales de forma parcial ya que la sobreexpresión de *CHC1* complementa algunos de los defectos observados en los mutantes *clc1Δ* (Chu *et al*, 1996; Huang *et al*, 1997).

En el caso de *S. pombe*, utilizando un mutante condicional que permite modular la cantidad de clatrina en las células, hemos podido comprobar que la proteína Chc1-GFP no se detecta tras 9 horas de represión del gen *clc1+* (**Figura 21B**). Este dato sugiere que en la levadura de fisión Clc1p es más importante para la estabilidad de Chc1p que en otros organismos. También pone de manifiesto que los fenotipos causados por la ausencia o disminución de la cadena ligera de la clatrina en *S. pombe* son debidos a defectos en clatrina y no a funciones específicas de Clc1p independientes de Chc1p. Esto está sustentado por el hecho de que la sobreexpresión de *chc1+* suprime algunos de los fenotipos observados en el mutante 41XHA*clc1*.

TRÁFICO VESICULAR EN LOS MUTANTES *clc1*: SECRECIÓN

La disminución de un 40% de la cantidad total de clatrina presente en las células no causa defectos aparentes en la distribución de distintas proteínas que intervienen en los procesos de secreción en la célula. Este es el caso del complejo adaptador AP-1, que está implicado en el transporte de proteínas desde el TGN, los SNAREs Syb1p y Psy1p, que se localizan en diferentes tipos de vesículas de transporte y en la membrana plasmática receptora de las mismas (Gurunathan *et al*, 2002), e incluso en el exocisto (**Figuras 31 y 32**).

También hemos comprobado que el mutante 41XHA*clc1*, incubado en condiciones en las que el gen *clc1+* no está reprimido, no secreta al medio la carboxipeptidasa Cpy1p (**Figura 33B**), sugiriendo este hecho que el tráfico de esta proteína a la vacuola se realiza correctamente, incluso cuando existe una reducción del 40% en la cantidad de clatrina en las células. Este resultado es similar al encontrado en los mutantes *chc1Δ* y *clc1Δ* en *S. cerevisiae* (Payne *et al*, 1988; Chu *et al*, 1996).

La secreción de la enzima fosfatasa ácida tampoco estaba afectada en ninguno de los mutantes de *clc1+* utilizados en este estudio, lo que sugiere que la clatrina no es necesaria para el transporte de esta enzima al exterior celular (**Figuras 18 y 33A**). En el caso de los mutantes *chc1Δ* de *S. cerevisiae* y *D. discoideum* sucede lo mismo; ni la secreción de la enzima fosfatasa ácida, ni la de la invertasa parecen verse alteradas por la ausencia de clatrina (Payne & Schekman, 1985; Payne *et al*, 1987; Ruscetti *et al*, 1994).

Únicamente hemos encontrado defectos en la secreción de la proteína Eng1p, una $\beta(1,3)$ glucanasa necesaria para remodelación de la pared celular. Del mismo modo, el mutante *chc1 Δ* de *D. discoideum* presenta defectos en la secreción de α -manosidasa y β -glicosidasa que son enzimas relacionadas con esta estructura (Ruscetti *et al*, 1994).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otros organismos y refuerzan la idea de que la clatrina media solamente la secreción de determinadas proteínas.

ENDOCITOSIS

En lo que se refiere a cómo se ve afectado el proceso de endocitosis por la disminución o ausencia de Clc1p en las células, hemos podido observar que las células mutantes 41XHA*clc1*, en condiciones en las que el gen *clc1⁺* no está reprimido, presentan leves defectos en la localización del complejo AP-2 (**Figura 34A**). Éste es un complejo adaptador entre las moléculas que se van a endocitar y la clatrina. Estos defectos van aumentando ligeramente a medida que se disminuye la cantidad de Clc1p en las células, lo que indica que una disminución en la cantidad de clatrina afecta en cierto modo a la localización de las proteínas que van a formar parte de la envuelta de las vesículas endocíticas (Boettner *et al*, 2012; Weinberg & Drubin, 2012). Este hecho está de acuerdo con los resultados obtenidos en *S. cerevisiae* tras el análisis de la distribución de las proteínas Sla1p y Las17p (Kaksonen *et al*, 2005).

De igual manera, una pequeña disminución en la cantidad de Clc1p produce defectos en la distribución de End4p, que permite la interacción de la clatrina con la actina; estas anomalías en la localización de la proteína se incrementan al disminuir la cantidad de Clc1p. Los defectos encontrados podrían ser una consecuencia general de la distribución anómala de las proteínas tempranas que forman la envuelta proteica, como hemos visto que ocurre en el caso de Apl3p. Sin embargo, se sabe que en *S. cerevisiae* la cadena ligera de la clatrina interactúa directamente con Sla2/End4p, regulando el reclutamiento de la actina en los parches endocíticos (Newpher & Lemmon, 2006; Boettner *et al*, 2011). En el mutante condicional 41XHA*clc1*, los defectos observados en la distribución de End4p son mucho más notables cuando el mutante está sometido a tiempos largos de represión (**Figura 34B**). En estas condiciones, la señal de End4-GFP se observa mayoritariamente en la superficie celular sugiriendo que la movilidad de esta proteína podría verse afectada por la reducción de la cantidad de Clc1p, tal y como sucede en la levadura de gemación.

En resumen, la cadena ligera de la clatrina de *S. pombe* parece ser necesaria para el ensamblaje correcto de la maquinaria endocítica al igual que ocurre en otros organismos estudiados. No obstante, es necesario que la disminución de clatrina en las células sea muy severa para que exista una deslocalización significativa de las proteínas implicadas en la endocitosis.

Las alteraciones producidas en la formación de los sitios de endocitosis en los mutantes *chc1Δ* y *clc1Δ* de *S. cerevisiae* probablemente explican la reducción en la endocitosis detectada en estas cepas (Chu *et al*, 1996; Payne *et al*, 1988) hecho que también puede estar ocurriendo en *S. pombe*.

En *S. pombe* no se ha caracterizado la endocitosis mediada por clatrina de ningún receptor. Nosotros hemos analizado el efecto que provoca la ausencia de *clc1*⁺ sobre la internalización general de material de membrana y la endocitosis de fase fluida mediante la toma de los colorantes FM4-64 y Lucifer Yellow. Los resultados obtenidos mostraron que existía una internalización del colorante FM4-64 en ausencia de clatrina, aunque con cierto retraso (**Figura 17A**, experimento realizado en medio suplementado con sorbitol). En estas mismas condiciones, sin embargo, no se pudo apreciar rastro de Lucifer Yellow en el interior de las células mutantes (**Figura 17B**). En *S. cerevisiae* se ha visto que el colorante Lucifer Yellow puede internalizarse en las células cuando la actina está despolimerizada, siempre y cuando las células estén creciendo en presencia de sorbitol (Aghamohammadzadeh & Ayscough, 2009). Esto no ocurre en el caso de la ausencia de clatrina en *S. pombe*, ya que hemos comprobado que la estabilización osmótica del medio no mejora la entrada del colorante en las células. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en el mutante *chc1Δ* de *D. discoideum*, donde la endocitosis de fase fluida está boqueada (O'Halloran & Anderson, 1992; Ruscetti *et al*, 1994). No obstante, la delección de la cadena ligera en este organismo no afecta a la toma de dextrano (Wang *et al*, 2003), lo cual aporta una prueba más de la mayor relevancia que tiene Clc1p para la función de la clatrina en *S. pombe*.

Por otra parte, cuando procedimos a analizar la incorporación del colorante FM4-64 en el mutante condicional 41XHA*clc1* cultivado en medios no estabilizados osmóticamente, se observó que ésta no se ve alterada cuando las células poseen aproximadamente un 40% menos de clatrina; sin embargo, en condiciones de represión (6 horas en presencia de tiamina), donde las células poseen menos del 10% de la cantidad de clatrina, el colorante entra en las células de manera muy ineficiente, marcando mayoritariamente la membrana plasmática (**Figura 35A**). Estos resultados muestran que para que se lleve a cabo la internalización de material de membrana de forma efectiva se requiere la presencia de clatrina en las células.

El hecho de que el colorante sea capaz de entrar en las células cuando existen niveles reducidos de clatrina podría explicarse si el FM4-64 fuese internalizado tanto por mecanismos dependientes como independiente de clatrina. Se sabe que la clatrina en mamíferos no es totalmente esencial para la endocitosis y que existen mecanismos de endocitosis independientes de estas vesículas (Sandvig *et al*, 2011). En la levadura de gemación se ha propuesto la existencia de un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina y del complejo Arp2/3 y dependiente de la GTPasa Rho1p y de la formina Bni1p (Prosser *et al*, 2011). Un balance entre los dos mecanismos podría ser suficiente para que se llevase a cabo la penetración del colorante en las células, es decir, no sería necesario que la totalidad de la clatrina estuviese

disponible, siempre y cuando el otro mecanismo de internalización estuviese funcionando correctamente. En *S. pombe* la ausencia de clatrina provoca muchos defectos entre los que se incluyen problemas de polaridad. Por este motivo, cuando el descenso de clatrina en las células es muy acusado podría verse afectada la localización de Rho1p en la membrana plasmática, por lo que si existiese un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina pero dependiente de Rho1p, al igual que en *S. cerevisiae*, los diferentes mecanismos de internalización de material de membrana en las células estarían afectados, haciendo prácticamente imposible la entrada del colorante.

Con estos ensayos hemos comprobado que la clatrina es necesaria para que las células incorporen eficientemente el colorante FM4-64.

Un hecho reseñable es que cuando analizamos la toma de FM4-64 en el mutante nulo *clc1Δ* éste es capaz de entrar en las células de forma más eficiente que en mutante condicional cultivado en condiciones de represión. Esta diferencia puede deberse a que el mutante *clc1Δ* se mantiene en un medio suplementado con sorbitol que podría favorecer la incorporación del colorante al interior celular (**Figura 36**).

Estos datos indicarían que en *S. pombe* la estabilización de la presión osmótica entre las células y el medio de cultivo favorece la entrada del colorante de una forma independiente al tráfico dependiente de clatrina, de modo similar a lo que ocurre con la incorporación de Lucifer Yellow en *S. cerevisiae* cuando se elimina la actina polimerizada en las células ([Aghamohammadzadeh & Ayscough, 2009](#)).

RELACIÓN DE LA CLATRINA CON LOS CITOESQUELETOS DE ACTINA Y TUBULINA

En *S. pombe* la delección de Clc1p provoca una reducción en el número de parches de actina. Éstos se deslocalizan y, en muchas ocasiones, adquieren un tamaño mayor que el observado en una cepa silvestre (**Figura 14**), al igual que ocurre en los mutantes *chc1Δ* y *clc1Δ* de *S. cerevisiae* ([Henry et al, 2002](#)). Utilizando el mutante condicional 41XHA*clc1*, corroboramos que la disminución de clatrina en las células afecta directamente al número y a la distribución de los parches de actina.

Los agregados de actina observados en las células de los mutantes *clc1* de *S. pombe* podrían deberse a alteraciones en la distribución de Sla2/End4p. Como ya se ha comentado, en otros organismos defectos en la proteína Sla2/Hip1R prolongan el tiempo de nucleación de la actina en los sitios de endocitosis, provocando su acumulación ([Boettner et al, 2012](#); [Weinberg & Drubin, 2012](#)). De hecho, tal y como se ha explicado en el punto anterior, cuando se analizó la distribución de esta proteína a lo largo de la represión del gen *clc1+* observamos que la señal de End4-GFP era más continua en la superficie celular a medida que la clatrina

iba disminuyendo en las células. Este fenotipo podría estar indicando una mayor estabilidad de la proteína en la membrana que favorecería la polimerización masiva de actina. Estos defectos aparecían acompañados de una ligera alteración en la distribución de la proteína Arc5p, necesaria para la nucleación de los parches de actina (Pelham Jr. *et al*, 2001). Al realizar un breve tratamiento con Brefeldina A, en una cepa silvestre que portaba la proteína Arc5-GFP se pudo observar que la distribución de esta proteína no estaba afectada (resultado no mostrado). Este dato sugiere que su alteración y, posiblemente, la reducción del número de parches de actina, están directamente relacionadas con la disminución en la cantidad de clatrina en los sitios de endocitosis y que, por lo tanto, no es un efecto indirecto causado por problemas en el tráfico vesicular.

El mutante condicional de clatrina, durante los diferentes tiempos de represión, tiene cables de actina largos e irregulares. Además esta cepa posee defectos significativos en la cantidad y en la distribución de la formina For3p (**Figura 28**). Se ha descrito que en *S. cerevisiae* existe un balance de la actina polimerizada entre los cables y los parches (Gao & Bretschner, 2008; Okada *et al*, 2006). Podríamos encontrar aquí la explicación de que el descenso en el número de parches de actina en la estirpe 41XHAcl1 no se tradujese en un descenso en la cantidad total de actina en las células, ya que los cables de actina podrían estar compuestos por más monómeros de actina. Además, los cables, no así los parches, son necesarios en la levadura de gemación para que se lleve a cabo correctamente la endocitosis independiente de clatrina y dependiente de Rho1p (Prosser *et al*, 2011). Teniendo en cuenta estos datos podría ser que el incremento en la longitud de los cables de actina en el mutante 41XHAcl1 se deba a un mecanismo compensatorio desarrollado en las células deficientes en clatrina para llegar a un nivel de endocitosis suficiente para el desarrollo de las células. Los cables de actina también son necesarios para el movimiento de los parches hacia los sitios de crecimiento activo (Pelham Jr. *et al*, 2001). De acuerdo con esto, la pérdida de polaridad de los parches de actina vista en los diferentes mutantes de *clc1* podría ser atribuida, al menos en parte, a los defectos en los cables de actina.

Estos defectos en los cables de actina, presumiblemente estarían originados por la distribución aberrante de la formina For3p encargada de su síntesis. Sin embargo, el porqué de estas anomalías en la localización de esta proteína, incluso cuando la cantidad de clatrina está reducida un 40%, sería más difícil de justificar con los datos de que disponemos, pudiendo existir varias explicaciones al respecto. La llegada de For3p a las zonas activas de crecimiento no parece depender del tráfico mediado por vesículas, ya que tratamientos realizados con la droga Brefeldina A (que disrumpe el tráfico de membranas) no afectan a la localización de la proteína (Martin & Chang, 2006). Por lo tanto, en principio, la disminución de la cantidad de clatrina en las células no afectaría directamente al transporte de For3p. No obstante, tampoco está claro si For3p viaja a los polos celulares mediante transporte activo o difusión pasiva de la proteína por el citoplasma (Martin & Chang, 2006). Otra posibilidad podría ser que la disminución de la cantidad de clatrina produjese defectos en la localización de

diferentes marcadores de polaridad necesarios para la correcta localización de For3p en la membrana plasmática, lo que también contribuiría a los defectos en polaridad vistos en las células. Esos posibles defectos podrían ser una consecuencia directa del tráfico dependiente de clatrina, ya que alguno de los marcadores podría viajar hacia los lugares de crecimiento activo en ese tipo de vesículas, o indirecta, ya que el descenso en la cantidad de clatrina podría estar afectando a la dinámica de los microtúbulos.

No obstante, la ausencia de datos concretos al respecto, sólo nos permite formular distintas hipótesis, sin poder confirmar ninguna de ellas.

En *D. discoideum* se ha observado que las células *chc1Δ* no son capaces de ensamblar correctamente los anillos contráctiles de actomiosina (CARs) lo que provoca serios problemas en el proceso de citocinesis (Niswonger & O'Halloran, 1997). Las células del mutante 41XHAcl1 de *S. pombe*, analizado en condiciones de no represión, poseen anillos de actomiosina ensamblados y localizados correctamente en la mayoría de las células, aunque a medida que va disminuyendo la cantidad de clatrina una creciente parte de la población posee anillos con defectos morfológicos. Este hecho parece indicar que en *S. pombe* la clatrina también influye en cierto modo en la estabilidad de los anillos de división, si bien la reducción de Clc1p en las células parece tener mayor efecto sobre los cables y los parches de actina que sobre los anillos contráctiles. Esta diferencia podría explicarse por la compleja estructura de los anillos. En estas estructuras hay gran cantidad de proteínas que contribuyen tanto a la estabilidad como a la funcionalidad, las cuales no tienen por qué verse afectadas directamente por el descenso de clatrina en las células. No obstante, los defectos en la morfología de los anillos podrían deberse en parte a las anomalías encontradas en la formina For3p, ya que se ha descrito recientemente que ésta colabora con Cdc12p en el ensamblaje del anillo contráctil durante la citocinesis (Coffman *et al*, 2013).

Por otra parte, no hemos detectado defectos aparentes en el número, distribución y morfología de los microtúbulos antes de las seis horas de represión del gen *clc1+* (cuando la cantidad de clatrina en las células está muy disminuida). Esto ocurre de forma similar en *D. discoideum* donde las células *chc1Δ* poseen microtúbulos bien organizados (Wessels *et al*, 2000). En mamíferos, sin embargo, se ha descrito que la clatrina interviene en la organización del cuerpo polar del huso, estableciendo la unión de los microtúbulos con las fibras del cinetocoro (Royle, 2012). Por el momento no se conoce que la clatrina ejerza un papel similar en levaduras, lo que podría indicar que ésta es una función de la clatrina no conservada en todos los organismos.

Todos nuestros resultados confirman que la clatrina es necesaria para la organización de las estructuras que contienen actina en la levadura de fisión, pero no parece jugar un papel determinante en la organización del citoesqueleto de tubulina. Las alteraciones encontradas en los distintos elementos del citoesqueleto podrían explicar en gran medida los defectos morfológicos vistos en las células carentes de clatrina.

SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR Y VIABILIDAD DE LOS MUTANTES *clc1*

Una cuestión relevante que surge de los resultados obtenidos en este estudio es por qué la ausencia de clatrina es más perjudicial para *S. pombe* que para otros organismos. En la ameba *D. discoideum* el mutante *chc1Δ* es viable (Ruscetti *et al*, 1994) y en *S. cerevisiae* las deleciones *chc1Δ* y *chc1Δ clc1Δ* son letales solamente cuando existen mutaciones en otros loci que comprometen el crecimiento celular (Lemmon & Jones, 1987; Munn *et al*, 1991). Una posible respuesta a esta diferencia podría residir en la composición de la pared celular de estos organismos, ya que *D. discoideum* no posee pared celular durante el crecimiento vegetativo, y en el caso de *S. cerevisiae* su pared celular está compuesta por $\beta(1,3)$ glucano y quitina. En este organismo se sabe que defectos en la síntesis del glucano activan mecanismos compensatorios que incrementan la cantidad de quitina para permitir la viabilidad celular (García-Rodríguez *et al*, 2000; Valdivieso *et al*, 2000; Walker *et al*, 2008). *S. pombe*, a diferencia de *S. cerevisiae*, no posee cantidades detectables de quitina (Kreger, 1954; Horisberger *et al*, 1978) y su pared está constituida principalmente por polímeros de glucano, lo cual provoca que defectos en la síntesis de glucano no puedan ser compensados y, por tanto, se reduzca la viabilidad celular (Ribas *et al*, 1991).

El mutante de deleción *clc1Δ* posee graves defectos en la composición de la pared celular, en la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa, y en la distribución de las enzimas $\beta(1,3)$ glucán sintasa (Figura 16). El añadir sorbitol al medio no estabiliza Clc1p ni Chc1p, y tampoco corrige los defectos en la localización de Syb1p y For3p detectados en las células tras largo tiempo de represión (Figura 32 y resultados no mostrados). Por lo tanto, la explicación más plausible por la que el sorbitol es capaz de rescatar la letalidad de la mutación *clc1Δ* en *S. pombe* sería porque ésta se deba a defectos en la síntesis de la pared celular, y la estabilización osmótica del medio los atenuase y no a que este compuesto subsane otros problemas celulares.

Es posible que la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano también esté regulada por mecanismos de tráfico dependiente de clatrina en otros hongos. No obstante, en estos otros organismos, diferentes mecanismos compensatorios podrían promover la síntesis de quitina y la construcción de una pared celular de “remediación”, que protegería a las células contra la lisis y permitiría la viabilidad de los mutantes defectivos en clatrina.

TRÁFICO VESICULAR Y SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR EN LOS MUTANTES *clc1*

Las células 41XHA*clc1* incubadas en condiciones en las que el gen *clc1+* no está reprimido mostraban una reducción de la señal de las enzimas β -glucán sintasa en la superficie celular que estaba acompañada de una disminución significativa en la síntesis de glucano

(Figuras 23 y 24). Bajo estas mismas condiciones, los procesos generales de secreción y endocitosis no estaban significativamente afectados, por lo que puede asumirse que los defectos en la pared celular están causados por una alteración específica en la regulación de su biosíntesis por la clatrina y que no son una consecuencia secundaria de un defecto general en el tráfico vesicular. En cualquier caso, los defectos en la síntesis del β -glucano podrían ser debidos a una disminución en la secreción y reciclaje de las enzimas implicadas en este proceso, o bien, a un incremento en la endocitosis de estas proteínas que haría que fuesen más inestables en la membrana plasmática.

En *S. pombe* el bloqueo de la endocitosis, añadiendo Latrunculina A al medio de cultivo o delecionando el gen *end4+*, estabiliza la glucán sintasa Bgs1p en la superficie celular en condiciones de estrés osmótico (Sharifmoghadam & Valdivieso, 2009). En nuestro estudio hemos encontrado que la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa medida *in vitro* de la estirpe *end4 Δ* , que presenta un serio bloqueo en la endocitosis, cultivada en condiciones estándar de laboratorio, es extremadamente alta (Figuras 24 y 47). Estos datos indican que la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa está regulada por endocitosis.

Si el principal mecanismo de regulación de la síntesis de glucano a través de la clatrina fuese mediante la endocitosis de las enzimas responsables de la síntesis de este polímero, la actividad cuantificada en el mutante *41XHAcl1* debería ser mayor que la encontrada en la cepa control, al igual que ocurre en el mutante *end4 Δ* . Por el contrario, hemos encontrado que la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa era menor en la estirpe mutante que en la cepa control (Figura 24A). Además, comprobamos que en condiciones en las que el gen *clc1+* estaba fuertemente reprimido (6 horas en presencia de tiamina), y existía un bloqueo significativo de la endocitosis (valorado mediante la toma del colorante FM4-64, Figura 32), la actividad β GS seguía disminuyendo. Así pues, aunque es posible que puedan existir mecanismos de endocitosis independientes de clatrina que se activen en el mutante *41XHAcl1* reprimido durante 6 horas, y que afecten a la endocitosis de las enzimas Bgs, éstos tendrían que ser independientes de End4p, ya que la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa en el mutante *end4 Δ* es mucho mayor que en una cepa silvestre.

Por otra parte, hemos encontrado fuertes evidencias de que las alteraciones observadas en la pared celular son consecuencia directa de defectos específicos en la secreción de las enzimas encargadas de su síntesis y remodelación.

Las células del mutante *apm1 Δ* en *S. pombe* son sensibles a antifúngicos que inhiben la síntesis de la pared celular y exhiben una localización aberrante de Bgs1p (Yu *et al*, 2012; Kita *et al*, 2004). Al analizar la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa de esta estirpe hemos encontrado que es menor que la de una cepa silvestre. Como se ha indicado anteriormente, la actividad valorada en la estirpe *41XHAcl1* incubada en condiciones en las que la expresión del gen *clc1+* no está reprimido es inferior a la de la cepa control, pero superior a la del mutante *apm1 Δ* . Este resultado concuerda con el hecho de que la proteína Syb1-GFP esté correctamente localizada

en el mutante *41XHAcl1* pero no así en las células de *apm1Δ*. De igual modo, también coincide con la hipótesis de que la ausencia de un 40% de la clatrina no provoca una alteración completa del tráfico vesicular en las células. Al disminuir la cantidad de clatrina los valores de la actividad β GS siguen disminuyendo, acercándose a los valores del mutante *apm1Δ*. Este hecho sugiere que la disminución de la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa se debe a problemas relacionados con el tráfico de las enzimas responsables de dicha actividad hacia la membrana plasmática. A esto podemos añadir que los análisis de FRAP y Western blot realizados indican un retraso en el transporte de las $\beta(1,3)$ glucán sintasas Bgs1p y Bgs4p hacia la membrana plasmática y problemas en la secreción de la endo- $\beta(1,3)$ glucanasa Eng1p al espacio periplásmico.

Todos estos datos son una fuerte evidencia de que la tasa de secreción de las enzimas necesarias para la síntesis y remodelación de la pared celular se reduce cuando disminuye la cantidad de clatrina en las células, incluso en condiciones en las que el tráfico vesicular no está afectado de una manera generalizada.

Recientes trabajos dirigidos a caracterizar la función del complejo adaptador AP-1 (Yu *et al*, 2012; Kita *et al*, 2004) han aportado información sobre la relación existente entre la maquinaria de secreción y la síntesis de la pared celular en *S. pombe*. Dado que en *S. cerevisiae* se han encontrado componentes del complejo AP-1, pero no clatrina, en vesículas del exómero (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al*, 2006), el hecho de que el mutante *apm1Δ* presente determinados fenotipos, no implica necesariamente que estos sean debidos en su totalidad a su defecto en clatrina. Por eso podría ser posible que ciertos fenotipos observados en el mutante *apm1Δ* de *S. pombe* sean más graves que los del mutante condicional *41XHAcl1*, incluso en condiciones en las que el gen *clc1+* está reprimido. Sin embargo, nuestros resultados apoyan la idea de que el defecto en la localización de Bgs1p detectado en el mutante *apm1Δ* podría deberse a problemas en la ruta de secreción mediada por clatrina y AP-1.

Como ya se ha explicado, el mutante *41XHAcl1* secreta la enzima fosfatasa al medio de forma correcta (**Figura 36A**) del mismo modo que lo hacen los mutantes *chc1Δ* de *S. cerevisiae* y *D. discoideum*, que secretan tanto la invertasa, como la fosfatasa ácida a niveles casi iguales a los de una cepa silvestre (Payne & Schekman, 1985; Payne *et al*, 1987; Ruscetti *et al*, 1994). Por el contrario, la cepa *chc1Δ* de *D. discoideum* muestra defectos en la secreción de la α -manosidasa y la β -glicosidasa (Ruscetti *et al*, 1994), dos enzimas implicadas en la síntesis de su pared celular, indicando que la ausencia de la clatrina sólo afectaría al transporte de una determinada serie de proteínas.

Estos resultados apoyan la idea de que la clatrina puede ser requerida específicamente, aunque probablemente no exclusivamente, para el correcto tráfico de enzimas necesarias para la síntesis y remodelación de la pared celular, ya que cuando la cantidad de Clc1p está reducida estas enzimas parecen estar parcialmente deslocalizadas en vesículas de secreción y/o en las vacuolas (**Figuras 16 y 24**).

En *S. cerevisiae* se han descrito dos clases diferentes de vesículas de secreción denominadas de baja y alta densidad ([Gurunathan et al, 2002](#)). La ATPasa de membrana Pma1p, por un lado, y enzimas solubles como la invertasa, la fosfatasa ácida y las exoglucanasas por otro, se encontraron en vesículas diferentes. Se ha demostrado que la clatrina solamente es necesaria para la biogénesis de las vesículas de alta densidad ([Gurunathan et al, 2002](#)) y también que un bloqueo en la endocitosis mediante la delección del gen *END4* no afecta a la formación de ninguna de ellas ([Harsay & Bretscher, 1995](#)).

Teniendo en cuenta todos estos datos, y comparándolos con nuestros resultados, sugerimos que en *S. pombe* la clatrina podría ser prescindible para el transporte de algunas proteínas solubles como la fosfatasa ácida y la carboxipeptidasa Cpy1p y, sin embargo, necesaria para la formación de vesículas que transportasen diferentes proteínas a la superficie celular, entre las que se incluirían las β -glucán sintasas y las endoglucanasas.

En *S. cerevisiae*, los v- y t-SNAREs están presentes en ambos tipos de vesículas ([Gurunathan et al, 2002](#)); esta observación concuerda con los resultados mostrados en el mutante 41XHAcl1 ya que en esta cepa las proteínas Syb1-GFP y GFP-Psy1 están correctamente localizadas incluso tras 6 horas de represión del gen *clc1*⁺ (**Figura 32**).

Aunque *S. cerevisiae* y *S. pombe* son organismos alejados evolutivamente ([Sipiczki, 2000](#)), hemos encontrado evidencias suficientes para asegurar que nuestros resultados coinciden con la hipótesis de que los mecanismos de secreción se desarrollaron de forma temprana en la evolución previa a la separación de estos organismos ([Gurunathan et al, 2002](#)) y por tanto estos procesos son muy similares. Sin embargo, al divergir los organismos, algunas funciones se han podido especializar debido a la distinta biología de ambas levaduras.

RELACIÓN DE Clc1p CON LAS VACUOLAS

Todos los mutantes *clc1* analizados en este estudio presentan vacuolas de menor tamaño que las de la estirpe control, lo que seguramente se deba a los defectos observados en tráfico vesicular (**Figuras 19 y 37**). En estos mutantes probablemente exista un flujo deficiente de material de membrana desde la membrana plasmática y los orgánulos intracelulares hasta la vacuola, alterando en gran medida la composición de sus membranas.

El descenso de clatrina en las células afecta tanto a la morfología como a las propiedades de las vacuolas. Mediante microscopía electrónica detectamos una abundancia de cuerpos multivesiculares (**Figura 37**) que sugieren defectos en fusión con las vacuolas. Este hecho se corroboró cuando las células del mutante 41XHA*clc1* se transfirieron a un medio hipotónico, ya que muchas de las vacuolas eran incapaces de fusionarse. Así mismo, cuando se realizó una tinción con el colorante CDCFDA se observó que en muchas ocasiones las vacuolas no se teñían adecuadamente. Todos estos defectos mostraban cambios en las membranas de las vacuolas (**Figura 38**).

Los mutantes *chc1Δ* de *S. cerevisiae* y *D. discoideum* presentan fenotipos similares a los que hemos visto en los mutantes *clc1* de *S. pombe*. Poseen vacuolas de pequeño tamaño y en muchas ocasiones muestran cuerpos multivesiculares indicando problemas en la fusión de las membranas (Payne *et al*, 1987, 1988; O'Halloran & Anderson, 1992).

Con estos datos se puede concluir que la ausencia de clatrina y los consecuentes defectos causados en el tráfico vesicular de las células afectan gravemente a la biogénesis de las vacuolas en los diferentes organismos estudiados.

RELACIÓN DE LA CADENA LIGERA DE LA CLATRINA CON LA MORFOGÉNESIS EN *S. pombe*

Los mutantes de *clc1*⁺ que hemos estudiado presentan diferentes defectos en su morfología. En el mutante condicional incubado en condiciones en las que la expresión del gen *clc1*⁺ no está reprimida, se puede apreciar un pequeño porcentaje de células que presentan septos de división engrosados en su zona central, porcentaje que va elevándose a medida que disminuye la cantidad de clatrina en la célula, siendo éste un rasgo característico de las células de la estirpe *clc1Δ* (**Figuras 15 y 23**). En *S. pombe* es frecuente observar un ligero engrosamiento en la región central de los septos de división justo después de que se éstos se hayan cerrado. Esto se debe a que los septos crecen de manera centrípeta hasta que se produce su cierre (Sipiczki & Bozsik, 2000). Los engrosamientos anormales observados en los septos de los mutantes *clc1* sugieren que la síntesis de pared celular no concluye con el cierre del septo de división y que, durante algún tiempo, continúa depositándose material celular en esa región, quizás debido a un tráfico vesicular descontrolado. En los mutantes *SLA2/END4* de *S. cerevisiae* también se han observado septos engrosados, por lo que una explicación alternativa para este fenotipo podría ser que existiese una reducción en la endocitosis de alguna proteína necesaria para el cierre del septo o para la fusión de las membranas.

En el mutante condicional 41XHA*clc1* no se han observado las células multiseptadas y con ramificaciones, ni los agregados celulares frecuentemente presentes en la población del mutante nulo *clc1Δ* (**Figuras 14 y 15**). Esto indicaría que esos fenotipos morfológicos están producidos por una acumulación de defectos, tanto en la síntesis de la pared celular, como en

el citoesqueleto de actina, debidos a que las células llevan largo tiempo creciendo en ausencia de clatrina. Probablemente, algunos de estos fenotipos son consecuencia de una separación celular ineficiente provocada por defectos en la estructura del septo, unida a una secreción defectuosa de la enzima Eng1p.

En el mutante condicional 41XHA*clc1* en condiciones en las que el gen *clc1*⁺ no está reprimido es posible observar células que, aunque están polarizadas, son de mayor tamaño que las células control y que además presentan ensanchamientos en alguno de sus polos o en la región central (**Figura 23A**). Estos defectos se van incrementando a medida que va pasando tiempo en condiciones de represión de *clc1*⁺. Este fenotipo podría explicarse también por el hecho de que estos mutantes posean una pared celular defectuosa, incapaz de soportar la presión de turgencia eficientemente, tal y como se ha descrito para otros mutantes (Ribas *et al*, 1991). En cuanto a lisis celular, ésta sólo se ha observado en el mutante condicional tras llevar más de 12 horas en presencia de tiamina y en el mutante nulo *clc1*Δ, lo que también nos lleva a sugerir que dicha lisis es debida a la gran acumulación de defectos en las células carentes de clatrina.

Vistos todos estos resultados, podemos asumir que una reducción parcial de Clc1p provoca problemas en la síntesis de la pared celular que van aumentando a medida que disminuye la cantidad de clatrina en las células. La acumulación de estos defectos a lo largo del tiempo produce graves anomalías en esta estructura que provocan serios defectos morfológicos y hace que las células de *S. pombe* terminen por no poder soportar la presión interna.

A estos defectos en la pared celular hemos de añadir las alteraciones morfológicas de las células defectivas en clatrina que pueden deberse en gran medida a los problemas observados en el citoesqueleto de actina. Éstos favorecerían la pérdida parcial de la polaridad y la aparición de células hinchadas. También hemos visto que en el mutante condicional, bajo condiciones de represión, la localización del exocisto -un sistema de “amarre” de las vesículas, que colabora con la actina en el mantenimiento de la polaridad- (Bendezu & Martin, 2011) es defectuosa (**Figura 31B**). Por todo ello, es probable que la combinación de los defectos en la síntesis de la pared celular con las anomalías en el exocisto y en el citoesqueleto de actina contribuya a la morfología aberrante observada en las células de los mutantes de *clc1*⁺.

RELACIÓN DE Clc1p CON LA CONJUGACIÓN Y LA ESPORULACIÓN

En el mutante nulo de la clatrina se han encontrado defectos durante la diferenciación sexual ya que las células h^{90} del mutante $clc1\Delta$ eran incapaces de conjugarse y esporular eficientemente (**Figura 20**). Las células presentaban graves defectos en la morfología de los *shmoos*, de los cigotos y también en el desarrollo de las esporas. Estos defectos eran bastante mayores en la cepa $clc1\Delta$ que en el mutante $sla2/end4\Delta$, quedando patente que la acumulación de defectos no era sólo debida a problemas relacionados con la endocitosis sino también con la secreción, y que éstos afectaban directamente a la morfología de las estructuras necesarias para el desarrollo sexual de *S. pombe*.

En *S. cerevisiae* Chc1p y Clc1p contribuyen al proceso de conjugación (Payne *et al*, 1988; Chu *et al*, 1999). En *D. discoideum*, Chc1p y Clc1p son necesarias para desencadenar el programa de meiosis (O'Halloran & Anderson, 1992; Wang *et al*, 2003) y en *Drosophila* la clatrina resulta esencial para el proceso de gametogénesis (Bazinet *et al*, 1993). Hemos visto que en el mutante $clc1\Delta$ de *S. pombe* la mayoría de los procesos que conducen a la conjugación están alterados, lo que indicaría que la clatrina también juega un papel importante en el desarrollo sexual de este organismo. No obstante, con los datos de que disponemos, no podemos dilucidar si los problemas observados se deben a la ausencia directa de la clatrina o a los defectos morfológicos que se desarrollan por la falta de estas cubiertas proteicas, ya que este análisis no se ha realizado en el mutante condicional.

En resumen, el análisis de los mutantes de *S. pombe* y la comparación de sus fenotipos con los de los mutantes de clatrina de *S. cerevisiae* y *D. discoideum* muestran que la cadena ligera de la clatrina tiene funciones similares en los organismos unicelulares. También hemos comprobado que algunas de estas funciones se mantienen incluso en organismos más complejos. Sin embargo, una diferencia muy significativa con respecto al resto de especies analizadas hasta el momento es que la cadena ligera de *S. pombe* es mucho más importante para la estabilidad de la clatrina, hecho que la hace esencial para la viabilidad celular. Del mismo modo, hemos comprobado que, la principal causa de la letalidad del mutante $clc1\Delta$ de *S. pombe* sea el papel que ejerce la clatrina en el tráfico de las enzimas encargadas de la síntesis y remodelación de la pared celular.

EL COMPLEJO ADAPTADOR AP-2 EN *S. pombe*. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Apl3p

Como se ha podido comprobar, el transporte mediado por clatrina ha resultado ser un mecanismo importante de regulación de la síntesis de la pared celular. Así mismo, hemos observado que la ausencia de clatrina influye dramáticamente en multitud de procesos y elementos celulares; tanto es así que la mutación $clc1\Delta$ resulta letal para las células.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la relación entre el transporte vesicular y la regulación de la síntesis de pared celular en *S. pombe*, decidimos estudiar el complejo adaptador AP-2.

Para llevar a cabo este estudio, hemos clonado y comenzado a caracterizar el gen *apl3⁺* de *S. pombe*, que codifica la proteína Apl3p correspondiente a la subunidad α del complejo adaptador antes citado. Hemos constatado que este gen se expresa en la levadura de fisión y que codifica una proteína con un tamaño similar al descrito para otros organismos. En lo que se refiere a la localización de esta proteína hemos podido comprobar, mediante la observación de Apl3-GFP al microscopio de fluorescencia, que ésta se observa como una serie de puntos fluorescentes distribuidos principalmente en la zona de los polos y del septo de división, aunque también se pueden apreciar en pequeñas vesículas dispersas en el interior de las células.

En mamíferos, la subunidad α del complejo AP-2 es la encargada de interactuar con las cabezas del lípido de membrana fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (Collins *et al*, 2002; Gaidarov *et al*, 1996; Rohde *et al*, 2002; Reider & Wendland, 2011). Esta unión del adaptador a la membrana plasmática favorece la interacción de otras regiones del complejo con los cargos que están situados en esa zona de la membrana (Ohno *et al*, 1995; Owen & Evans, 1998). Por otra parte, también se ha visto que las subunidades β de los complejos AP-1, AP-2 interactúan con la clatrina en células animales (Yeung *et al*, 1999; Gallusser & Kirchhausen, 1993; Dell'Angelica *et al*, 1998; Boehm & Bonifacino, 2001). En *S. cerevisiae* sólo se ha podido establecer la existencia de interacción entre la subunidad β del complejo AP-1 y la clatrina (Yeung *et al*, 1999). En el caso de la levadura de fisión no se conoce información relativa a la interacción de AP-1 con la clatrina, aunque hay estudios al respecto que la presuponen (Kita *et al*, 2004; Ma *et al*, 2009; Yu *et al*, 2012) y, hasta el momento, tampoco existía ningún tipo de información experimental relativa a la interacción del complejo AP-2 con la clatrina. Mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación hemos podido observar que Apl3p forma un complejo con la clatrina, aunque no sabemos si su unión es directa o indirecta (Figura 40). Este dato sugiere que en la levadura de fisión el complejo AP-2 sí es capaz de interactuar con la clatrina a diferencia de lo observado en *S. cerevisiae*, aunque el hecho de que pudiera hacerlo no tiene por qué descartar que la subunidad β del complejo (Apl1p), también lo hiciese.

Una característica del complejo AP-2 de *S. pombe*, que se conserva en mamíferos y en *S. cerevisiae*, es el hecho de que la pérdida de cualquiera de las subunidades del complejo afecta drásticamente a la estabilidad de mismo [Figura 41; (Panek *et al*, 1997; Yeung *et al*, 1999; Dell'Angelica *et al*, 1999)].

Teniendo en cuenta todos estos datos, podemos asumir que la proteína Apl3p, que forma parte del complejo AP-2 en *S. pombe*, posee características similares a las estudiadas en otros organismos.

La ausencia de *apl3*⁺ no resultó ser letal para las células y no parecía afectar a la morfología de éstas en ninguna de las condiciones de crecimiento analizadas. Este resultado es similar al encontrado en *S. cerevisiae*, donde la delección de las subunidades de AP-2 no es letal y provoca mínimos efectos sobre las células (Huang *et al*, 1999; Yeung *et al*, 1999). No obstante, estos datos difieren de los resultados encontrados en metazoos, donde la delección de los genes que codifican AP-2 resulta más deletérea en muchos casos (Mitsunari *et al*, 2005; González-Gaitán & Jäckle, 1997; Grant & Hirsh, 1999).

Toda esta información sugiere que el complejo AP-2 lleva a cabo funciones más especializadas en eucariotas superiores que en levaduras.

AP-2 Y SU PAPEL EN EL TRÁFICO VESICULAR DE *S. pombe*

En algunas células del mutante *apl3Δ* hemos visto que las vesículas de clatrina se distribuyen de forma discreta en las zonas activas de crecimiento (**Figura 42**), hecho que rara vez se ha observado en una estirpe silvestre a no ser que las células se tratasen con Brefeldina A (**Figuras 12A y 12B**). Este fenotipo también se ha encontrado en la estirpe mutante *end4Δ*, que posee serios problemas en la internalización de las vesículas de clatrina (**Figura 12B**, panel situado a la derecha), aunque era mucho más sutil en el mutante *apl3Δ*. Este dato podría estar indicando que la ausencia de AP-2 en las células de *S. pombe* causa cierto retraso en la endocitosis, por el que se produciría la acumulación de vesículas endocíticas en la superficie celular, pero este defecto sería muy leve. De acuerdo con ello, el mutante *apl3Δ* no parece tener afectado el tráfico de membranas de una forma notable, en comparación con lo que ocurre en el mutante *end4Δ* (Iwaki *et al*, 2004; Castagnetti *et al*, 2005).

Estos resultados coinciden con lo reflejado en los estudios realizados en *S. cerevisiae*, donde la ausencia de Apl3p no muestra defectos generales en la internalización de material de membrana (Munn, 2001). Por el momento, en *S. cerevisiae*, sólo se han encontrado defecto en la endocitosis de la toxina “killer” K28 cuando falta el complejo AP-2 (Carroll *et al*, 2009). Esto nos indicaría que este complejo, en levaduras, no participa en la endocitosis de manera general, sino que podría estar involucrado en la internalización de cargos específicos.

Todos los resultados obtenidos en el mutante *apl3Δ* al analizar los diferentes procesos implicados en el transporte vesicular parecían indicar que el complejo AP-2 no tenía un papel relevante en ellos. Sin embargo, cuando analizamos la incorporación del colorante FM4-64 en el mutante doble *41XHAcl1 apl3Δ* y la comparamos con el mutante *41XHAcl1* (ambas estirpes se cultivaron en condiciones en las que el gen *clc1*⁺ no estaba reprimido, o en las que la represión se llevó a cabo durante 3 horas) encontramos que, a tiempos cortos de represión, existe un bloqueo, o al menos un fuerte retraso en la internalización del colorante (**Figura 44**). Este dato pone de manifiesto que el complejo AP-2 sí juega un papel en el proceso de endocitosis en *S. pombe*, pero que sólo se hace patente cuando el mecanismo endocítico está afectado. No sabemos si este defecto se debe a que la ausencia del adaptador bloquea o ralentiza,

en cierto modo, la endocitosis mediada por clatrina, lo que explicaría que en ocasiones se observen vesículas en la superficie celular, o al hecho de que en ausencia del adaptador la clatrina sea más inestable en las membranas. Cualquiera de estas dos circunstancias unida a la disminución de la cantidad de clatrina en las células, podría estar impidiendo la internalización del FM4-64 eficientemente.

Nos encontramos, pues, ante el primer dato que sugiere la intervención del complejo AP-2 en el proceso general de endocitosis en levaduras.

EL COMPLEJO AP-2 Y SU RELACIÓN CON LA BIOSÍNTESIS DE LA PARED CELULAR

Mediante diferentes tinciones que permiten visualizar la pared celular de *S. pombe* hemos comprobado que, aparentemente, esta estructura no presenta ningún tipo de alteración en el mutante *apl3Δ* (**Figura 45**). Aun así, al igual que hemos visto que AP-2 influye de una manera bastante sutil en la endocitosis de esta levadura, éste también podría estar jugando un papel muy concreto en la regulación de la síntesis de la pared celular que no produjera alteraciones muy aparentes en esta estructura.

Tal y como hemos comentado con anterioridad, el único cargo que se conoce en *S. cerevisiae* cuya endocitosis es dependiente del complejo AP-2 es la toxina “killer” K28 (Carroll et al, 2009). Se sabe que el primer paso para que las toxinas pertenecientes a la familia “killer” entren en las células se produce a través de su unión a los polímeros de la pared celular (Schmitt & Radler, 1988, 1990). Dependiendo del tipo de toxina “killer” los sitios de unión con la pared celular están localizados en el glucano (para las toxinas K1, K2 y K3) o en la porción de manano en el caso de la toxina K28.

Estos datos podrían indicar una posible relación entre la ausencia de AP-2 y la modificación de diferentes componentes de la pared celular, ya que aún no se conocen con exactitud los mecanismos de entrada de la toxinas *killer* en las células.

Teniendo en cuenta toda esta información se llevaron a cabo una serie de experimentos para intentar aclarar si el complejo AP-2 tiene alguna función sobre la regulación de la síntesis de la pared celular en *S. pombe*. Los resultados obtenidos hasta el momento apuntan a que el complejo AP-2 podría intervenir en la regulación de la síntesis de pared celular afectando a la fracción constituida por el β -glucano. Hemos comprobado que en el mutante *apl3Δ* hay una leve reducción en la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa que no está asociada a una distribución aberrante de las enzimas responsables de esta actividad, pero sí parece influir sobre la composición de la pared celular. Cuando comparamos la sensibilidad a compuestos que afectan a la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano del mutante *apl3Δ* con la de un mutante *cwg1-1*, defectivo en la enzima β -glucán sintasa Bgs4p, comprobamos que *apl3Δ* es sensible a ellos pero en menor grado que la cepa mutante de Bgs4p (**Figura 46**). Estos datos sugieren que Apl3p sí está im-

plicado de algún modo en la síntesis del β -glucano, pero claramente, no al nivel que lo hace la enzima Bgs4p.

En este punto consideramos que sería interesante determinar la composición de la pared celular del mutante *apl3 Δ* para verificar si existe una disminución en la cantidad de β -glucano, lo cual explicaría en gran medida la sensibilidad de este mutante a enzimas que degradan principalmente el β -glucano de la pared. Esto también mostraría si existe o no un incremento de alguno de los otros dos polímeros constituyentes de esta estructura que estuvieran compensando la posible disminución de β -glucano y permitiesen que las células no tuvieran ningún problema de viabilidad.

El motivo del descenso de la actividad β GS cuando no está presente el complejo adaptador AP-2 podría explicarse si la función que lleva a cabo éste consistiese en estabilizar las cubiertas de clatrina sobre la porción de membrana plasmática donde se encuentran los cargos que se van a endocitar. Bajo este supuesto, AP-2 podría estar regulando, en cierto modo, el correcto ensamblaje de la cubierta de clatrina sobre las enzimas $\beta(1,3)$ glucán sintasas. Al desaparecer este adaptador, la cubierta de clatrina podría ser más inestable en la membrana haciendo que los cargos se endocitasen antes o a un ritmo mayor que en condiciones normales.

Sin embargo, el mayor defecto visto en la endocitosis del FM4-64 cuando hay una cantidad reducida de clatrina y AP-2 está ausente, comparado con lo que ocurre cuando sólo disminuye la cantidad de clatrina, pone de manifiesto que la ausencia de AP-2 podría hacer más inestable a estas cubiertas en las membranas e incrementaría el efecto que produce la disminución de clatrina sobre la endocitosis.

Es muy posible que AP-2 actúe en colaboración con otras proteínas adaptadoras, de manera que todas ellas modulen la estabilidad de las cubiertas de clatrina y/o la velocidad de internalización de las vesículas (Teckchandani *et al*, 2012). Al faltar AP-2, estos procesos se alterarían acelerándose o ralentizándose según los casos. Si las enzimas Bgs fuesen cargos específicos de AP-2 éstas podrían incrementar su velocidad de internalización, sin embargo no se tendría por qué estar afectando la endocitosis de otros cargos.

Mediante ensayos de co-localización y co-inmunoprecipitación de la proteínas Apl3p y Bgs1p hemos observado que la enzima $\beta(1,3)$ glucán sintasa Bgs1p, probablemente sea transportada hacia el interior celular en vesículas recubiertas de clatrina en las que AP-2 podría actuar como adaptador. De igual modo, se conoce que el transporte de esta enzima hacia la membrana plasmática depende en parte del complejo adaptador AP-1 (Yu *et al*, 2012, 2013), que es un complejo adaptador muy similar a AP-2, pero que interviene en el tráfico intracelular.

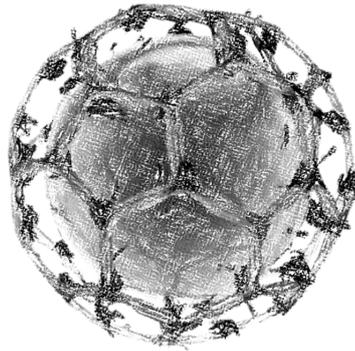
Todos nuestros datos, entre los que se encuentra un leve descenso en la actividad β

(1,3)glucán sintasa detectada *in vitro* sugieren que AP-2 podría estar afectando al transporte o estabilidad en la membrana plasmática de la enzima Bgs1p, responsable de la síntesis del β -glucano lineal (Cortes *et al*, 2007), que a su vez es un componente minoritario de la pared celular (Humbel *et al*, 2001). De todas formas, tampoco se puede descartar que AP-2 participe de algún modo en la regulación del resto de enzimas β -glucán sintasas aunque aún no disponemos de datos concluyentes al respecto.

Además de los fenotipos relacionados con la síntesis de la pared celular hemos encontrado otros en los que se aprecia que el mutante *apl3 Δ* presenta diferente sensibilidad cuando está sometido a distintas condiciones de estrés. Estos datos sugieren que el complejo AP-2 podría estar interviniendo en la endocitosis, o en la estabilidad de diversos receptores en la membrana plasmática. Sin embargo, no se puede descartar que los defectos encontrados sean consecuencia de los problemas apreciados en la síntesis de la pared celular.



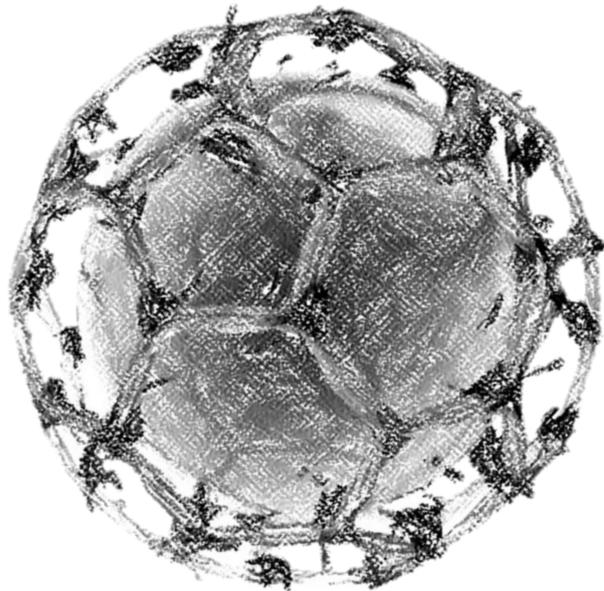
CONCLUSIONES



1. La delección de la cadena ligera de la clatrina es letal para las células de *Schizosaccharomyces pombe*. Esta letalidad se rescata cuando las células se incuban en un medio estabilizado osmóticamente.
2. En *S. pombe* la ausencia de Clc1p afecta a la estabilidad de Chc1p de forma más drástica a como lo hace en otros organismos.
3. La letalidad que ocasiona la ausencia de la cadena ligera de la clatrina en *S. pombe* se debe principalmente a defectos graves en la síntesis de la pared celular.
4. Una disminución del 40% en la cantidad de clatrina en las células afecta gravemente a la secreción de enzimas de síntesis y remodelación de la pared celular, como son las $\beta(1,3)$ glucán sintasas y las endoglucanasas, sin embargo causa un leve impacto sobre el transporte vesicular en general, el citoesqueleto y otros elementos celulares.
5. La subunidad α del complejo AP-2 de *S. pombe* forma un complejo con la cadena ligera de la clatrina a diferencia de lo que se conoce hasta el momento en otros organismos unicelulares.
6. El complejo AP-2 interviene en el proceso general de endocitosis en *S. pombe*, aunque su papel sólo se pone de manifiesto cuando la endocitosis está comprometida.
7. La ausencia del complejo AP-2 en *S. pombe* disminuye la actividad $\beta(1,3)$ glucán sintasa y hace que este organismo sea hiper-sensible a compuestos que afectan a la integridad de la pared celular.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS

Los organismos empleados en esta Tesis Doctoral se recogen en las Tablas I y II de la sección 1 del Apéndice.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo empleados fueron preparados con agua destilada (Milli-Rho) y esterilizados en el autoclave. Los correspondientes medios sólidos se prepararon mediante la adición de agar al 2% o 3% según los casos.

2.1. Crecimiento de *Escherichia coli*

Para el crecimiento de las estirpes de *E. coli* se utilizaron los medios LB y YT2X cuya composición se muestra en el sección 2 del Apéndice.

La resistencia a antibióticos se analizó suplementando los medios de cultivo con ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (30 µg/ml). El crecimiento de las células se realizó en placas Petri en el caso de medios sólidos, o en matraces Erlenmeyer cuando fueron medios líquidos, que se incubaron a 28°C y/o 37°C con una agitación de 250 rpm en el caso de los cultivos líquidos. Las diferentes cepas de *E. coli* se mantienen en viales con glicerol al 50% y a una temperatura de -80°C.

2.2. Crecimiento de *Schizosaccharomyces pombe*

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* se describieron por Moreno y colaboradores en 1991 (Moreno *et al*, 1991). Así mismo, las técnicas generales para trabajar con la levadura de fisión se pueden encontrar en:

www.biotwiki.org/bin/view/Pombe/NurseLabManual

PombeNet: www-bcf.usc.edu/~forsburg/index.html

2.2.1. Crecimiento vegetativo

Los medios de cultivo utilizados rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe* fueron medio rico YES y medio mínimo (MM), cuyas composiciones se detallan en la sección 2 del Apéndice. A la hora de seleccionar cepas con distintas auxotrofías, o transformadas con plásmidos, el medio mínimo se suplementó con 225 mg/l de uracilo, leucina, adenina e/o histidina, según fuera necesario. Cuando fue pertinente el medio YES se suplementó con geneticina (G418, de ForMedium) a una concentración final de 120-300 µg/ml. En los casos que se trabajó con el mutante nulo *clc1::KANMX6* los medios de cultivo empleados se suplementaron con sorbitol a una concentración final 1,2 M.

En el caso del mutante condicional *41XHAcl1* se utilizó como medio selectivo de crecimiento PMG (MM en el que el NH_4Cl se ha sustituido por ácido L-glutámico) suplementado con 250-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de geneticina. Para analizar el comportamiento del mutante *41XHAcl1* en condiciones de represión se añadió a los cultivos celulares tiamina a una concentración final de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estos cultivos estuvieron creciendo en presencia de la vitamina durante diferentes períodos de tiempo (3, 6, 9, 12 y 15 horas) a una temperatura de 28°C.

El crecimiento general de las células se llevó a cabo en placas Petri o en matraces Erlenmeyer que se incubaron a 25°C, 28°C, 32°C o a 37°C, con una agitación de 250 rpm para los cultivos líquidos. En este último caso el crecimiento se controló determinando la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro óptico. Por estudios previos realizados en el laboratorio se sabe que una $\text{D.O.}_{600} = 1,0$ equivale a 1×10^7 células/ml cuando se utiliza un espectrofotómetro SmartSpec™Plus (BioRad).

Ensayos de resistencia o sensibilidad a distintos compuestos

Los estudios de sensibilidad a diferentes compuestos se realizaron en medios sólidos YES y/o MM suplementados con diferentes cantidades de los compuestos en cuestión (las cantidades empleadas se detallan en los apartados referidos a cada ensayo). Se tomaron 3×10^4 células que provenían de cultivos líquidos en crecimiento exponencial y se hicieron diluciones seriadas 1:4 hasta un total de seis concentraciones decrecientes. Con un replicador se inoculó una gota de cada concentración sobre las placas que contenían el medio de cultivo. Las placas se incubaron a 28°C o 32°C durante 3-4 días.

2.2.2. Conjugación y esporulación

El medio de cultivo empleado para la inducción de la conjugación y esporulación de *S. pombe* fue MM que contiene adenina, leucina, uracilo, histidina y lisina (también denominado MM completo). En los casos en los que se trabajó con el mutante nulo de *clc1*⁺ los medios mencionados se suplementaron con sorbitol a una concentración final de 1,2 M.

Para realizar cruces genéticos se mezcló igual cantidad de células de las estirpes parentales de interés (cuando se trabajó con cepas heterotálicas haploides *h*⁺ o *h*⁻) en placas de medio MM completo, que se incubaron a 28°C (25°C en el caso de cepas termosensibles) durante 4-5 días para que tuvieran lugar la conjugación y la esporulación. Este mismo procedimiento se llevó a cabo cuando se realizaron cruces genéticos entre cepas homotálicas *h*⁹⁰ y cepas heterotálicas *h*⁺ o *h*⁻. La única salvedad es que en estos casos la cantidad de células de la cepa *h*⁹⁰ utilizada siempre fue menor que la de la cepa heterotálica para disminuir así la probabilidad de conjugación entre células procedentes de la cepa homotálica.

Aislamiento de ascosporas al azar

Para la selección de esporas al azar se tomó una pequeña muestra del cruce realizado cuando las ascas estuvieron maduras y se resuspendió en 1 ml de agua al que se añadieron 5 µl de extracto enzimático "Helix pomatia juice" (Biosepra). La mezcla se incubó a 28°C en agitación durante 16 horas aproximadamente para facilitar la digestión de la pared celular del asca y la liberación de las esporas. Pasado este tiempo se cuantificó el número de esporas presentes por ml de muestra y se hicieron diluciones, de modo que se sembraron entre 300 y 500 esporas en cada una de las placas de medio sólido empleadas. Las colonias obtenidas se analizaron seleccionando aquellas que poseían el genotipo de interés mediante la utilización de medios selectivos, por PCR o por observación al microscopio.

Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: análisis de tétradas

El análisis de tétradas se realizó a partir de ascas con el fin de analizar los productos de la segregación meiótica. El proceso se llevó cabo con un micromanipulador automático (Singer MSM System Series 200) de la siguiente forma:

Se tomaron 5 µl de un cultivo esporulado y se extendieron en un extremo de una placa de medio rico (YES o YES+sorbitol según el caso). Con el micromanipulador se recogieron ascas y se depositaron en una zona de la placa libre de células. La placa se incubó durante 4-5 horas a 37°C (en el caso de micromanipular en placas de medios suplementados con sorbitol el tiempo de incubación se incrementó al doble). Posteriormente se separaron las 4 esporas de cada asca a posiciones libres de células de la misma placa. Las placas se incubaron durante 4 días a 25°C o 28°C. Finalmente, para realizar el estudio genotípico de cada espora, se realizaron réplicas en medios selectivos y se incubaron a la temperatura adecuada.

2.2.3. Condiciones especiales de crecimiento

Medios suplementados con AZC

El compuesto L-azetidin-2-carboxílico (AZC; SIGMA) es un análogo tóxico del aminoácido L-prolina que se ha empleado para evaluar posibles defectos en el proceso de endocitosis. El AZC es un aminoácido no proteínico relacionado estructuralmente con el aminoácido proteínico L-prolina. La incorporación de este compuesto a las células produce proteínas estructuralmente aberrantes que afectan directamente a la viabilidad celular. Estirpes defectivas en el proceso de endocitosis tendrían los receptores de este aminoácido expuestos más tiempo del debido lo que las haría más sensibles a este compuesto tóxico. Se realizaron placas de MM completo o YES suplementados con el compuesto AZC a una concentración final de 0,9 mg/ml. Estas placas se incubaron de 3 a 5 días a 28°C o 32°C, según el medio de cultivo empleado.

Medios suplementados con sales

Para analizar el crecimiento de diferentes estirpes de *S. pombe* bajo condiciones de estrés se suplementó medio YES con diferentes concentraciones de sales. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 32°C.

Las concentraciones de las sales utilizadas fueron:

KCl: 0,3 M; 0,6 M; 1,2 M y 1,5 M.

MgCl₂: 0,06 M; 0,08 M; 0,09 M; 0,1 M; 0,125 M y 0,15 M.

CdCl₂: 50 µM, 60 µM y 70 µM.

MnCl₂: 3 mM y 4 mM.

CaCl₂: 200 mM y 300 mM.

Medios suplementados con cafeína

Para analizar el crecimiento de diferentes estirpes en presencia de cafeína se realizaron placas de medio rico YES suplementadas con este compuesto a unas concentraciones finales de 8 mM, 10 mM y 12 mM. Las placas se incubaron 2-3 días a 32°C.

Medios suplementados con antifúngicos

Para analizar la sensibilidad de diversas cepas de *S. pombe* a los antifúngicos Caspofungina y Miconazol se realizaron placas de medio rico YES que se suplementaron con las siguientes concentraciones de estos compuestos:

Miconazol: 1µM y 1,25 µM.

Caspofungina: 0,75 µg/ml; 1,5 µg/ml; 2,0 µg/ml; 3,0 µg/ml; 4,0 µg/ml y 5,0 µg/ml.

Las placas se incubaron durante 2-3 días a 32°C.

Medios con diferente concentración de glucosa

Para evaluar la supervivencia de diversas cepas de *S. pombe* en fase estacionaria y la influencia de la cantidad de glucosa presente en el medio en dicha supervivencia se utilizó como medio de cultivo YES líquido suplementado con las siguientes cantidades de glucosa:

- Medio YES: 0,2%, 1,0%, 2,0% y 3,0%

Para realizar estos experimentos, inicialmente se incubaron cultivos de cada estirpe durante toda la noche a una temperatura de 28°C. Tras 12-14 horas de crecimiento se midió la densidad óptica a 600 nm de cada uno de los cultivos y todos se igualaron a una

D.O.₆₀₀ de 0,5. Una vez igualados los cultivos se incubaron durante 3 horas más a 32°C para favorecer que las células estuvieran creciendo activamente. Una vez transcurrido ese tiempo, los cultivos se volvieron a igualar a una D.O.₆₀₀ de 1,0 y se procedió a realizar un ensayo de crecimiento correspondiente al día denominado 0, donde se tomaron 3×10^4 células de los diferentes cultivos y se hicieron diluciones seriadas 1:4 que se sembraron con un replicador en placas de medio YES al 3% de glucosa. El resto de los cultivos celulares se incubaron durante varios días (1, 3, 5, 7 y 10 días) a 32°C, tras los cuales se realizó un ensayo de crecimiento tomando una muestra de cada cultivo y realizando diluciones seriadas 1:4 a partir de las mismas. En estos casos no se igualaron los cultivos antes de realizar la siembra en las placas. Todas las placas se incubaron durante 3 días a una temperatura de 32°C.

3. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las transformaciones tanto de levaduras como de bacterias, la extracción de ADN genómico, reacciones de PCR, mutagénesis dirigidas y otros procedimientos generales de manipulación de ADN se realizaron mediante los procedimientos estandarizados por diferentes autores (Rothstein, 1983; Kunkel *et al*, 1987; Sambrook *et al*, 1989; Moreno *et al*, 1991; Sambrook Russell, D.W., 2001).

3.1. Vectores utilizados

3.1.1. Vectores de *E. coli*

pBluescript II KS⁺ y SK⁺ (Stratagene): Se trata de plásmidos auto-replicativos de 2958 pares de bases (pb) que llevan incluido el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación ColE1 y un fragmento del operón lac de *E.coli* que codifica la enzima β -galactosidasa. Disponen de un sitio de clonación múltiple, en el que hay 21 sitios únicos de restricción que permiten la selección de clones recombinantes por α -complementación de cepas de *E. coli* portadoras de la delección lacZ M15. Flanqueando los sitios de restricción únicos se encuentran los promotores de las ARN polimerasas T3 y T7 que se utilizan para la síntesis de ARN *in vitro*. También poseen el origen de replicación f1 que permite la obtención de ADN monocatenario tras la infección de las células portadoras del plásmido con el fago auxiliar M13K07.

pGEM-T (Promega): Plásmido de un tamaño de 3003 pb derivado del vector pGEM-5Zf (+). En su secuencia presenta el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación ColE1 y un fragmento del operón lac de *E. coli* que codifica el péptido a de la β -galactosidasa. Tiene 13 sitios únicos de reconocimiento para endonucleasas de restricción y flanqueándolos se encuentran los promotores de las ARN polimerasas T3 y SP6. Además estos plásmidos presentan un fragmento de 456 pb que contiene el origen de replicación f1 que permite la obtención de ADN de cadena sencilla. Este vector es lineal y cuenta con una timina en cada extremo por lo que se emplea principalmente para la clonación de fragmentos de ADN amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.1.2. Vectores de *S. pombe*

Los plásmidos usados para *S. pombe* poseen una serie de características comunes que básicamente consisten en: un origen de replicación, un marcador de selección bacteriano (generalmente un gen de resistencia a un antibiótico) y un marcador de selección de levaduras (normalmente un marcador metabólico). Algunos poseen una secuencia de replicación autónoma (ARS). Para la levadura de fisión no existen plásmidos centroméricos (monocopia) ya que su centrómero es demasiado grande para ser incluido en los plásmidos. Una alternativa es usar plásmidos integrativos sin secuencias ARS. La linearización de los plásmidos permite la integración estable en el genoma de *S. pombe* por recombinación homóloga.

pAL-KS⁺ (J.Ishiguro, Konan University, Japón): Es un plásmido multicopia de 6300 pb obtenido a partir del vector pBluescript KS⁺, al que se añadió la secuencia de replicación autónoma *ars1*⁺. Lleva el marcador de selección *LEU2* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *leu1*⁺ de *S. pombe*.

pAU-KS⁺: Plásmido multicopia con tamaño de 5600 pb con las mismas características que pAL. En este caso el marcador de selección es el gen *URA3* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *ura4-Δ18* de *S. pombe*.

pREPs: Estos vectores fueron obtenidos a partir del plásmido de *E. coli* pUC119. Confiere resistencia al antibiótico ampicilina y son autónomos en la bacteria. El marcador de selección para *S. pombe* es el gen *LEU2* procedente de *S. cerevisiae*. Estos plásmidos poseen el promotor *nmt1*⁺ (no message in thiamine), reprimible por tiamina. Hay tres versiones diferentes de este promotor dependiendo del nivel de expresión que produzcan. pREP3X es el más fuerte, pREP41X es de expresión media y pREP81X es el más débil. Los plásmidos tienen un sitio de clonación múltiple a continuación del promotor *nmt1*⁺ (Maundrell, 1993; Forsburg, 1993).

pJK148 (McLeod *et al*, 1987; Keeney & Boeke, 1994) Vector integrativo de 5343 pb. Posee un sitio de clonación múltiple, el gen *leu1*⁺ como marcador de selección en levaduras, el gen de resistencia a ampicilina, un fragmento del operón *lac* de *E. coli* y el origen de replicación ColE1 de *E. coli*. No posee secuencia ARS. La única forma de mantener este plásmido en la célula es estando integrado en el cromosoma. La eficiencia de integración se puede incrementar digiriendo con una enzima de restricción que corte en el ADN de la levadura (en el gen de interés o en el marcador de selección).

3.2. Construcción de plásmidos

3.2.1. Clonación del gen *clc1*⁺

El gen *clc1*⁺ se clonó a partir de ADN genómico amplificando mediante PCR las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *clc1*⁺. Como cebadores se utilizaron las parejas de oligonucleótidos *clc1Xba*-F/*clc1Xho*ATG-R para amplificar 1 kb de la región promotora no codificante del gen, y los oligonucleótidos *clc1STOPHpa*I-F/*clc1Sac*Pm-R para amplificar 1 kb de la región terminadora del mismo. Así mismo se amplificó el fragmento de ADN de 686 pares de bases correspondiente a la ORF de *clc1*⁺ utilizando los oligonucleótidos *clc1Xho*ATG-F/*clc1STOPHpa*I-R. Las secuencias de los diferentes oligonucleóticos empleados se muestran en la Tabla III de la sección 3 del Apéndice.

Los productos de PCR obtenidos se clonaron simultáneamente mediante clonación múltiple en el vector KS⁺ digerido con las siguientes enzimas de restricción: *Xba*I/*Xho*I para la región 5', *Xho*I/*Hpa*I para la ORF del gen, *Hpa*I/*Sac*I para la región 3' y *Xba*I/*Sac*I para el vector de clonación KS⁺. Posteriormente se secuenció la construcción utilizando los oligonucleótidos Universal y Reverso del vector KS⁺ y diversos oligonucleótidos específicos que anillaran en la región clonada del gen *clc1*⁺. Se comprobó que el gen clonado estaba libre de mutaciones por comparación de su secuencia con la depositada en las bases de datos.

El plásmido obtenido denominado KS+5'+*clc1*⁺+3' se empleó posteriormente para construir el casete de delección y para la introducción de sitios de restricción por mutagénesis dirigida. Estos sitios se usaron para poder realizar el marcaje de Clc1p con diferentes proteínas de fluorescentes y con el epítipo HA mediante la fusión con las secuencias codificantes correspondientes.

3.2.2. Construcción del casete de delección *clc1*::KAN

Con el fin de estudiar la función del gen *clc1*⁺ se procedió a la construcción de un mutante nulo para el mismo. Se empleó la técnica de reemplazamiento génico descrita por Rothstein en 1983 (Rothstein, 1983). Para ello se construyó el casete de delección *clc1*::KAN de la siguiente manera:

El plásmido KS+5'+*clc1*⁺+3' se digirió con las enzimas de restricción *Xho*I y *Hpa*I para eliminar la ORF del gen. El plásmido resultante se ligó al gen KANMX6 digerido con las mismas enzimas de restricción, de modo que éste reemplazó a la ORF del gen *clc1*⁺. El gen KANMX6 confiere resistencia a kanamicina en bacterias y resistencia a geneticina (también llamada G418) en levaduras. El plásmido resultante (KS+*clc1*::KAN) se digirió con las enzimas *Xba*I y *Sac*I para liberar el casete de delección que se empleó para transformar una cepa haploide homotética (HVP281) y una cepa diploide (HVP124) de *S. pombe*. Las diferentes estirpes de *S. pombe* utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla I de la sección 1 del Apéndice.

Se obtuvieron tres transformantes diploides capaces de crecer en medio rico suplementado con G418 y ningún transformante haploide. Se extrajo ADN genómico de esos clones que se utilizó para comprobar mediante PCR que la delección había ocurrido correctamente. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos *clc1*-5'F (externo a la región de ADN clonada), K2 (que hibrida en la región 5' del gen *KANMX6*), K3 (que hibrida en la región 3' del gen *KANMX6*) y *clc1*-3'R (externo a la región de ADN clonada).

3.2.3. Construcción del alelo 41XHA-*clc1*:KAN

El alelo 41XHA-*clc1*:KAN se construyó mediante el procedimiento de marcaje de la región N-terminal descrito por Bähler (Bähler *et al*, 1998) empleando los oligonucleótidos *clc1Nt*-F y *clc1Nt*-HA-R (ver Tabla III de la sección 3 del Apéndice). El producto de la amplificación por PCR se utilizó para transformar una cepa diploide (HVP124); los transformantes se seleccionaron en placas de PMG suplementadas con sorbitol y 300 µg/ml de G418 (ForMedium). Se diseccionaron tétradas en placas de PMG con y sin sorbitol.

La combinación del alelo mutante 41XHA-*clc1*⁺:KAN con otras proteínas marcadas se llevó a cabo mediante cruces genéticos con las cepas de interés y posterior germinación de las ascosporas aisladas al azar (Moreno *et al*, 1991) en placas de PMG+G418. Los clones de interés se seleccionaron mediante réplica en diferentes medios, según los marcadores de selección empleados, y se comprobaron mediante PCR y/o análisis por microscopía de fluorescencia.

3.2.4. Clonación del gen *apl3*⁺

El gen *apl3*⁺ se clonó desde el genoma de una cepa silvestre de *S. pombe* mediante la técnica de "Gap Repair" (Orr-Weaver *et al*, 1983). Esta técnica permite la transferencia de un fragmento de ADN desde el genoma a un plásmido replicativo. En este caso el gen *apl3*⁺ se clonó del siguiente modo:

Se emplearon los oligonucleótidos *apl3* *ApaI*-F y *apl3* *PstI*-R para amplificar por PCR una región de ADN de 1 kb, anterior al ATG de la ORF del gen *apl3*⁺ en el genoma de *S. pombe*, flanqueada por los sitios de restricción *ApaI* y *PstI*. Por otra parte los oligos *apl3* *XbaSpe*-F y *apl3* *SacI*-R se utilizaron para amplificar una región de tamaño similar a la anterior, flanqueada por los sitios de restricción *XbaI* y *SacI* posterior al codón de parada de *apl3*⁺. Ambos fragmentos se clonaron en el plásmido de *E. coli* KS⁺. El plásmido resultante se denominó KS⁺+5'+3' *apl3*⁺. Este plásmido se digirió con las enzimas *ApaI* y *SacI* para poder clonar las secuencias no codificantes de *apl3*⁺ entre los sitios de restricción *ApaI*/*SacI* del plásmido pAL de *S. pombe*. El plásmido resultante se denominó pAL+5'+3' *apl3*⁺. Para linearizarlo, este plásmido se digirió con las enzimas *PstI* y *SpeI* y se introdujo en la cepa silvestre HVP30 (ver Tabla I de la sección 1 del Apéndice) mediante transformación. Los transformantes se selec-

cionaron en placas de MM-leu. Los plásmidos de diversos transformantes de levaduras se recuperaron mediante extracción de ADN de levadura y transformación de *E. coli*. Posteriormente se confirmó que portaban la secuencia de *apl3*⁺ mediante análisis de restricción. Aquellos que presentaron el patrón correcto de ADN se secuenciaron y compararon con la secuencia del gen *apl3*⁺ depositada en las bases de datos, para comprobar que el gen clonado no presentaba ningún tipo de mutación. El plásmido resultante se denominó pAL+*apl3*⁺.

3.2.5. Construcción del casete de delección *apl3*::KAN

Para analizar los efectos de la ausencia de *apl3*⁺ en las células se construyó un casete de delección en el cual la ORF de este gen se sustituyó por el gen marcador *KANMX6* (Bähler *et al*, 1998). Para ello se empleó el plásmido generado previamente denominado KS⁺+5´+3´*apl3*⁺, de manera que el gen *KANMX6* se clonó como un fragmento de ADN *Sma*I/*Not*I entre las secuencias 5´ y 3´ del gen *apl3*⁺. El nuevo plásmido se denominó KS⁺+*apl3*::KAN, se digirió con las enzimas de restricción *Apa*I/*Sac*I para liberar el casete de delección y se utilizó para transformar un cepa haploide heterocigótica de *S. pombe* (HVP117). De este modo se obtuvieron diferentes transformantes capaces de crecer en medio rico suplementado con G418. La delección se comprobó mediante análisis por PCR del ADN de los clones obtenidos utilizando los oligonucleótidos *apl3* -665F (externo a la región de ADN clonada), K2 (hibrida en la región 5´ del gen *KANMX6*), K3 (hibrida en la región 3´ del gen *KANMX6*) y *apl3* 3956R (externo a la región de ADN clonada). Ver Tabla III de la sección 3 del Apéndice.

3.2.6. Marcaje de los genes *clc1*⁺, *apl3*⁺ y *chc1*⁺

Para detectar las proteínas de interés mediante ensayos tipo “Western Blot” se realizó el marcaje de las mismas con el epítipo HA (hemaglutinina) (Wilson *et al*, 1984). Para ello se utilizó un fragmento de ADN de 115 pb que porta tres copias consecutivas del epítipo HA. Éste es un pequeño péptido de 9 aminoácidos (YPYDVPDYA) procedente de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe.

En el caso del gen *clc1*⁺ se llevaron a cabo dos construcciones diferentes para analizar si la localización del epítipo afectaba a la estabilidad o a la cantidad de la proteína. En una de las construcciones el fragmento de ADN del epítipo HA se clonó antes del codón de parada del gen *clc1*⁺ para marcar la proteína resultante en su extremo carboxilo terminal; en la otra, el marcaje se realizó en el extremo amino terminal clonando la secuencia del epítipo HA detrás del ATG de inicio del gen *clc1*⁺. Para realizar estas construcciones fue necesario crear diferentes sitios de corte para la enzima de restricción *Not*I mediante mutagénesis dirigida *in vitro*. Esto es debido a que el fragmento de ADN del epítipo HA está flanqueado por sendos sitios de restricción *Not*I. La correcta inserción de los fragmentos se comprobó por análisis con enzimas de restricción y PCR. La funcionalidad de las proteínas se demostró mediante el análisis de la complementación del fenotipo de letalidad del mutante nulo *clc1*::KAN.

Del mismo modo se fusionaron las proteínas verde fluorescente GFP y roja fluorescente mCherry, flanqueadas por sitios *NotI*, antes del codón de parada del gen *clc1⁺*, para poder observar la localización de la proteína híbrida mediante microscopía de fluorescencia. En esta construcción Clc1p está separada de las proteínas fluorescentes por una “bisagra” de 12 alaninas para evitar la distorsión de la estructura de la proteína que se está estudiando. Las construcciones con las proteínas fluorescentes GFP y mCherry se comprobaron por análisis con enzimas de restricción y mediante PCR. La funcionalidad de estas proteínas se ratificó analizando la complementación de la letalidad del mutante nulo *clc1::KAN* en un medio sin sorbitol.

Estos mismos procedimientos de marcaje se llevaron a cabo para el gen *apl3⁺*, el cual fue marcado en su extremo carboxilo terminal tanto con el epítipo HA como con la proteína fluorescente GFP. Para ello se generó, mediante mutagénesis dirigida *in vitro*, un sitio de corte para la enzima de restricción *NotI* antes del codón de parada del gen *apl3⁺*. Las diferentes construcciones se comprobaron por análisis de restricción, PCR, secuenciación y microscopía de fluorescencia.

En este trabajo también realizamos el marcaje del gen *chc1⁺*, que previamente se había clonado en el laboratorio, con la secuencia de la proteína fluorescente GFP. Para ello, mediante mutagénesis dirigida *in vitro*, se generó un sitio de corte para la enzima de restricción *NotI* en la posición 2476 de la secuencia del gen *chc1⁺* que permitió realizar el marcaje en la región central del gen. La secuencia de la proteína fluorescente se introdujo en esa posición del gen *chc1⁺* para evitar que el marcaje en esa zona ocasionara distorsión en la estructura de la proteína Chc1p. La fusión de diferentes epítopos en los extremos amino o carboxi-terminales podría originar una pérdida de función al ser ambos extremos sitios de unión a otras proteínas.

4. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Las técnicas generales para el análisis de proteínas se realizaron acorde con los protocolos desarrollados por Harlow ([Harlow, 1988](#)) con algunas variaciones.

4.1. Obtención de extractos proteicos

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento (D.O._{600nm} entre 0,5-1,0) de un volumen mínimo de 30 ml. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm, se lavaron con agua fría o tampón “STOP” (NaCl 154 mM; EDTA 10 mM; NaN₃ 10 mM; NaF 10 mM) y se pasaron a tubos de microcentrífuga. Se añadieron 5 µl de tampón de extracción (HCl-Tris pH 7,2 50 mM; NaCl 350 mM; EDTA 50 mM;

PMSF 1mM; Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina 1 µg/ml) por D.O. de células en las muestras. En el caso de trabajar con proteínas que formasen cubiertas vesiculares se añadió al tampón de extracción GTP- γ -S (1 µl de una solución a 10 mM por muestra) para evitar el desensamblaje de éstas, ya que la adición de este compuesto ayuda a mantener activa la GTPasa Arf1p. La suspensión celular se rompió con Ballotini (perlas de vidrio de 0,45 µm de diámetro; "Glasperlen", Braun Biotech International), en una "Fast Prep" FP120 (Savant; Bio101) 3 veces durante 15 segundos, a una velocidad de 5,5 y a 4°C. Los extractos celulares se transfirieron a un nuevo tubo de 1,5 ml, frío, picando la base del tubo que contenía la muestra con una aguja caliente. Después se centrifugaron las muestras 30 segundos a 3000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para eliminar las paredes y los restos celulares. La cantidad de proteína en cada muestra se valoró usando el kit "Protein Assay" de BioRad (Método Bradford) usando duplicados de diluciones 1:10 de cada muestra y utilizando estándares de seroalbúmina bovina (BSA) para realizar una recta patrón (0-5-10-15-20 µl de una solución a 1 mg/ml). Seguidamente se añadió un volumen de tampón de carga SB2X (Tris HCl pH 6,8 100 mM, SDS 2%, β -Mercaptoetanol 0,286 M; glicerol al 20% y azul de bromofenol) igual al equivalente de extracto necesario para cargar entre 50 y 100 µg de proteína en el gel. Finalmente las muestras se hirvieron durante 5 minutos.

En los casos en los que la detección de determinadas proteínas fue difícil de conseguir o se quería evitar la degradación excesiva de las muestras, se varió el método de rotura de las muestras empleando un molino criogénico (FREEZER/MILL® 6670) lo que permitió mantener las muestras congeladas en todo momento evitando su degradación. En este caso el volumen de los cultivos empleados fue de 100 a 250 ml. Las células se recogieron por centrifugación durante 3' a 3000 rpm, se lavaron una vez con tampón "STOP" y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Una vez recogidas las células, se les añadió la cantidad pertinente de tampón de extracción para resuspenderlas. Posteriormente las muestras se sometieron a 2 ciclos de rotura de 10 segundos cada uno a una intensidad de 12 (rango 1-15). Una vez obtenidos los extractos celulares, la valoración y cuantificación de los mismos se llevaron a cabo del mismo modo que se hizo para las muestras obtenidas mediante ruptura con bolitas de vidrio.

4.2. Separación electroforética, transferencia e inmunodetección de proteínas

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (BioRad) a diferentes concentraciones, dependiendo del peso molecular de la proteína a analizar (del 6,5% al 9%), con SDS al 1% siguiendo la técnica descrita por Laemli en 1970 (Laemli, 1970). Se empleó el sistema de electroforesis "Mini Protean 3" de BioRad siguiendo las recomendaciones de la casa suministradora. La electroforesis de los geles se realizó empleando el tampón de carrera Laemli 1X (Tris base 3 g/l; glicina 14,4 g/l; SDS 1 g/l) a 150 V durante un período de 1 hora y 30 minutos aproximadamente.

La transferencia de proteínas a membranas de PVDF, (Inmobilon™-P, Millipore) para su posterior detección con anticuerpos se realizó mediante el sistema “Mini Trans Blot” (BioRad) usando el tampón de transferencia Tris-Glicina (Tris base 3 g/l; glicina 14,4 g/l; metanol 10%) durante 2-2,5 horas a 100 V, evitando el calentamiento excesivo del tampón manteniendo la cubeta en un baño de agua-hielo.

Con el fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo empleada fue leche en polvo desnatada (Sveltesse-Nestlé) al 5%, disuelta en TBST [Tris base 2,5 g/l; NaCl 9 g/l; Tween-20 (Sigma) al 0,25%].

Después del bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario pertinente (ver Tabla IV de la sección 3 del Apéndice) diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo la membrana se lavó 2 veces durante 10 minutos con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo, ver Tabla IV de la sección 3 del Apéndice) en la solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se efectuaron 2 lavados con TBST como en el caso del anticuerpo primario.

Para el revelado se recurrió a la detección de la actividad peroxidasa (enzima ligada al anticuerpo secundario) por quimioluminiscencia, empleando el kit “ECL detection” (Amersham Pharmacia) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La luminiscencia se detectó en películas fotosensibles (Fuji Medical Ray-X Film, Fujifilm).

4.3. Detección de la proteína Eng1-GFP en extractos celulares y en el medio de cultivo

Para determinar la secreción de la proteína Eng1-GFP se partió de cultivos de 50 ml (5×10^8 células aproximadamente). Los cultivos celulares se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm para separar las células del medio de cultivo. El medio de cultivo se concentró en un volumen final de 200 μ l usando filtros Amicon Ultra-15 (Millipore), centrifugando el volumen obtenido 4 veces, a 3500 rpm y a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se hirvieron en un volumen final de 400 μ l en presencia de tampón SB2X (HCl-Tris pH 6,8 50 mM; SDS 1%; β -mercaptoetanol 143 mM; glicerol 10%). Estas muestras se denominaron “medio”. Las células se procesaron para obtener extractos celulares del modo descrito en el apartado 4.1. y se hirvieron en un volumen final de 400 μ l de tampón SB2X. Estas muestras se denominaron “citosol”. Se cargaron 40 μ l de cada muestra (citosol y medio de cultivo) en geles de poliacrilamida al 6,5%. Para cada muestra, el “medio” y el “citosol” procedían del mismo volumen del cultivo original por lo que podían compararse directamente.

4.4. Co-inmunoprecipitación

Para realizar este tipo de experimentos se partió de cultivos en fase logarítmica de al menos 150 ml. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con 1 ml de tampón "STOP" y se transfirieron a tubos de 1,5 ml. Posteriormente se añadieron 5 µl de tampón de extracción (HCl-Tris pH 7,5 50 mM; NaCl 200mM; EDTA 5 mM; IGEPAL CA-630 0,5%; PMSF 1mM; Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina 1 µg/ml) por cada D.O. de células. Los extractos celulares se obtuvieron del modo explicado en el apartado 4.1. de esta sección. Seguidamente, de 1 a 5 mg de proteína de cada extracto se pasaron a un nuevo tubo y se llevaron hasta un volumen de 330 µl empleando tampón de extracción. 30 µl de cada muestra se mezclaron con 30 µl de SB2X y se hirvieron durante 5 minutos. Estas muestras se denominaron "Extractos Totales". Al resto de las muestras se les añadieron 300 µl de tampón de inmunoprecipitación (IP) (HCl-Tris pH 7,5 50 mM; NaCl 200 mM; EDTA 5 mM; Triton X-100 2%; PMSF 1 mM; Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina 1 µg/ml). A cada muestra se le añadieron 2,5 µl de anticuerpo anti-GFP de conejo (ver Tabla IV de la sección 3 del Apéndice) y todos se incubaron durante 2 horas a 4°C en rotación. Después se añadieron 50 µl de Proteína A-Sepharosa CL-4 (Pharmacia Biotech; 0,1 g/ml en tampón de IP) a cada tubo y se incubaron toda la noche, en rotación, a 4°C. Al día siguiente las bolitas se lavaron tres veces empleando 1 ml de tampón IP con inhibidores de proteasas y una vez con 1 ml de tampón PBS 1X (Phosphate Buffer Saline. Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM). Para precipitar las bolitas se realizaron varias centrifugaciones cortas y a baja velocidad (1 minuto a 1000Xg). Tras el último lavado se extrajo todo el líquido de las muestras, se añadieron 50 µl de SB2X a cada una de ellas y se hirvieron a 100°C durante 4 minutos para así poder liberar el anticuerpo de las bolitas. Finalmente, se realizó una centrifugación a alta velocidad (13200 rpm). Las electroforesis de proteínas de los "extractos totales" (15 µl en dos geles diferentes) y las muestras de inmunoprecipitado (15 µl en un gel, para revelar empleando anticuerpo anti-GFP, y los otros 35 µl en un segundo gel para revelar usando anticuerpo anti-HA) se analizaron realizando ensayo Western blot tal y como se ha explicado en el punto 4.2. de esta sección.

4.5. Ensayo de inmunoblot de colonias (Dot-blot)

El ensayo de inmunoblot de colonias descrito por Iwaki (Iwaki *et al*, 2006) con las modificaciones descritas por los autores Codlin y Mole (Codlin & Mole, 2009) para la detección de la proteína Cpy1 (carbopeptidasa Y), secretada por defectos en su transporte, se realizó usando la cepa 41XHAcl1 y diversas cepas control. Para ello las células se cultivaron en MM completo hasta llegar a la fase exponencial de crecimiento y se concentraron a una D.O._{600nm} de 2. Posteriormente de 5 a 8 µl de células se depositaron sobre una membrana de nitrocelulosa colocada sobre placas de MM que se incubaron durante 5 días a 28°C. Una vez pasado ese tiempo la membrana se lavó 2-3 veces con TBST para eliminar las células, se blo-

queó durante una hora en las condiciones explicadas en el apartado 4.4. y se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-CPY de *S. cerevisiae* (ver Tabla IV de la 3 del Apéndice). La membrana se reveló con el kit "ECL detection" (Amersham Pharmacia) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La luminiscencia se detectó en películas fotosensibles (Fuji Medical Ray-X Film, Fujifilm).

5. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

5.1. Valoración de la actividad fosfatasa ácida

Las células y el medio de cultivo en los que se realizó la valoración de la actividad fosfatasa ácida procedían de los mismos cultivos celulares.

5.1.1. Valoración de la secreción de fosfatasa ácida al medio de cultivo

Debido a que hasta un 40% de la fosfatasa ácida se secreta al medio en *S. pombe* (Wang *et al*, 2002) se procedió a valorar esta actividad enzimática en el medio de cultivo. Al comenzar el ensayo la D.O._{600nm} de los cultivos era de 0,3 a 0,9. Para cada muestra tomada se centrifugó 1 ml de cultivo, se recogieron 500 µl de sobrenadante que se mezclaron con 500 µl de solución del sustrato [Paranitrofenil-fosfato 2mM en tampón acetato sódico (AcNa) 0,1 M pH 4,0] precalentada a 30°C, y la mezcla se incubó a esa misma temperatura durante 5 minutos en rotación. Tras ese tiempo la reacción se detuvo añadiendo 500 µl de hidróxido sódico 1 M. Se midió la absorbancia a 405 nm de cada muestra para cuantificar la cantidad de nitrofenol liberado, utilizando como blanco 500 µl de medio de cultivo tratados de la misma forma que las muestras. En cada muestra se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm para poder referir la actividad fosfatásica (absorbancia a 405 nm) al número de células (absorbancia a 600 nm) de cada cultivo. La toma de muestras se realizó a distintos tiempos, manteniendo los cultivos a 28°C y en agitación.

Los resultados se expresaron relativizando la actividad fosfatásica con respecto al número de células en unidades arbitrarias.

5.1.2. Valoración de fosfatasa ácida en extractos celulares

Para determinar la producción de enzima fosfatasa ácida por las células, se valoró la actividad de esta enzima en el extracto celular de las diferentes cepas a estudiar. Para ello se realizó el experimento en células procedentes de cultivos de 25 ml creciendo a D.O.₆₀₀ de 0,3, 0,6 o de 0,9. Las células se recogieron centrifugando los cultivos a 3000 rpm durante 5 minutos. Éstas se lavaron dos veces con 1 ml de agua y una vez más con 1 ml de acetato de sodio 50 mM. Posteriormente se obtuvieron extractos proteicos añadiendo 200 µl de tampón de extracción (AcNa 50 mM; PMSF 1mM; Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina 1 µg/ml) a las muestras y procesándolas tal y como se ha descrito en el apartado 4.1. Se tomaron 5 µl de es-

tos extractos y se llevaron a un volumen de 500 μ l con AcNa 50 mM. Una vez preparadas las muestras, la valoración de la actividad fosfatasa ácida se llevó a cabo del modo que se explica en el punto 5.1.1. La actividad en este caso también se ha expresado en unidades arbitrarias.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de enzima fosfatasa ácida en el medio con respecto al total de enzima valorada tanto en extractos celulares como en medio de cultivo. Este dato se consideró el porcentaje de actividad secretada.

5.2. Valoración de la actividad β -glucán sintasa

Para realizar este ensayo se partió de un volumen de cultivo de 100 ml, creciendo exponencialmente, a una D.O.₆₀₀ máxima de 1,0. En cada ensayo se realizaron dos cultivos de cada cepa, para tener datos por duplicado.

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y a 4°C. Las células se lavaron con 10 ml de tampón de lavado (Tris HCl pH 8,0 50 mM; EDTA 1 mM; β -Mercaptoetanol 1 mM), se resuspendieron en 1 ml de este mismo tampón y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga frío. Las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 3000 rpm (a 4°C) y se descartaron los sobrenadantes. A cada muestra se le añadieron 120 μ l de tampón de lavado suplementado con 1 μ l de GTP- γ -S (10 mM) y Ballotini frío. La rotura de las células y la extracción de las proteínas se produjo tal y como se explica en la sección 4.1. Posteriormente, los extractos se transfirieron a tubos fríos, se diluyeron hasta 15 ml con tampón de lavado y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga a 4°C para eliminar las paredes celulares. Seguidamente los sobrenadantes se pasaron a tubos fríos de 30 ml y se centrifugaron durante 30 minutos, a 18000 rpm en una centrífuga Beckman con rotor 81X56Y a 4°C, para recoger las membranas celulares. Éstas se resuspendieron en un volumen final de 100 μ l de tampón de resuspensión (Tris HCl pH 8,0 50 mM; EDTA 1 mM; β -Mercaptoetanol 1 mM; glicerol 30%) usando varillas de vidrio y vórtex.

La cantidad de proteína se valoró tal y como se explica en el punto 4.1. de esta sección. Los extractos se igualaron a una concentración de 5 mg/ml de proteína con tampón de resuspensión.

Seguidamente se prepararon las mezclas de reacción empleando [¹⁴C] UDP-D-glucosa como sustrato. Las mezclas de reacción que se prepararon contenían los siguientes componentes:

Mezcla A (cantidades añadidas por cada muestra):

- H₂O: 9 µl
- [¹⁴C] UDP-D-glucosa (2x10⁵ cpm/µmol) 5 mM: 5 µl
- Seroalbúmina Bovina 6%: 5 µl
- GTP 6 mM: 1 µl

Mezcla B (cantidades añadidas por cada muestra):

- H₂O: 7 µl
- EDTA 17 mM: 5 µl
- Tris HCl pH 8 50 mM: 3 µl
- Membranas (de cada muestra): 5 µl

Se tomaron 20 µl de la mezcla de reacción A y se añadieron 20 µl de la mezcla de reacción B de cada muestra en tubos de vidrio. El volumen final de cada reacción fue de 40 µl en los que 5 µl correspondían a extractos de membrana de cada muestra. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 30 minutos. Después de este tiempo las reacciones se pararon añadiendo 2,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% a cada tubo y se incubaron a 4°C durante un mínimo de 30 minutos. Después las muestras se filtraron utilizando filtros Watman (Watman GF/C) que se lavaron 2 veces con 2,5 ml de TCA al 10% y una vez con 3-4 ml de etanol al 96%. Posteriormente los filtros se introdujeron en viales con 2,5 ml de solución de centelleo (OptiPhase "HiSafe", Wallac). La radioactividad de las muestras se valoró en un contador de centelleo (Wallac 1409).

6. ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR

6.1. Sensibilidad a la digestión por glucanasas

Las estirpes de interés se incubaron en medio rico YES durante toda la noche a 28°C. A la mañana siguiente los cultivos se reinocularon a una D.O._{600nm} de 0,5 y se mantuvieron tres horas a 28°C para que las células estuvieran creciendo en fase exponencial (D.O._{600nm} ≈ 1,0) a la hora de comenzar el ensayo. Para realizar el experimento se partió de un volumen de 3 ml de cada uno de los cultivos a una D.O._{600nm} = 2. Para ello fue necesario concentrar el volumen necesario de células de los cultivos originales por centrifugación. Una vez recogidas las células, éstas se lavaron con 5 ml de tampón citrato/fosfato 50 mM (Na₂HPO₄ 7,1 g/l; ácido cítrico 11,5 g/l; pH 5,6) y se resuspendieron en 3 ml de este mismo tampón suplementado con Zimoliasa 100T a una concentración final de 5 µg/ml. La Zimoliasa 100T es una enzima que degrada principalmente el β(1,3)glucano y el galactomanano de la pared celular de *S. pombe* (Perez & Ribas, 2004). Las muestras se incubaron durante cuatro horas a 28°C y durante ese tiempo se fue midiendo la densidad óptica de cada muestra cada 30 minutos.

6.2. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular

Para analizar la composición de la pared celular de *S. pombe* se utilizó el método descrito por Arellano y colaboradores (Arellano *et al*, 1996). Las células procedían de cultivos creciendo en fase exponencial y se diluyeron con medio sin glucosa hasta una D.O.₆₀₀ = 0,5 en un volumen total de 10 ml. Se añadieron 5 µCi (25 µl del stock) de ¹⁴C-glucosa a cada muestra. Los cultivos se incubaron durante 6 horas en un baño con agitación a 28°C. Posteriormente las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm, durante 5 minutos y a 4°C (los tubos se vaciaron vertiéndolos en un recipiente destinado a residuos radiactivos líquidos). Las células se lavaron 2 veces con 1 ml de EDTA 1 mM (a 12000 rpm durante 2 minutos a 4°C) y se transfirieron a tubos de 1,5 ml, con cierre de seguridad. Las células se resuspendieron en un volumen final de 1 ml de EDTA 1 mM. Se tomaron 10 µl de estas suspensiones y se transfirieron a tubos que contenían 1,2 ml de TCA al 10% (se hicieron duplicados de cada muestra). Las muestras se mantuvieron a 4°C y se denominaron "Alícuota 1" (Set "A", incorporación total).

El resto de células se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 minutos a 4°C y se dejó un pequeño volumen de sobrenadante para la posterior rotura celular. Las células se rompieron con Ballotini frío en una centrífuga FastPrep 2 veces durante 20 segundos a una velocidad de 5,5 (las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento) y posteriormente se añadieron 500 µl de EDTA 1 mM a cada muestra. Los extractos celulares se recogieron pinchando la base del tubo con una aguja caliente, introduciéndolos en tubos nuevos y centrifugándolos 30 segundos a 3000 rpm y a una temperatura de 4°C. Las muestras se resuspendieron en un volumen final de 1 ml de EDTA 1 mM mezclando con el vórtex. Finalmente se toma-

ron 10 µl de cada suspensión y se añadieron a tubos que contenían 1,2 ml de TCA al 10% (se hicieron duplicados de cada muestra) y se mantuvieron a 4°C. Estas muestras se denominaron "Alícuota 2" (Set "B", incorporación total incompleta).

El resto de las muestras se centrifugaron a 1000Xg, durante 10 minutos, a 4°C. Los precipitados se lavaron 3 veces con 1 ml de NaCl 2 M (centrifugando a 1000Xg durante 5 minutos) y una vez con 1 ml de EDTA 1 mM. Después las células se resuspendieron en un volumen final de 1 ml con EDTA 1 mM, y 20 µl de esas suspensiones se añadieron a tubos de microcentrífuga que contenían 1,2 ml de TCA 10% (duplicados para cada muestra). Éstos se guardaron a 4°C como "Alícuota 3" (Set "C", pared total).

El resto de las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron 10 minutos a 1000Xg y a 4°C. Después se resuspendieron en un volumen final de 500 µl de EDTA 1 mM. A continuación se prepararon las siguientes reacciones enzimáticas en un volumen total de 200 µl:

Control ("C"): 50 µl de paredes suplementadas con 50 µl de tampón citrato/fosfato 50 mM (pH 5,6) y 100 µl de agua.

Zimoliasa-1 ("Z1"): 100 µl de paredes suplementadas con 50 µl de tampón citrato/fosfato 50 mM (pH 5,6), 30 µl de agua y 20 µl de Zimoliasa 100T (10 mg/ml en agua).

Zimoliasa-2 ("Z2"): 100 µl de paredes suplementadas con 50 µl de tampón citrato/fosfato 50 mM (pH 5,6), 40 µl de agua y 10 µl de Zimoliasa 100T (10 mg/ml en agua).

Quantazima-1 ("Q1"): 100 µl de paredes suplementadas con 95 µl de tampón Tris 50 mM (pH 7,5) y 5 µl de Quantazima.

Quantazima-2 ("Q2"): 100 µl de paredes suplementadas con 97 µl de tampón Tris 50 mM (pH 7,5) y 3 µl de Quantazima.

Las diferentes reacciones se incubaron a 28°C durante 36-40 horas y posteriormente se centrifugaron durante 3 minutos a 13000 rpm. 50 µl del sobrenadante de cada una de las muestras se transfirieron a viales que contenían 2,5 ml de solución de centelleo (OptiPhase "HiSafe", Wallac) y se midieron directamente en el contador de centelleo (Wallac 1409). Se denominaron "Alícuota 4".

El resto de las reacciones se resuspendieron en 1 ml de TCA al 10%. Las muestras se llamaron "Alícuota 5".

Todos los precipitados de TCA (Alícuotas 1, 2, 3 y 5) se filtraron con filtros Watman (Watman GF/C) que se lavaron 2 veces con 2,5 ml de TCA al 10% y una vez con 3-4 ml de etanol al 96%. Posteriormente los filtros se introdujeron en viales con 2,5 ml de solución de centelleo. La radioactividad incorporada en todas las muestras se analizó en el contador de centelleo.

La Zimoliasa 100T es un complejo enzimático que contiene β -glucanasa y proteasas. El precipitado de la incubación con Zimoliasa 100T corresponde por lo tanto al α -glucano que no se degrada por esta mezcla enzimática. La Quantazima es una $\beta(1,3)$ glucanasa recombinante. El sobrenadante de la incubación con Quantazima proviene por lo tanto de la degradación del $\beta(1,3)$ glucano, mientras que en el precipitado de las muestras permanecen el $\beta(1,6)$ glucano, el α -glucano y el galactomanano. La diferencia entre los precipitados de Quantazima y Zimoliasa 100T corresponden al galactomanano más el $\beta(1,6)$ glucano que no se pueden separar con el procedimiento utilizado.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera: primero se calculó la media del valor de las muestras que están por duplicado y posteriormente se hicieron los siguientes cálculos para cada "Alícuota".

Alícuota 1: $10 \mu\text{l} \times 100 =$ incorporación total

Alícuota 2: $10 \mu\text{l} \times 100 =$ incorporación total incompleta

Alícuota 3: $20 \mu\text{l} \times 50 =$ Paredes totales

Alícuota 4: Sobrenadante

Control: Degradación espontánea

Zimoliasa: β -glucano + Manano: $50 \mu\text{l} \times 4 \times 5$

Quantazima: β -glucano: $50 \mu\text{l} \times 4 \times 5$

Alícuota 5: Precipitado

Control: Paredes totales $50 \mu\text{l} \times 10$

Zimoliasa: α -glucano $100 \mu\text{l} \times 5$

Quantazima: α -glucano + Manano $100 \mu\text{l} \times 5$

7. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIÓNES

7.1. Microscopía de campo claro y de contraste de fases

Para la observación de células en campo claro o en contraste de fases se tomaron muestras directamente de los cultivos incubados en medio líquido o en placa para su observación en un microscopio Leica DM RXS. La captación de imágenes obtenidas en este microscopio se realizó con una cámara digital Leica Qsensys y el programa informático Qfish asociado a ella.

Tinción con azul de metileno

El azul de metileno es un colorante que sólo entra en las que están muertas y han perdido la permeabilidad selectiva, de modo que estas células quedan teñidas de color azul, mientras que las células intactas no se tiñen con este colorante. En los casos que interesó comprobar si las células mantenían la integridad celular se tomaron muestras de los cultivos y se mezclaron con un volumen igual de una solución de azul de metileno al 0,1%. Las muestras se observaron inmediatamente mediante microscopía de campo claro.

7.2. Microscopía de fluorescencia

La observación de muestras con fluorescencia se realizó en un microscopio Leica DM RXA mediante la iluminación de las muestras con un sistema de epifluorescencia empleando una lámpara de mercurio de 100 W (EBQ100). La captación de las imágenes obtenidas con este microscopio se realizó con una cámara digital Leica DM RXS y el programa informático Qfish asociado a ella. También se utilizó un equipo Personal DeltaVision Microscope (Applied Precision) equipado con un microscopio invertido Olympus IX-70, una lámpara de xenón y una cámara Photometrics HQ-2. La captación de imágenes se hizo con el programa informático DeltaVision Softworx Resolve3D asociado al sistema. Se usaron los filtros adecuados para dejar pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Las imágenes obtenidas de esta manera se procesaron con los programas Adobe Photoshop e ImageJ. Las micrografías obtenidas con el sistema DeltaVision son series de 20 planos adquiridos en z a intervalos de 0,2 μm . Las proyecciones máximas que se muestran corresponden a los 6-8 planos centrales adquiridos en cada serie. Teniendo en cuenta estas observaciones, en cada ensayo realizado en con este microscopio se indica si las imágenes mostradas son planos medios o proyecciones máximas.

7.2.1. Fluorescencia directa con proteínas de fusión

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz ultravioleta de longitud de onda de 488 nm. La GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariontas. Por ello suele usarse como sistema de detección de la expresión y localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para ello es necesario fusionar la secuencia de ADN que codifica esta proteína en fase con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la muestra en el microscopio de fluorescencia. Existen formas alélicas mutadas de la proteína GFP, como la eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein), la cual es más brillante que la versión original (λ excitación 488 nm y λ emisión 507 nm) que es la que se ha usado en este trabajo. La proteína roja fluorescente (RFP), emite luz roja (λ excitación 584 nm y λ emisión 607 nm) al ser excitada y fue aislada por primera vez de la especie de coral *Discosoma striata*.

Localización de Clc1-GFP en cultivos tratados con Brefeldina A

Para bloquear el proceso de secreción en la célula y así poder observar más nítidamente la localización de la proteína Clc1p en los lugares de endocitosis se empleó la droga Brefeldina A (SIGMA). Éste es un compuesto que inhibe el transporte desde el retículo endoplasmático hasta el Golgi (Turi *et al*, 1994). Se sabe que en neuronas inhibe el transporte desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi, pero que no interfiere con el reclutamiento de AP-2 y clatrina en la membrana plasmática (Krauss *et al*, 2003). Con este fin se añadió la droga a una concentración final de 100 μ M a cultivos líquidos creciendo exponencialmente y se incubaron las muestras durante 10 minutos a 30°C. La solución madre estaba a una concentración de 5 mg/ml en etanol al 70%. Estos experimentos se realizaron por duplicado usando un cultivo tratado con etanol al 70% como control.

7.2.2. Tinción con Calcofluor

El Calcofluor es un compuesto que se une a los polímeros con enlaces $\beta(1,3)$ y $\beta(1,4)$. Por esta razón se usa para teñir la pared celular fúngica y para detectar posibles anomalías en dicha estructura. En *S. cerevisiae* el Calcofluor tiñe esencialmente las zonas de la pared celular ricas en quitina. En el caso de *S. pombe*, que no posee cantidades detectables de quitina, el Calcofluor se une al $\beta(1,3)$ glucano con cierta afinidad y tiñe el septo y los polos celulares (lugares de síntesis activa de pared celular). El Calcofluor es excitado por la luz ultravioleta de unos 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia de color azul. La fuente de Calcofluor utilizada fue Blancophor BBH (Bayer Corporation). Este colorante se preparó a una concentración de 10 mg/ml disolviéndolo en agua con ayuda de unas gotas de KOH 10 N, ya que este compuesto precipita a pH ácido. Posteriormente la solución se filtró y se mantuvo a 4°C, protegiéndola de la luz.

Para proceder a la tinción de las células, 1 ml de un cultivo celular en fase logarítmica de crecimiento se centrifugó durante 1 minuto a 3000 rpm para recoger las células. Las células se lavaron con 1 ml de agua y se resuspendieron en Calcofluor a una concentración final de 50 μ g/ml y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las células se lavaron dos veces con agua, se resuspendieron en un pequeño volumen y se observaron al microscopio de fluorescencia.

7.2.3. Tinción con Hoechst 33258

Cuando interesó analizar la distribución de los núcleos celulares se empleó Hoechst 33258, un colorante que se une preferentemente a las zonas que contienen A-T en el DNA de doble cadena y que tras su excitación con luz de longitud de onda de 360 nm, emite fluorescencia azul (470 nm). Se utilizó una forma de Hoechst, denominada H33258, que es muy soluble, pero que no es muy permeable para las células de *S. pombe*. De este modo se obtiene una tinción simultánea de los núcleos (por tinción específica del ADN) y de la pared celular (por tinción inespecífica de la misma por las moléculas de Hoechst que no logran penetrar en las células) en células vivas.

Para realizar la tinción se tomó 1 ml de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento, se lavó con 1 ml de agua y las células se resuspendieron en 20 μ l de Hoechst 33258 a 50 μ g/ml (preparada a partir de una solución madre de este colorante que estaba a 1 mg/ml en agua). Las células se tiñeron de esta manera durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con agua y se observaron al microscopio de fluorescencia (λ excitación 352 nm; λ emisión 455 nm).

7.2.4. Tinción de actina con Rodamina-faloidina y Alexa-fluor 488

La faloidina es un extracto de una toxina procedente del hongo *Amanita phalloides*, capaz de unirse a los filamentos de actina (F-actina) con alta afinidad. Aprovechando esta propiedad, puede usarse conjugada con un componente fluorescente para detectar la actina en la célula. En este caso la faloidina estaba conjugada con el fluorocromo Rodamina que emite fluorescencia de color rojo o con el compuesto fluorescente Alexa-fluor 488 que emite fluorescencia verde. Las distintas tinciones de actina se realizaron siguiendo las indicaciones y modificaciones hechas por F. Chang del protocolo inicial descrito por (Marks & Hyams, 1985). Se siguió el mismo protocolo para ambas tinciones. Se tomaron 5 ml de un cultivo en fase exponencial y se les añadió 1 ml de formaldehído al 16% (libre de metanol, PolyScience) para fijar las células y 660 μ l de tampón PEM (PIPES 100 mM, EGTA 1 mM, Mg_2SO_4 1 mM pH 6,9). Esta mezcla se incubó en un agitador orbital durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con tampón PEM y luego se permeabilizaron durante 30 segundos con el mismo tampón suplementado con Triton X-100 al 1% para permitir que la faloidina conjugada con los distintos marcadores fluorescentes entrara en las células. Las células se lavaron 3 veces con PEM, se tomó 1 μ l de la suspensión de células y se añadieron 4 μ l de Rodamina-faloidina (Molecular Probes), o de Alexa-fluor 488 (Molecular Probes) que estaban resuspendidos en tampón PEM. Las muestras se incubaron en oscuridad y rotación durante 45-60 minutos. Éstas se examinaron con el microscopio de fluorescencia. Rhodamina-faloidina (λ excitación 558 nm; λ emisión 575 nm); Alexa-fluor 488 (λ excitación 493 nm; λ emisión 520 nm).

7.2.5. Tinción con Filipin

Para observar la distribución de los esteroides de la membrana plasmática se realizó una tinción con el colorante Filipin que se une a las regiones de la membrana ricas en dichos lípidos, denominadas *lipid-rafts*. Para ello se partió de cultivos creciendo en fase logarítmica. Se tomaron 1,5 ml del cultivo celular y se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto. Las células obtenidas se resuspendieron en 100 μ l de agua estéril y se añadió 1 μ l del colorante (concentración final de 50 μ g/ml de una solución madre a 5 mg/ml en DMSO; SIGMA). Las muestras se observaron inmediatamente al microscopio de fluorescencia ya que el Filipin es un compuesto tóxico que afecta a la viabilidad de las células.

7.2.6. Tinción con FM4-64

Para analizar el proceso de endocitosis se empleó la tinción de células vivas con el colorante FM4-64 (Vida & Emr, 1995). El FM4-64 [dibromuro de N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(dietilamino)fenil) hexatrienil) piridina] es un colorante lipofílico fluorescente que permite observar el proceso de endocitosis desde su incorporación a la membrana plasmática, su transporte por la ruta endosomal y su llegada e incorporación a la membrana vacuolar como destino final. Esta última característica permite también analizar la morfología de dichos orgánulos celulares.

Para la tinción con este colorante se partió de cultivos en fase logarítmica de crecimiento ($D.O_{600nm}$ 0,8-1,0). Se tomó 1 ml de cultivo de la muestra a estudiar y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se retiró el sobrenadante dejando una pequeña cantidad del mismo para resuspender las células. El tubo con la muestra se introdujo en hielo de 3 a 5 minutos para así detener el proceso de endocitosis. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 1,2 μ l de una dilución 1:10 en agua del colorante FM4-64 (Synaptored, Biotium. Stock disuelto en agua a 10 mM). Dependiendo del objetivo del estudio se mantuvieron las muestras en diferentes condiciones:

Para permitir una incorporación eficiente del colorante a la membrana se mantuvieron las muestras en hielo durante 3-5 minutos. A partir de este tiempo se pudieron observar claramente las zonas activas de endocitosis en la membrana plasmática, siendo el marcaje más intenso en las zonas de los polos y de septación de las células en división. Debido a la rápida internalización de este colorante, a los 2 minutos ya se apreciaban endosomas en el interior celular. Para ver la envuelta vacuolar fue necesario incubar las muestras un mínimo de 30 minutos a 30°C después de haber añadido el colorante.

En aquellos mutantes con defectos en tráfico vesicular fue necesario mayor tiempo de incubación tanto para ver los primeros endosomas (de 5 a 30 minutos a 30°C dependiendo del mutante a tratar), como para visualizar la incorporación del colorante a la membrana vacuolar (de 30 a 180 minutos a 30°C). También fue necesario un incremento en los tiempos de incubación cuando se analizaron muestras procedentes de un medio suplementado con sorbitol debido a que este medio es muy viscoso y el colorante tiene mayor dificultad para entrar en las células.

En todos los casos las células se observaron al microscopio de fluorescencia (λ excitación 508 nm; λ emisión 751 nm) tras la incubación en las condiciones adecuadas.

7.2.7. Tinción con Lucifer Yellow

Con el fin de estudiar la endocitosis de compuestos solubles y de partículas de bajo peso molecular (pinocitosis) se tiñeron las células con el colorante vital Lucifer Yellow CH. Este colorante de bajo peso molecular es soluble e impermeable a la membrana plasmática, se toma por endocitosis y termina por almacenarse en el lumen vacuolar (Riezman, 1985).

Se tomaron 1,5 ml del cultivo, se centrifugaron a 3000 rpm y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 90 μ l de medio de cultivo y se añadieron 10 μ l del colorante Lucifer Yellow (de una solución a 40 μ g/ml en agua. Biotium). Las muestras se incubaron de 15 a 90 minutos a 30°C y seguidamente se lavaron dos veces con 1 ml de agua. Las células se resuspendieron en 100 μ l de medio de cultivo y se observaron inmediatamente al microscopio de fluorescencia (λ excitación 428 nm; λ emisión 542 nm).

7.2.8. Tinción con CDCFDA

Para observar la morfología vacuolar se realizaron tinciones con el compuesto 5-6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (CDCFDA). Este compuesto entra en las células por un mecanismo independiente de la endocitosis y se almacena en las vacuolas (Roberts *et al*, 1991).

A 1 ml de cultivo creciendo en fase exponencial se le añadió 1 μ l de CDCFDA (de una solución a 48 mM en DMSO. SIGMA). La muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación. Pasado ese tiempo las células se lavaron 3 veces con 1 ml de medio de cultivo. Posteriormente se resuspendieron en 1 ml de medio y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia con el filtro adecuado (λ excitación 492 nm; λ emisión 517 nm).

7.2.9. Microscopía confocal: Recuperación de fluorescencia después de “photobleaching” (FRAP)

Los experimentos de FRAP se realizaron utilizando un microscopio confocal Spinning disc OLYMPUS IX 81, equipado con una “cabeza” confocal CSUX1-A1 (Yokogawa), un objetivo PPlan Apo 100x/1,4 para aceite de inmersión y una cámara de adquisición EVOLVE de PHOTOMETRICS. El quemado de la fluorescencia se realizó con un módulo de línea de láser iLas (ROPER Scientific). En estos experimentos se quemaron las zonas de los polos celulares en su totalidad mediante tres pulsos de láser a máxima potencia. Posteriormente se midió la recuperación de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo. Para ello se adquirieron imágenes previamente al quemado de la señal, inmediatamente después y en intervalos regulares de 10-15 segundos durante 10-15 minutos. Tanto la adquisición y el tratamiento de las imágenes como la obtención y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el programa de software Metamorph.

7.3. Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica se realizó sobre células fijadas en glutaraldehído (EM grade, SIGMA) y teñidas con permanganato potásico al 2% como se describe en [\(Neiman 1998\)](#). Las secciones ultrafinas se cortaron empleando un micrótomo Jung Reichert (Leica Mikroskopie y System GmbH) y se observaron usando un microscopio electrónico de transmisión JEM1010 (Jeol) a 100 kV.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo con el programa SPSS Statistic 17.0. Para comprobar la significación estadística de los resultados obtenidos se realizaron los test t-Student y Wilcoxon-Mann-Whitney.



APÉNDICE



SECCIÓN 1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO

Tabla I. Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> empleadas en este trabajo		
Estirpe	Genotipo	Procedencia
HVP30	<i>leu1-32 his3Δ1 ura4Δ8 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP114	<i>leu1-32/leu1-32 ura4-Δ18/ura4Δ18 his3-Δ1/his3Δ1 h⁺/h⁻</i>	Colección HVM
HVP117	<i>leu1-32 his3Δ1 ura4Δ18 ade6 h⁺</i>	Colección HVM
HVP124	<i>leu1-32/leu1-32 ura4-Δ18/ura4Δ18 h⁺/h⁻</i>	Colección HVM
HVP162	<i>leu1-32 his3-Δ1 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP281	<i>leu1-32 ura4Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP407	<i>cdc10 leu1-32 h⁻</i>	S. Moreno
HVP408	<i>cdc25-22 leu1-32 h⁺</i>	S. Moreno
HVP630	<i>cfh3::KAN h⁻</i>	Colección HVM
HVP994	<i>cdc15-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4-Δ18 h⁻</i>	S. Moreno
HVP1053	<i>rlc1-GFP:KAN leu1-32 ura4-Δ18 h⁻</i>	P. Pérez
HVP1221	<i>sec8-GFP:ura4⁺ leu1-32 h⁻</i>	M. Balasubramanian
HVP1467	<i>bgs3::ura4 Pbg3::GFP-bgs3:leu1h⁻</i>	J.C. Ribas
HVP1469	<i>bgs4::ura4⁺ Pbg4::GFP-bgs4:leu1⁺ h⁻</i>	J.C. Ribas
HVP1471	<i>bgs1::ura4⁺ Pbg1::GFP-bgs1:leu1⁺ his3-Δ1 h⁻</i>	J.C. Ribas
HVP1705	<i>sla2/end4-GFP leu1-32 ura4Δ18 ade6 h⁻</i>	P. Nurse
HVP1711	<i>end4::ura4⁺ leu1-32 h⁹⁰</i>	K. Takegawa
HVP1732	<i>sty1-HA6His:ura4 h⁺</i>	M. Gacto
HVP1797	<i>cwg1-1 h⁻</i>	J.C. Ribas
HVP2031	<i>sad1-GFP:KAN leu1-32 ura4Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
HVP2032	<i>GFP-psy1:leu1⁺ h⁹⁰</i>	Yeast Genetic Resource Center (Japan)
HVP2093	<i>clc1::KAN/clc1⁺ leu1-32/leu1-32 h⁺/h⁻</i>	Este trabajo
HVP2095	<i>clc1-GFP:leu1⁺ ura4-Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2096	<i>clc1-HA:leu1⁺ ura4-Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2113	<i>clc1::KAN clc1-HA:leu1⁺ h⁺</i>	Este trabajo
HVP2114	<i>clc1::KAN clc1-GFP:leu1⁺ h⁺</i>	Este trabajo
HVP2121	<i>cdc10 clc1-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP2122	<i>cdc25 clc1-GFP:leu1⁺ h⁺</i>	Este trabajo
HVP2215	<i>clc1::KAN leu1-32 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2217	<i>clc1::KAN leu1-32 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2225	<i>end4::ura4 Clc1-GFP:leu1⁺ h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2266	<i>clc1::KAN leu1-32 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2273	<i>GFP-syb1:KAN leu1-32 h⁻</i>	Y. Sánchez
HVP2285	<i>apl3-HA:leu ura4Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2286	<i>apl3-GFP:leu ura4Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2288	<i>wis1.DD h⁻</i>	R. Aligué
HVP2364	<i>clc1::KAN pAL+GFP-bgs1</i>	Este trabajo
HVP2365	<i>clc1::KAN pAL+GFP-bgs3</i>	Este trabajo
HVP2366	<i>clc1::KAN pAL+GFP-bgs4</i>	Este trabajo

HVP2367	<i>GFP-atb2:KAN cut11-RFP:Hygr sfi1-CFP:Nat leu1-32 ura4Δ18 his2 h⁺</i>	Yeast Genetic Resource Center (Japan)
HVP2408	<i>Cut11-mRFP:Hyg leu 1-32 ura4Δ18 his2 h⁻</i>	Colección HVM
HVP2424	<i>KS+ura4⁺ +clc1-HA apl3-GFP:leu h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2466	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2468	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2547	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN/clc1⁺ ura4Δ18 his3Δ1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2557	<i>apl3::Kan clc1-GFP:leu ura4Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2625	<i>KS+ura⁺ +apl3-HA GFPBgs1:leu h⁻</i>	Este trabajo
HVP2679	<i>apl1-GFP:KAN h⁺</i>	Este trabajo
HVP2680	<i>apl3::ura4 apl1-GFP h⁺</i>	Este trabajo
HVP2693	<i>apl1::KAN apl3-GFP h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2705	<i>apl3::KAN h⁺</i>	Este trabajo
HVP2706	<i>apl3::KAN h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2708	<i>sty1-HA6His:ura apl3::KAN</i>	Este trabajo
HVP2717	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN apl3::ura4 his3Δ</i>	Este trabajo
HVP2720	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN leu1-32 his3 Δ1 ura4Δ18 ade6 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2726	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN pAU+eng1-GFP</i>	Este trabajo
HVP2777	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN chc1-GFP₂₄₇₆:leu</i>	Este trabajo
HVP2779	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN GFP-bgs1:leu</i>	Este trabajo
HVP2781	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN GFP-bgs3:leu</i>	Este trabajo
HVP2783	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN GFP-bgs4:leu</i>	Este trabajo
HVP2784	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN apl3-GFP:leu</i>	Este trabajo
HVP2786	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN cdc15-GFP:ura⁺</i>	Este trabajo
HVP2803	<i>for3-GFP:ura4⁺ leu1-32 ade6-M21 h⁻</i>	P. Pérez
HVP2806	<i>arc5-GFP:KAN uraΔ18his3Δ1 ade6 h⁻</i>	C.R. Vázquez
HVP2810	<i>apm1-GFP:leu puC ura chc1-RFP₂₄₇₆</i>	Este trabajo
HVP2817	<i>apl3::KAN GFP-bgs1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2818	<i>apl3::KAN GFP-bgs4 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2831	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN atb2-GFP:KAN</i>	Este trabajo
HVP2832	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN sad1-GFP:KAN</i>	Este trabajo
HVP2840	<i>sty1::Nat h⁺</i>	Colección HVM
HVP2841	<i>apl3::KAN sty1::Nat h⁺</i>	Este trabajo
HVP2876	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN sec8-GFP:ura4</i>	Este trabajo
HVP2877	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN end4-GFP:KAN</i>	Este trabajo
HVP2884	<i>cfh3::KAN h⁺</i>	Colección HVM
HVP2907	<i>pUC ura+apl3-GFP h⁺</i>	Este trabajo
HVP2944	<i>To-bgs1:leu1 apl3-GFP:ura</i>	Este trabajo
HVP2950	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN arc5-GFP:KAN</i>	Este trabajo
HVP2956	<i>cfh3::KAN apl3::Hph h⁺</i>	Este trabajo
HVP3089	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN GFP-psy1:leu⁺</i>	Este trabajo
HVP3097	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN GFP-syb1:KAN</i>	Este trabajo

HVP3173	<i>wis1.DD:ura4 apl3::KAN</i>	Este trabajo
HVP3328	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN apm1-GFP:leu chc1-RFP₂₄₇₆:ura4</i>	Este trabajo
HVP3392	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN for3-GFP:ura4</i>	Este trabajo
HVP3457	<i>apl3::KAN cwg1-1</i>	Este trabajo
HVP3459	<i>GFP-rho1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP3460	<i>apl3::KAN GFP-rho1</i>	Este trabajo
HVP3473	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN pAU h⁺</i>	Este trabajo
HVP3475	<i>41xnmmt:HA-clc1:KAN paU+chc1 h⁺</i>	Este trabajo

Tabla II. Cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Procedencia
DH5 α	<i>supE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Stratagene
CJ236	<i>dut-1, ung-1, thi-1, relA-1; pCJ104 (Cm^r)</i>	BioRad

SECCIÓN 2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO

Medios de cultivo de *Schizosaccharomyces pombe*:

Medio YES (Yeast Extract with Supplements)		
Extracto de levadura	5 g/l	0,5% (p/v)
Glucosa (3%)	30 g/l	3,0% (p/v)
Glucosa (1%)	10 g/l	1,0% (p/v)
Suplementos: adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo	225 mg/l	

Variaciones:

YES + Sorbitol: YES suplementado con sorbitol 1,2 M.

Medio Mínimo EMM (Edinburgh Minimal Medium)		
Potasio Hidrógeno Ftalato	3 g/l	14,7 mM
Na ₂ HPO ₄	2,2 g/l	15,5 mM
NH ₄ Cl	5 g/l	93,5 mM
Glucosa	20 g/l	2% (p/v)
Sales*	20 ml/l	
Vitaminas*	1 ml/l	
Minerales*	0,1 ml/l	
Sales (50x)		
MgCl ₂ 6H ₂ O	53,5 g/l	0,26 M
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,74 g/l	4,99 mM
KCl	50 g/l	0,67 M
Na ₂ SO ₄	2 g/l	14,10 M
Vitaminas (1000x)		
Pantotenato sódico	1 g/l	4,20 mM
Ácido nicotínico	10 g/l	81,20 mM
Inositol	10 g/l	55,5 mM
Biotina	10 mg/l	40,80 μM
Minerales (10000x)		
H ₃ BO ₃	5 g/l	80,90 mM
MnSO ₄	4 g/l	23,70 mM
ZnSO ₄ 7H ₂ O	4 g/l	13,90 mM
FeCl ₃ 6H ₂ O	2 g/l	7,40 mM
H ₂ MoO ₄ H ₂ O	0,4 g/l	2,47 mM
KI	1 g/l	6,02 mM
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,4 g/l	1,60 mM
Ácido cítrico	10 g/l	47,60 mM

Variaciones:

Medio mínimo más suplementos: Medio mínimo suplementado con los aminoácidos necesarios (adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo) a 225 mg/l.

Medio mínimo + sorbitol: Medio mínimo suplementado con sorbitol 1,2 M.

Medio mínimo para conjugación: Medio mínimo con menor cantidad de vitaminas (0,8 ml/l).

PMG (Pombe Glutamate Medium): Medio que posee la misma composición que el medio mínimo con la variación de la sustitución del NH₄Cl por ácido L-glutámico (3,75 g/l).

Medios de cultivo de *Escherichia coli*:

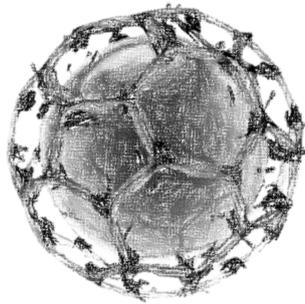
Medio LB (Luria Bertani)		
Bactotripton	10 g/l	1,0% (p/v)
Extracto de levadura	5 g/l	0,5% (p/v)
NaCl	10 g/l	1,0% (p/v)

Medio YT2x		
Bactotripton	16 g/l	1,6% (p/v)
Extracto de levadura	10 g/l	1,0% (p/v)
NaCl	10 g/l	1,0% (p/v)

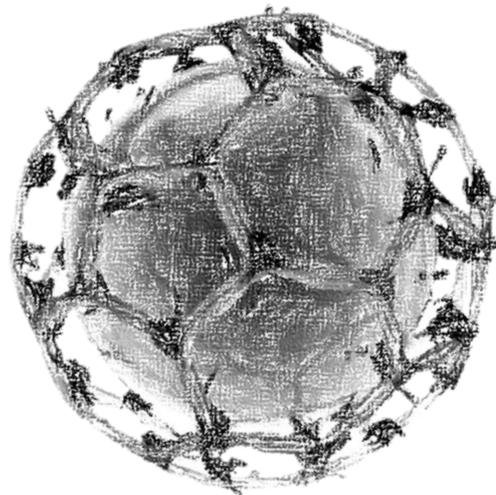
SECCIÓN 3. PRINCIPALES OLIGONUCLEÓTIDOS Y ANTICUERPOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo		
Nombre	Secuencia 5´- 3´	Utilidad
<i>clc1 Xho</i> IATG-F	CCGCTCGAGATGTCTCAATTTCCGGCTTAGA AGAC	Clonación del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1</i> STOPHpa-R	GGCGTTAACCTAAGAAGAAGAGGATACAGTT GTGCC	Clonación del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1Xba</i> I-F	ACCTCTAGAAAATACACCATGTAGGAGT	Clonación del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1 Xho</i> ATG-R	GCCCTCGAGGGTGGTTGGTAAAGTTGAAAGT G	Clonación del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1</i> STOPHpa-F	GGCGTTAACAGATAAAGCTCTCCAATCCTTTT TGCTTC	Clonación del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1 SacPm</i> -R	CCCGAGCTCCACGTGATGCATAATCGTAGTAT GACTACCATTACG	Clonación del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1</i> 5´-F	CAGATTGCAGTAAGACCTCGATATCAT	Comprobación de la deleción del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1</i> 3´-R	GCAGAAGTAATGGTGGTAAAACGATTC	Comprobación de la deleción del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1 Bm</i> -F	GAAAAGGATCCAAGAAAGAGATGAGTC	Comprobación de la deleción del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1 Bm</i> -R	GACTCATCTCTTCTTGGATCCTTTTC	Comprobación de la deleción del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1 Not</i> -STOP	GGATTGGAGAGCTTTATCTCTAGCGGCCGCCA GAAGAAGAGGATCAAG	Introducción de un sitio <i>Not</i> I antes del STOP del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1 Not</i> -ATG	CCGAAAATTGAGAGCGGCCGCCCATGGTGGTT GGTAA	Introducción de un sitio <i>Not</i> I antes del ATG del gen <i>clc1</i> ⁺
<i>clc1</i> Nt-F	TCTATCTTGGTTTAGCGAATTTTTTATAAGAA AAAAAACCTCAGTGTTATAGATGTTATTTTT AGTGATATATAACGGAATTCGAGCTCGTTAAAC	Construcción del alelo 41XHA <i>clc1</i> :KAN
<i>clc1</i> NtHA-R	TCAGTATTATTTTTAGAGTCATCAACAGGAGC GGTAACCAAACCGTCGTCAAAGTCTTCTAAAG CCGAAAATTGAGACATGCACTGAGCAGCGTAA ATCTG	Construcción del alelo 41XHA <i>clc1</i> :KAN
<i>chc1</i> 2476 <i>Not</i>	GGTTTAACTAAATCACCCAAGCGGCCGCCCGC TTCTGTACAGGCC	Introducción de un sitio <i>Not</i> I en la posición 2476 de <i>chc1</i> ⁺
<i>apl3 Apa</i> -F	TTGGGCCCGCTTGCATAGTTGCCCATGC	Clonación del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3 Pst</i> I-R	CTGCAGCATTTTTACTATTTGTATACTTTGTG AGC	Clonación del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3 XbaSpe</i> -F	TCTAGAACTAGTTAGTTGTCGCTGCTACTCTC	Clonación del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3 Sac</i> I-R	GAGCTCAGGCGTCGGGTCGGCAGG	Clonación del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3</i> -665-F	CCCGGCTTGCATTCATCACG	Comprobación de la deleción del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3</i> 1310-R	CAACTCATGGTTCTCGTTAG	Comprobación de la deleción del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3</i> 3315-F	CCATTGGGGTCAAATGGGAGT	Comprobación de la deleción del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3</i> 3956-R	GTCCTAGCGTGTGCCAAATAAGGA	Comprobación de la deleción del gen <i>apl3</i> ⁺
<i>apl3 Not</i> -STOP	GAGTAGCAGCGACAATATTAGCGGCCGCCAA ACGAATTCCTTAAAATC	Introducción de un sitio <i>Not</i> I antes del STOP del gen <i>apl3</i> ⁺
K2	GTCGCACCTGATTGCCCGAC	Comprobación de las deleciones de los genes <i>clc1</i> ⁺ y <i>apl3</i> ⁺
K3	TTGGACGAGTCGGAATCGCAG	Comprobación de las deleciones de los genes <i>clc1</i> ⁺ y <i>apl3</i> ⁺

Tabla IV. Anticuerpos empleados en este trabajo		
Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
anti-HA monoclonal, 12C5A	1:4000	Roche
anti-GFP monoclonal, JL8	1:1000	BD Living Colors
anti-Cdc2 p34, Y100.4	1:4000	Santa Cruz Biotechnology
anti-actina	1:1000	ICN Biomedicals
anti- α -tubulina, clon B-5-1-2	1:10000	SIGMA
anti-CPY, 10A5	1:500	Molecular Probes, Invitrogen
Suero anti-GFP (conejo), A6455	1:120	Invitrogen
anti-ratón	1:10000	BioRad
anti-conejo	1:10000	BioRad



BIBLIOGRAFÍA



- Aghamohammadzadeh, S., & Ayscough, K. R. (2009). Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat Cell Biol*, 11(8), 1039–1042.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., & Warbrick, E. (1993). *Experiment with a fission yeast: a laboratory course manual*. CSHL Press.
- Alonso-Nunez, M. L., An, H., Martin-Cuadrado, A. B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., de Aldana, C. R. (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, 16(4), 2003–2017.
- Amoah-Buahin, E., Bone, N., & Armstrong, J. (2005). Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, 4(7), 1287–97.
- Andreishcheva, E. N., Kunkel, J. P., Gemmill, T. R., & Trimble, R. B. (2004). Five genes involved in biosynthesis of the pyruvylated Galbeta1,3-epitope in *Schizosaccharomyces pombe* N-linked glycans. *J Biol Chem*, 279(34), 35644–55.
- Anitei, M., & Hoflack, B. (2012). Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat Cell Biol*, 14(1), 11–19.
- Antonescu, C. N., Aguet, F., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2011). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell*, 22(14), 2588–600.
- Arai, R., & Mabuchi, I. (2002). F-actin ring formation and the role of F-actin cables in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, 115(5), 887–98.
- Arasada, R., & Pollard, T. D. (2011). Distinct roles for F-BAR proteins Cdc15p and Bzz1p in actin polymerization at sites of endocytosis in fission yeast. *Curr Biol*, 21(17), 1450–9.
- Arellano, M., Durán, A., & Pérez, P. (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3) β -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J*, 15, 4584–4591.
- Arellano, M., Durán, A., & Pérez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 110, 2547–2555.
- Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie 3rd, A., Steever, A. B., Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 14(10), 943–951.
- Balasubramanian, M. K., Bi, E., & Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol*, 14(18), R806–18.
- Balasubramanian, M. K., Hirani, B. R., Burke, J. D., Gould, K. L. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* *cdc3+* gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol*, 125(6), 1289–1301.
- Balderhaar, H. J. K., Arlt, H., Ostrowicz, C., Bröcker, C., Sündermann, F., Brandt, R., Ungermann, C. (2010). The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *J Cell Sci*, 123(Pt 23), 4085–94.
- Bandmann, V., Kreft, M., & Homann, U. (2011). Modes of exocytotic and endocytotic events in tobacco BY-2 protoplasts. *Mol Plant*, 4(2), 241–51.
- Bazinet, C., Katzen, A. L., Morgan, M., Mahowald, A. P., & Lemmon, S. K. (1993). The *Drosophila* clathrin heavy chain gene: clathrin function is essential in a multicellular organism. *Genetics*, 134(4), 1119–1134.
- Beck, R., Prinz, S., Diestelkötter-Bachert, P., Röhling, S., Adolf, F., Hoehner, K., Wieland, F. (2011). Coatamer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *J Cell Biol*, 194(5), 765–77.
- Bendezu, F. O., & Martin, S. G. (2011). Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol Biol Cell*, 22(1), 44–53.
- Berdnik, D., Török, T., González-Gaitán, M., & Knoblich, J. A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell*, 3(2), 221–31.
- Betz, W. J., Mao, F., & Bewick, G. S. (1992). Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci*, 12(2), 363–75.

-
- Betz, W. J., Mao, F., & Smith, C. B. (1996). Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*, 6(3), 365–71.
- Bezanilla, M., Wilson, J. M., & Pollard, T. D. (2000). Fission yeast myosin-II isoforms assemble into contractile rings at distinct times during mitosis. *Curr Biol*, 10(7), 397–400.
- Black, M. W., & Pelham, H. R. (2000). A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins. *J Cell Biol*, 151(3), 587–600.
- Bobbitt, T. F., Nordin, J. H., Roux, M., Revol, J. F., & Marchessault, R. H. (1977). Distribution and conformation of crystalline nigeran in hyphal walls of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. *J Bacteriol*, 132, 691–703.
- Boehm, M., & Bonifacino, J. S. (2001). Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell*, 12(10), 2907–2920.
- Boehm, M., & Bonifacino, J. S. (2002). Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene*, 286(2), 175–86.
- Boettner, D. R., Chi, R. J., & Lemmon, S. K. (2012). Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, 14(1), 2–10.
- Boettner, D. R., D'Agostino, J. L., Torres, O. T., Daugherty-Clarke, K., Uygur, A., Reider, A., Wendland, B., Lemmon S.K., Goode, B. L. (2009). The F-BAR protein Syp1 negatively regulates WASp-Arp2/3 complex activity during endocytic patch formation. *Curr Biol*, 19(23), 1979–87.
- Boettner, D. R., Friesen, H., Andrews, B., & Lemmon, S. K. (2011). Clathrin light chain directs endocytosis by influencing the binding of the yeast Hip1R homologue, Sla2, to F-actin. *Mol Biol Cell*, 22(19), 3699–714.
- Bonifacino, J. S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nature revs*, 5(1), 23–32.
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153–66.
- Bonifacino, J. S., & Hierro, A. (2011). Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol*, 21(3), 159–67.
- Bonifacino, J. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(5), 409–414.
- Bowers, K., & Stevens, T. H. (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1744(3), 438–54.
- Bröcker, C., Engelbrecht-Vandré, S., & Ungermann, C. (2010). Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr Biol*, 20(21), R943–52.
- Brodsky, F. M. (2012). Diversity of Clathrin Function: New Tricks for an Old Protein. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 309–36.
- Burston, H. E., Maldonado-Báez, L., Davey, M., Montpetit, B., Schluter, C., Wendland, B., & Conibear, E. (2009). Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis. *J Cell Biol*, 185(6), 1097–110.
- Bush, D. A., Horisberger, M., Horman, I., & Wursch, P. (1974). The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol*, 81, 199–206.
- Cabib, E., Drgonova, J., & Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 67, 307–333.
- Cai, H., Reinisch, K., & Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 12(5), 671–682.
- Calabia-Linares, C, Robles-Valero, J., de la Fuente, H., Perez-Martinez, M., Martin-Cofreces, N., Alfonso-Perez, M., Mittelbrunn, M., Ibiza, S., Urbano-Olmos, F. R., Aguado-Ballano, C., Sanchez-Sorzano, C. O., Sanchez-Madrid, F., Veiga, E. (2012). Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *J Cell Sci*, 124(5), 820–830.
- Cao, H., Orth, J. D., Chen, J., Weller, S. G., Heuser, J. E., & McNiven, M. A. (2003). Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*, 23, 2162–2170.

- Cao, H., Weller, S., Orth, J. D., Chen, J., Huang, B., Chen, J.-L., McNiven, M. A. (2005). Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamain complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat Cell Biol*, 7(5), 483–92.
- Cardelli, J. (2001). Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic*, 2(5), 311–20.
- Carnahan, R. H., & Gould, K. L. (2003). The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol*, 162(5), 851–62.
- Carroll, S. Y., Stirling, P. C., Stimpson, H. E. M., Giesselmann, E., Schmitt, M. J., & Drubin, D. G. (2009). A yeast killer toxin screen provides insights into a/b toxin entry, trafficking, and killing mechanisms. *Dev Cell*, 17(4), 552–60.
- Castagnetti, S., Behrens, R., & Nurse, P. (2005). End4/Sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, 118(9), 1843–1850.
- Chang, F. (2000). Microtubule and actin-dependent movement of the formin cdc12p in fission yeast. *Microsc Res Tech*, 49(2), 161–167.
- Chang, F., Drubin, D., & Nurse, P. (1997). cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol*, 137(1), 169–182.
- Chappell, T. G., Hajibagheri, M. A., Ayscough, K., Pierce, M., & Warren, G. (1994). Localization of an a 1,2 galactosyltransferase activity to the Golgi apparatus of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, 5, 519–528.
- Chappell, T. G., & Warren, G. (1989). A galactosyltransferase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol*, 109, 2693–2702.
- Chen, C.-Y., & Brodsky, F. M. (2005). Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *J Biol Chem*, 280(7), 6109–17.
- Cho, S. K., & Hofmann, S. L. (2004). *pdf1*, a palmitoyl protein thioesterase 1 Ortholog in *Schizosaccharomyces pombe*: a yeast model of infantile Batten disease. *Eukaryot Cell*, 3(2), 302–10.
- Chu, D. S., Pishvaei, B., & Payne, G. S. (1996). The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271(51), 33123–33130.
- Chu, D. S., Pishvaei, B., & Payne, G. S. (1999). A modulatory role for clathrin light chain phosphorylation in Golgi membrane protein localization during vegetative growth and during the mating response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 10(3), 713–726.
- Codlin, S., & Mole, S. E. (2009). *S. pombe btn1*, the orthologue of the Batten disease gene *CLN3*, is required for vacuole protein sorting of Cpy1p and Golgi exit of Vps10p. *J Cell Sci*, 122(8), 1163–73.
- Coffman, V. C., Sees J. A., Kovar D. R. & Wu J. Q. (2013). The formins Cdc12 and For3p cooperate during contractile ring assembly in cytokinesis. *J Cell Biol*. 203(1), 101-114.
- Collins, B. M. (2008). The structure and function of the retromer protein complex. *Traffic*, 9(11), 1811–22.
- Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*, 109(4), 523–35.
- Conibear, E., & Stevens, T. H. (2002). Studying yeast vacuoles. *Methods enzymol*, 351, 408–32.
- Copic, A., Starr, T. L., & Schekman, R. (2007). Ent3p and Ent5p exhibit cargo-specific functions in trafficking proteins between the trans-Golgi network and the endosomes in yeast. *Mol Biol Cell*, 18(5), 1803–15.
- Cortes, J. C., Ishiguro, J., Durán, A., & Ribas, J. C. (2002). Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci*, 115(21), 4081–4096.

-
- Cortes, J. C. (2006). *Estudio de Bgs1p y Bgs4p: dos proteínas esenciales implicadas en la biosíntesis del β(1,3)-D-glucano se Schizosaccharomyces pombe*. Doctoral Thesis (Vol. 1, p. 166). Salamanca, Spain.: Universidad de Salamanca, Spain.
- Cortes, J. C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sanchez, Y., Duran, A., & Ribas, J. C. (2005). The novel fission yeast (1,3)β-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci*, *118*(1), 157–174.
- Cortes, J. C., Sato, M., Muñoz, J., Moreno, M. B., Clemente-Ramos, J. A., Ramos, M., Ribas, J. C. (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol*, *198*(4), 637–56.
- Cortes, J. C., Konomi, M., Martins, I. M., Muñoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., Duran, A., Ribas, J. C. (2007). The (1,3)β-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol*, *65*(1), 201–217.
- Cossart, P., & Veiga, E. (2008). Non-classical use of clathrin during bacterial infections. *J Microsc*, *231*(3), 524–8.
- Cullen, P. J., & Korswagen, H. C. (2012). Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol*, *14*(1), 29–37.
- Daboussi, L., Costaguta, G., & Payne, G. S. (2012). Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol*, *14*(3), 239–48.
- Daga, R., & Chang, F. (2005). Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proc Natl Acad Sci USA*, *102*(23), 8228–8232.
- Daga, R., & Nurse, P. (2008). Interphase microtubule bundles use global cell shape to guide spindle alignment in fission yeast. *J Cell Sci*, *121*(12), 1973–80.
- De Medina-Redondo, M., Arnaiz-Pita, Y., Fontaine, T., Del Rey, F., Latge, J. P., & Vazquez de Aldana, C. R. (2008). The β-1,3-glucanotransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol*, *68*(5), 1283–1299.
- De Medina-Redondo, M., Arnáiz-Pita, Y., Clavaud, C., Fontaine, T., del Rey, F., Latgé, J. P., & Vázquez de Aldana, C. R. (2010). β(1,3)-glucanotransferase activity is essential for cell wall integrity and viability of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS one*, *5*(11), e14046.
- Dekker, N., Speijer, D., Grun, C. H., van den Berg, M., de Haan, A., & Hochstenbach, F. (2004). Role of the α-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell*, *15*(8), 3903–3914.
- Dekker, N., van Rijssel, J., Distel, B., & Hochstenbach, F. (2007). Role of the α-glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast*, *24*(4), 279–288.
- Dell'Angelica, E C, Klumperman, J., Stoorvogel, W., & Bonifacino, J. S. (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science*, *280*(5362), 431–4.
- Dell'Angelica, E C, Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A., & Bonifacino, J. S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the β3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell*, *3*(1), 11–21.
- Dell'Angelica, E. C. (2009). AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(4), 552–9.
- DeLuca-Flaherty, C., McKay, D. B., Parham, P., & Hill, B. L. (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell*, *62*(5), 875–87.
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, *78*, 857–902.
- Douglas, C. M. (2001). Fungal β(1,3)-D-Glucan synthesis. *Med Mycol.*, *39*(SI), 55–66.
- Drummond, D. R., & Cross, R. A. (2000). Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol*, *10*(13), 766–75.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B., & Schekman, R. (1994). Yeast β- and β'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J Biol Chem*, *269*(39), 24486–95.

- Duncan, M. C., Costaguta, G., & Payne, G. S. (2003). Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif. *Nat Cell Biol*, 5(1), 77–81.
- Durán, A., & Pérez, P. (2004). Cell wall synthesis. In R. Egel (Ed.), *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe* (269–280). Heidelberg: Springer.
- Dwyer, N. D., Adler, C. E., Crump, J. G., L'Etoile, N. D., & Bargmann, C. I. (2001). Polarized dendritic transport and the AP-1 mu1 clathrin adaptor UNC-101 localize odorant receptors to olfactory cilia. *Neuron*, 31(2), 277–87.
- Edamatsu, M., & Toyoshima, Y. (2003). Fission yeast synaptobrevin is involved in cytokinesis and cell elongation. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(3), 641–645.
- Edeling, M. A., Mishra, S. K., Keyel, P. A., Steinhauser, A. L., Collins, B. M., Roth, R., Heuser, J. E., Owen, D. J., Traub, L. M. (2006). Molecular switches involving the AP-2 beta2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly. *Dev Cell*, 10(3), 329–42.
- Encinar del Dedo, J., Duenas, E., Arnaiz, Y., del Rey, F., & Vazquez de Aldana, C. R. (2009). {beta}-glucanase Eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, 8(8), 1278–1286.
- Encinar del Dedo, J. (2010). Caracterización de la $\beta(1,3)$ -endoglucanasa eng2 en *Schizosaccharomyces pombe*. Deshiscencia y crecimiento polarizado. *Doctoral Thesis*. Salamanca. Spain.: Universidad de Salamanca
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., & Duden, R. (2004). The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell*, 15(3), 1011–23.
- Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Endocytosis and vesicle trafficking. *Current Opin Struct Biol*, 12(6), 814–821.
- Faini, M., Beck, R., Wieland, F. T., & Briggs, J. A. G. (2013). Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol*, 23(6), 279–88.
- Fang, Y., Hu, L., Zhou, X., Jaiseng, W., Zhang, B., Takami, T., & Kuno, T. (2012). A genomewide screen in *Schizosaccharomyces pombe* for genes affecting the sensitivity of antifungal drugs that target ergosterol biosynthesis. *Antimicrob Agents Ch*, 56(4), 1949–59.
- Feierbach, B., & Chang, F. (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol*, 11(21), 1656–1665.
- Ferreira, F., Foley, M., Cooke, A., Cunningham, M., Smith, G., Woolley, R., Smythe, E. (2012). Endocytosis of G protein-coupled receptors is regulated by clathrin light chain phosphorylation. *Curr Biol*, 22(15), 1361–70.
- Fischer, R., Zekert, N., & Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol*, 68(4), 813–826.
- Foote, C., & Nothwehr, S. F. (2006). The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast. *J Cell Biol*, 173(4), 615–26.
- Forsburg, S. L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucl Acids Res*, 21(12), 2955–2956.
- Forsburg, S. L. (2001). The art and desing of genetic screen: yeast. *Nature Rev Genet* 2, 659–668
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., & Walz, T. (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*, 432(7017), 573–9.
- Foury, F., & Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol*, 6(1), 106–11.
- Gabriely, G., Kama, R., & Gerst, J. E. (2007). Involvement of specific COPI subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Mol Cell Biol*, 27(2), 526–40.
- Gachet, Y., Codlin, S., Hyams, J. S., & Mole, S. E. (2005). *btn1*, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the human Batten disease gene *CLN3*, regulates vacuole homeostasis. *J Cell Sci*, 118(23), 5525–5536.

-
- Gachet, Y., & Hyams, J. S. (2005). Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci*, 118(Pt 18), 4231–4242.
- Gaidarov, I., Chen, Q., Falck, J. R., Reddy, K. K., & Keen, J. H. (1996). A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 271(34), 20922–9.
- Gaidarov, I., & Keen, J. H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, 146(4), 755–64.
- Gallusser, A., & Kirchhausen, T. (1993). The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J*, 12(13), 5237–44.
- Gandhi, M., Achard, V., Blanchoin, L., & Goode, B. L. (2009). Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol Cell*, 34(3), 364–74.
- Gao, L., & Bretscher, A. (2008). Analysis of unregulated formin activity reveals how yeast can balance F-actin assembly between different microfilament-based organizations. *Mol Biol Cell*, 19(4), 1474–1484.
- Garcia, I., Jimenez, D., Martin, V., Duran, A., & Sanchez, Y. (2005). The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell*, 97(7), 569–576.
- Garcia, I., Tajadura, V., Martin, V., Toda, T., & Sanchez, Y. (2006). Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol*, 59(3), 836–853.
- García-Rodríguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Durán, A., & Roncero, C. (2000). Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 478, 84–88.
- Gautier, J. J., Lomakina, M. E., Bouslama-Oueghlani, L., Derivery, E., Beilinson, H., Faigle, W., Loew, D., Louvard, D., Echard, A., Alexandrova, A. Y., Gautreau, A. (2011). Clathrin is required for Scar/Wave-mediated lamellipodium formation. *J Cell Sci*, 124(20), 3414–3427.
- Gaynor, E. C., Chen, C. Y., Emr, S. D., & Graham, T. R. (1998). ARF is required for maintenance of yeast Golgi and endosome structure and function. *Mol Biol Cell*, 9(3), 653–70.
- Gibert, M., Monier, M.-N., Ruez, R., Hale, M. L., Stiles, B. G., Benmerah, A., Johannes, L., Lamaze, C., Popoff, M. R. (2011). Endocytosis and toxicity of clostridial binary toxins depend on a clathrin-independent pathway regulated by Rho-GDI. *Cell Microbiol*, 13(1), 154–70.
- Girao, H., Geli, M. I., & Idrissi, F. Z. (2008). Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS Lett*, 582(14), 2112–2119.
- Glebov, O. O., Bright, N. A., & Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 8(1), 46–54.
- Glodowski, D. R., Chen, C. C.-H., Schaefer, H., Grant, B. D., & Rongo, C. (2007). RAB-10 regulates glutamate receptor recycling in a cholesterol-dependent endocytosis pathway. *Mol Biol Cell*, 18(11), 4387–96.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. S., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546, 563–7.
- Goh, L. K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S., & Sorkin, A. (2010). Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*, 189(5), 871–83.
- González-Gaitán, M., & Jäckle, H. (1997). Role of *Drosophila* alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell*, 88(6), 767–76.
- Grant, B. D., & Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Revs Mol Cell Biol*, 10(9), 597–608.
- Grant, B., & Hirsh, D. (1999). Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Moll Biol Cell*, 10(12), 4311–26.

- Grün, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. (2005). The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiol*, 15(3), 245–57.
- Gu, M., Liu, Q., Watanabe, S., Sun, L., Hollopetter, G., Grant, B. D., & Jorgensen, E. M. (2013). AP2 hemicomplexes contribute independently to synaptic vesicle endocytosis. *eLife*, 2, e00190.
- Guertin, D. A., Trautmann, S., & McCollum, D. (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(2), 155–178.
- Gurunathan, S., David, D., & Gerst, J. E. (2002). Dynamin and clathrin are required for the biogenesis of a distinct class of secretory vesicles in yeast. *EMBO J*, 21(4), 602–614.
- Ha, S. A., Torabinejad, J., DeWald, D. B., Wenk, M. R., Lucast, L., De Camilli, P., Nothwehr, S. F. (2003). The synaptojanin-like protein Inp53/Sjl3 functions with clathrin in a yeast TGN-to-endosome pathway distinct from the GGA protein-dependent pathway. *Mol Biol Cell*, 14(4), 1319–33.
- Hachet, O., & Simanis, V. (2008). Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev*, 22(22), 3205–3216.
- Hachet, O., Bendezú, F. O., Martin, S. G., (2012). Fission yeast: in shape to divide. *Curr Opin Cell Biol*, 24(6), 858–864.
- Hagan, I. M., & Hyams, J. S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, 89(3), 343–357.
- Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci*, 122(11), 1713–1721.
- Harlow, D., E. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. CSHL Press.
- Harsay, E., & Bretscher, A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol*, 131(2), 297–310.
- Hartwell, L. H. (2001). Yeast and cancer. *Biosci reports*, 24(4-5), 523–544.
- Hayles, J., & Nurse, P. (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(9), 647–656.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., & Hedges, S. B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 293(5532), 1129–1133.
- Hedges, S. B. (2002). The origin and evolution of model organisms. *Nature Revs Genet*, 3(11), 838–49.
- Henne, William M, Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 21(1), 77–91.
- Henne, W. M, Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2010). FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 328(5983), 1281–4.
- Henry, K. R., D'Hondt, K., Chang, J., Newpher, T., Huang, K., Hudson, R. T., Lemmon, S. K. (2002). Scd5p and clathrin function are important for cortical actin organization, endocytosis, and localization of sla2p in yeast. *Mol Biol Cell*, 13(8), 2607–2625.
- Hirst, J., & Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta*, 1404(1-2), 173–193.
- Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N. J., Dacks, J. B., Robinson, M. S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol*, 9(10), e1001170.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J., & Klausner, R. D. (1998). Identification of a putative a-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 9161–9166.
- Horisberger, M., & Rouvet-Vauthey, M. (1985). Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia*, 41, 748–750.
- Horisberger, M., Vonlanthen, M., & Rosset, J. (1978). Localization of a-galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol*, 119(2), 107–11.

-
- Howes, M. T., Mayor, S., Parton, R. G., & Novick, S. P. and P. (2010). Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 22(4), 519–27.
- Hsu, V. W., & Yang, J.-S. S. (2009). Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett*, 583(23), 3758–3763.
- Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W., & Sorkin, A. (2004). Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem*, 279(16), 16657–61.
- Huang, K. M., D’Hondt, K., Riezman, H., & Lemmon, S. K. (1999). Clathrin functions in the absence of heterotetrameric adaptors and AP180-related proteins in yeast. *EMBO J*, 18(14), 3897–908.
- Huang, K. M., Gullberg, L., Nelson, K. K., Stefan, C. J., Blumer, K., & Lemmon, S. K. (1997). Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *J Cell Sci*, 110(7) 899–910.
- Huang, Y., Yan, H., & Balasubramanian, M. K. (2008). Assembly of normal actomyosin rings in the absence of Mid1p and cortical nodes in fission yeast. *J Cell Biol*, 183(6), 979–988.
- Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S. A., & Osumi, M. (2001). In situ localization of β -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 18, 433–444.
- Ishiguro, J. (1998). Genetic control of fission yeast cell wall synthesis: the genes involved in wall biogenesis and their interactions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Genet Syst*, 73, 181–191.
- Ishiguro, J., Saitou, A., Durán, A., & Ribas, J. C. (1997). *cps1+*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to Cyclosporin A and Papulacandin B. *J Bacteriol*, 179, 7653–7662.
- Iwaki, T., Hosomi, A., Tokudomi, S., Kusunoki, Y., Fujita, Y., Giga-Hama, Y., Takegawa, K. (2006). Vacuolar protein sorting receptor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*, 152(Pt 5), 1523–1532.
- Iwaki, T., Tanaka, N., Takagi, H., Giga-Hama, Y., & Takegawa, K. (2004). Characterization of *end4+*, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 21(10), 867–881.
- Jackson, A. P., Seow, H. F., Holmes, N., Drickamer, K., & Parham, P. (1987). Clathrin light chains contain brain-specific insertion sequences and a region of homology with intermediate filaments. *Nature*, 326(6109), 154–9.
- Jackson, L. P., Kelly, B. T., McCoy, A. J., Gaffry, T., James, L. C., Collins, B. M., Honing, S., Evans, P. R., Owen, D. J. (2010). A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell*, 141(7), 1220–9.
- Jensen, D., & Schekman, R. (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J Cell Sci*, 124(Pt 1), 1–4.
- Jonsdottir, G. A., & Li, R. (2004). Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Curr Biol*, 14(17), 1604–1609.
- Kaether, C., Scheuermann, J., Fassler, M., Zilow, S., Shirotani, K., Valkova, C., Haass, C. (2007). Endoplasmic reticulum retention of the gamma-secretase complex component Pen2 by Rer1. *EMBO reports*, 8(8), 743–8.
- Kaksonen, M., Sun, Y., & Drubin, D. G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*, 115(4), 475–87.
- Kaksonen, M., Toret, C. P., & Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, 123(2), 305–320.
- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M., & Mabuchi, I. (2005). Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol*, 7(9), 916–7.
- Kamasaki, T., Osumi, M., & Mabuchi, I. (2007). Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol*, 178(5), 765–71.

- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P., & Toda, T. (1999). Fission yeast α -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J Cell Biol*, 144, 1173–1186.
- Keeney, J. B., & Boeke, J. D. (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 136, 849–856.
- Kerr, M. C., & Teasdale, R. D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic*, 10(4), 364–71.
- Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, Jeffery L, Baek ST, Lee H, Shim YS, Lee M, Kim L, Heo KS, Noh EJ, Lee AR, Jang YJ, Chung KS, Choi SJ, Park JY, Park Y, Kim HM, Park SK, Park HJ, Kang EJ, Kim HB, Kang HS, Park HM, Kim K, Song K, Song KB, Nurse P, Hoe KL (2010). Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*, 28(6), 617–623.
- Kim, I., Pan, W., Jones, S. A., Zhang, Y., Zhuang, X., & Wu, D. (2013). Clathrin and AP2 are required for PtdIns(4,5)P2-mediated formation of LRP6 signalosomes. *J Cell Biol*, 200(4), 419–28.
- Kirchhausen, T., & Harrison, S. C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell*, 23(3), 755–61.
- Kirchhausen, T., Harrison, S. C., & Heuser, J. (1986). Configuration of clathrin trimers: evidence from electron microscopy. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 94(3), 199–208.
- Kirchhausen, T., Harrison, S. C., Parham, P., & Brodsky, F. M. (1983). Location and distribution of the light chains in clathrin trimers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(9), 2481–5.
- Kirchhausen, T., Scarmato, P., Harrison, S. C., Monroe, J. J., Chow, E. P., Mattaliano, R. J., Brosius, J. (1987). Clathrin light chains LCA and LCB are similar, polymorphic, and share repeated heptad motifs. *Science*, 236(4799), 320–4.
- Kita, A, Sugiura, R., Shoji, H., He, Y., Deng, L., Lu, Y., Kuno, T. (2004). Loss of Apm1, the micro1 subunit of the clathrin-associated adaptor-protein-1 complex, causes distinct phenotypes and synthetic lethality with calcineurin deletion in fission yeast. *Mol Biol Cell*, 15(6), 2920–2931.
- Kita, Ayako, Li, C., Yu, Y., Umeda, N., Doi, A., Yasuda, M., Sugiura, R. (2011). Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome trafficking through functional interaction with adaptin in Fission Yeast. *PloS one*, 6(2), e16842.
- Koga, T., Onishi, M., Nakamura, Y., Hirata, A., Nakamura, T., Shimoda, C., Fukui, Y. (2004). Sorting nexin homologues are targets of phosphatidylinositol 3-phosphate in sporulation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells*, 9(6), 561–574.
- Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T., & Osumi, M. (2003). Characterization and behaviour of alpha-glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast*, 20(5), 427–438.
- Kovar, D. R., Harris, E. S., Mahaffy, R., Higgs, H. N., & Pollard, T. D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*, 124(2), 423–35.
- Kovar, D. R., Kuhn, J. R., Tichy, A. L., & Pollard, T. D. (2003). The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol*, 161(5), 875–87.
- Kovar, D. R., Sirotkin, V., & Lord, M. (2012). Three 's company : The fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 21(3), 177–187.
- Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M. R., De Camilli, P., Takei, K., & Haucke, V. (2003). ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol*, 162(1), 113–124.
- Kreger, D. R. (1954). Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X-Ray diffraction and solubility tests. *Biochim Biophys Acta*, 13, 1–9.

-
- Kumari, S., Mg, S., & Mayor, S. (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res*, 20(3), 256–75.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D., & Zakour, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, 154, 367–382.
- La Carbona, S., Le Goff, C., & Le Goff, X. (2006). Fission yeast cytoskeletons and cell polarity factors: connecting at the cortex. *Biol Cell*, 98(11), 619–631.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680–685.
- Lafer, E. M. (2002). Clathrin-protein interactions. *Traffic*, 3(8), 513–520.
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., & Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell*, 124(5), 997–1009.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., & Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*, 7(3), 661–71.
- Lee, M. C. S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R. (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*, 122(4), 605–17.
- Lefkir, Y., de Chasse, B., Dubois, A., Bogdanovic, A., Brady, R. J., Destaing, O., Letourneur, F. (2003). The AP-1 clathrin-adaptor is required for lysosomal enzymes sorting and biogenesis of the contractile vacuole complex in *Dictyostelium* cells. *Mol Biol Cell*, 14(5), 1835–51.
- Lemmon, S. K., & Jones, E. W. (1987). Clathrin requirement for normal growth of yeast. *Science*, 238(4826), 504–509.
- Leto, D., & Saltiel, A. R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature revs*, 13(6), 383–96.
- Lewis, M. J., & Pelham, H. R. (1992). Sequence of a second human KDEL receptor. *J Mol Biol*, 226(4), 913–6.
- Liu, J, Tang, X., Wang, H., & Balasubramanian, M. (2000). Bgs2p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett*, 478(1-2), 105–108.
- Liu, J, Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S., & Balasubramanian, M. K. (2002). The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, 13(3), 989–1000.
- Liu, Jian, Sun, Y., Drubin, D. G., & Oster, G. F. (2009). The mechanochemistry of endocytosis. *PLoS Biol*, 7(9), e1000204.
- Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S. F., & Graham, T. R. (2008). P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Mol Biol Cell*, 19(8), 3526–35.
- Liu, S. H., Wong, M. L., Craik, C. S., & Brodsky, F. M. (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell*, 83(2), 257–67.
- Liu, T.-T., Gomez, T. S., Sackey, B. K., Billadeau, D. D., & Burd, C. G. (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell*, 23(13), 2505–15.
- Ma, Y., Takeuchi, M., Sugiura, R., Sio, S. O., & Kuno, T. (2009). Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. *Genes Cells*, 14(8), 1015–1028.
- Maeda, Y., Kashiwazaki, J., Shimoda, C., & Nakamura, T. (2009). The *Schizosaccharomyces pombe* syntaxin 1 homolog, Psy1, is essential in the development of the forespore membrane. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(2), 339–345.
- Magnelli, P. E., Cipollo, J. F., & Robbins, P. W. (2005). A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Analyt Biochem*, 336(2), 202–12.

- Maldonado-Báez, L., Dores, M. R., Perkins, E. M., Drivas, T. G., Hicke, L., & Wendland, B. (2008). Interaction between Epsin/Yap180 adaptors and the scaffolds Ede1/Pan1 is required for endocytosis. *Mol Biol Cell*, 19(7), 2936–48.
- Manners, D. J., & Meyer, M. T. (1977). The molecular structure of some glucans from the cell wall of *S. pombe*. *Carbohydr Res*, 57, 189–203.
- Marks, J., Hagan, I. M., & Hyams, J. S. (1986). Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl*, 5, 229–241.
- Marks, J., & Hyams, J. S. (1985). Localisation of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol*, 39, 27–32.
- Martin, S G, & Chang, F. (2005). New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle*, 4(8), 1046–1049.
- Martin, S G, & Chang, F. (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol*, 16(12), 1161–70.
- Martin, S G, McDonald, W. H., Yates, J. R., Chang, F., & Yates 3rd, J. R. (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell*, 8(4), 479–491.
- Martin, S G, Rincón, S. A., Basu, R., Pérez, P., & Chang, F. (2007). Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell*, 18(10), 4155–67.
- Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A., & Sánchez, Y. (2003). Bgs3p, a putative 1, 3-b-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, 2, 159–169.
- Martín, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Durán, A., & Sánchez, Y. (2000). *bgs2+*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol*, 38, 308–321.
- Martin-Cuadrado, A. B., Duenas, E., Sipiczki, M., Vazquez de Aldana, C. R., & del Rey, F. (2003). The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, 116(9), 1689–1698.
- Martín-Cuadrado, A. B., Encinar del Dedo, J., de Medina-Redondo, M., Fontaine, T., del Rey, F., Latgé, J. P., & Vázquez de Aldana, C. R. (2008). The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3-beta-glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol Microbiol*, 69(1), 188–200.
- Martin-Cuadrado, A. B., Morrell, J. L., Konomi, M., An, H., Petit, C., Osumi, M., de Aldana, C. R. (2005). Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell*, 16(10), 4867–4881.
- Martín-García, R., de León, N., Sharifmoghadam, M. R., Curto, M.-Á., Hoya, M., Bustos-Sanmamed, P., Valdivieso, M.H. (2011). The FN3 and BRCT motifs in the exomer component Chs5p define a conserved module that is necessary and sufficient for its function. *Cell Mol Life Sci*, 68(17), 2907–17.
- Matsuoka, K., Schekman, R., Orci, L., & Heuser, J. E. (2001). Surface structure of the COPII-coated vesicle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(24), 13705–9.
- Maundrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, 123, 127–130.
- Maurer, M. E., & Cooper, J. A. (2006). The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci*, 119 (20), 4235–46.
- Mazur Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., & Foor, F., (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol*, 15(10), 5671–5681.
- McGough, I. J., & Cullen, P. J. (2011). Recent advances in retromer biology. *Traffic*, 12(8), 963–71.
- McLeod, M., Stein, M., & Beach, D. (1987). The product of the *mei3+* gene, expressed under control of the mating- type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *EMBO J*, 6, 729–736.

-
- Mitchison, J. M. (1957). The growth of single cells: I. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res*, 13(2), 244–62.
- Mitchison, J. M. (1990). The fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *BioEssays* 12(4), 189–91.
- Mitchison, J. M., & Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, 75, 357–376.
- Mitsunari, T., Nakatsu, F., Shioda, N., Love, P. E., Grinberg, A., Bonifacino, J. S., & Ohno, H. (2005). Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol*, 25(21), 9318–23.
- Miyata, M., & Miyata, H. (1978). Relationship between extracellular enzymes and cell growth during the cell cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: acid phosphatase. *J Bacteriol*, 136(2), 558–564.
- Moreno, S., Klar, A., & Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, 194, 795–823.
- Moseley, J. B., & Goode, B. L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(3), 605–45.
- Motegi, F., Arai, R., & Mabuchi, I. (2001). Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell*, 12(5), 1367–1380.
- Motegi, F., Mishra, M., Balasubramanian, M. K., & Mabuchi, I. (2004). Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by Mid1 in fission yeast. *J Cell Biol*, 165(5), 685–695.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. J., & Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol*, 162(5), 909–18.
- Mullins, C., & Bonifacino, J. S. (2001). Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin. *Mol Cell Biol*, 21(23), 7981–94.
- Mulvihill, D. P., Edwards, S. R., & Hyams, J. S. (2006). A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskelet*, 63(3), 149–161.
- Munn, A. L. (2001). Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1535(3), 236–257.
- Munn, A. L., Silveira, L., Elgort, M., & Payne, G. S. (1991). Viability of clathrin heavy-chain-deficient *Saccharomyces cerevisiae* is compromised by mutations at numerous loci: implications for the suppression hypothesis. *Mol Cell Biol*, 11(8), 3868–3878.
- Nakamura, T., Kashiwazaki, J., & Shimoda, C. (2005). A fission yeast SNAP-25 homologue, SpSec9, is essential for cytokinesis and sporulation. *Cell Struct Funct*, 30(2), 15–24.
- Nakamura, T., Nakamura-Kubo, M., Hirata, A., & Shimoda, C. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe spo3+* gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psy1(+)*-encoding syntaxin-like protein. *Mol Biol Cell*, 12(12), 3955–3972.
- Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh, E. A., Matsui, Y., & Mabuchi, I. (2002). The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J Cell Sci*, 115(23), 4629–4639.
- Nakayama, K. & Wakatsuki, S. (2003) The structure and function of GGAs, the traffic controllers at the TGN sorting crossroads. *Cell Struct Funct* 28(5), 431–442
- Neiman, A. M. (1998). Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *J Cell Biol*, 140(1), 29–37.
- Newpher, T. M., Idrissi, F. Z., Geli, M. I., & Lemmon, S. K. (2006). Novel function of clathrin light chain in promoting endocytic vesicle formation. *Mol Biol Cell*, 17(10), 4343–4352.
- Newpher, T. M., & Lemmon, S. K. (2006). Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic*, 7(5), 574–588.

- Niemes, S., Langhans, M., Viotti, C., Scheuring, D., San Wan Yan, M., Jiang, L., Pimpl, P. (2010). Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. *Plant J*, 61(1), 107–21.
- Niswonger, M. L., & O'Halloran, T. J. (1997). A novel role for clathrin in cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(16), 8575–8578.
- Nolen, B. J., & Pollard, T. D. (2008). Structure and biochemical properties of fission yeast Arp2/3 complex lacking the Arp2 subunit. *J Biol Chem*, 283(39), 26490–26498.
- Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A., & Oppenheim, A. (2002). Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol*, 76(10), 5156–66.
- O'Connor-Giles, K. M., & Skeath, J. B. (2003). Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*. *Dev Cell*, 5(2), 231–43.
- O'Donnell, A. F., Apffel, A., Gardner, R. G., & Cyert, M. S. (2010). Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol Biol Cell*, 21(20), 3552–66.
- O'Halloran, T. J., & Anderson, R. G. (1992). Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in *Dictyostelium*. *J Cell Biol*, 118(6), 1371–1377.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, 269(5232), 1872–5.
- Okada, K., Ravi, H., Smith, E. M., & Goode, B. L. (2006). Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol Biol Cell*, 17(7), 2855–2868.
- Okamoto, M., Kurokawa, K., Matsuura-Tokita, K., Saito, C., Hirata, R., & Nakano, A. (2012). High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 125(14), 3412–20.
- Okreglak, V., & Drubin, D. G. (2010). Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J Cell Biol*, 188(6), 769–77.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., & Rothstein, R. J. (1983). Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods Enzymol*, 101, 228–245.
- Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, 29(2), 207–233.
- Osumi, M., Sato, M., Ishijima, S. A., Konomi, M., Takagi, T., & Yaguchi, H. (1998) Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet Biol*, 24(1-2), 178-206.
- Owen, D. J., & Evans, P. R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*, 282(5392), 1327–32.
- Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K., & Robinson, L. C. (1997). Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J*, 16(14), 4194–204.
- Paoletti, A., & Chang, F. (2000). Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell*, 11(8), 2757–2773.
- Pardo, M., & Nurse, P. (2003). Equatorial retention of the contractile actin ring by microtubules during cytokinesis. *Science*, 300(5625), 1569–1574.
- Payne, C. K., Jones, S. A., Chen, C., & Zhuang, X. (2007). Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic*, 8(4), 389–401.
- Payne, G. S., Baker, D., van Tuinen, E., & Schekman, R. (1988). Protein transport to the vacuole and receptor-mediated endocytosis by clathrin heavy chain-deficient yeast. *J Cell Biol*, 106(5), 1453–1461.

-
- Payne, G. S., Hasson, T. B., Hasson, M. S., & Schekman, R. (1987). Genetic and biochemical characterization of clathrin-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 7(11), 3888–3898.
- Payne, G. S., & Schekman, R. (1985). A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science*, 230(4729), 1009–1014.
- Pelham Jr., R. J., Chang, F., & Pelham, R. J. (2001). Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol*, 3(3), 235–244.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., & Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, 3(5), 473–83.
- Perez, P., & Ribas, J. C. (2004). Cell wall analysis. *Methods*, 33(3), 245–251. R
- Perez, P., & Rincon, S. A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J*, 426(3), 243–253.
- Phillips, S. N., Muzaffar, N., Codlin, S., Korey, C. A., Taschner, P. E. M., de Voer, G., Pearce, D. A. (2006). Characterizing pathogenic processes in Batten disease: use of small eukaryotic model systems. *Bioch Biophys Acta*, 1762(10), 906–19.
- Piel, M., & Tran, P. T. (2009). Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr Biol*, 19(17), R823–7.
- Popoff, V., Langer, J. D., Reckmann, I., Hellwig, A., Kahn, R. A., Brügger, B., & Wieland, F. T. (2011). Several ADP-ribosylation factor (Arf) isoforms support COPI vesicle formation. *J Biol Chem*, 286(41), 35634–42.
- Poupon, V., Girard, M., Legendre-Guillemain, V., Thomas, S., Bourbonniere, L., Philie, J., Bright, N. A., McPherson, P. S. (2008). Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(1), 168–73.
- Prosser, D. C., Drivas, T. G., Maldonado-Baez, L., Wendland, B., & Maldonado-Báez, L. (2011). Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J Cell Biol*, 195(4), 657–671.
- Prosser, D. C., & Wendland, B. (2012). Conserved roles for yeast Rho1 and mammalian RhoA GTPases in clathrin-independent endocytosis. *Small GTPases*, 3(4), 229–35.
- Pucadyil, T. J., & Schmid, S. L. (2009). Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science*, 325(5945), 1217–20.
- Pust, S., Barth, H., & Sandvig, K. (2010). *Clostridium botulinum* C2 toxin is internalized by clathrin- and Rho-dependent mechanisms. *Cell Microbiol*, 12(12), 1809–20.
- Ramachandran, R. (2011). Vesicle scission: dynamin. *Sem Cell Dev Biol*, 22, 10–17.
- Reider, A., Barker, S. L., Mishra, S. K., Im, Y. J., Maldonado-Báez, L., Hurley, J. H., Wendland, B. (2009). Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J*, 28(20), 3103–16.
- Reider, A., & Wendland, B. (2011). Endocytic adaptors-social networking at the plasma membrane. *J Cell Sci*, 124 (10), 1613–22.
- Ribas, J. C., Diaz, M., Duran, A., & Perez, P. (1991). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1,3)-D-glucan. *J. Bacteriol.*, 173, 3456–3462.
- Riezman, H. (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell*, 40(4), 1001–1009.
- Risselada, H. J., & Grubmüller, H. (2012). How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Curr Opin Struct Biol*, 22(2), 187–96.
- Roberts, C. J., Raymond, C. K., Yamashiro, C. T., & Stevens, T. H. (1991). Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol*, 194, 644–661.
- Robertson, A. S., Smythe, E., & Ayscough, K. R. (2009). Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 66(13), 2049–65.
- Robinson, D. G., Jiang, L., & Schumacher, K. (2008). The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant physiol*, 147(4), 1482–92.
- Robinson, M S, & Bonifacino, J. S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 13(4), 444–453.

- Robinson, Margaret S. (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol*, 14(4), 167–74.
- Rodal, A. A., Sokolova, O., Robins, D. B., Daugherty, K. M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Griforieff, N., Goode, B. L. (2005). Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1), 26–31.
- Rodriguez-Pena, J. M., Diez-Muniz, S., Nombela, C., & Arroyo, J. (2008). A yeast strain biosensor to detect cell wall-perturbing agents. *J Biotechnol*, 133(3), 311–317.
- Rohde, G., Wenzel, D., & Haucke, V. (2002). A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 158(2), 209–14.
- Rothman, J. E. (1994). Intracellular membrane fusion. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*, 29, 81–96.
- Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*, 101, 202–211.
- Royle, S. J. (2012). The role of clathrin in mitotic spindle organisation. *J Cell Sci*, 125(1), 19–28.
- Royle, S. J. (2011). Mitotic moonlighting functions for membrane trafficking proteins. *Traffic*, 12(7), 791–8.
- Ruscetti, T., Cardelli, J. A., Niswonger, M. L., & O'Halloran, T. J. (1994). Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol*, 126(2), 343–352.
- Rusten, T. E., Vaccari, T., & Stenmark, H. (2012). Shaping development with ESCRTs. *Nat Cell Biol*, 14(1), 38–45.
- Sacristan, C., Manzano-Lopez, J., Reyes, A., Spang, A., Muñoz, M., & Roncero, C. (2013). Oligomerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol Microbiol*. 90(2), 252–266
- Sambrook Russell, D.W., J. (2001). *molecular Cloning: A laboratory manual*. CSHL Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Manniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (2nd. Ed.). CSHL Press
- Sanchatjate, S., & Schekman, R. (2006). Chs5/6 Complex: A Multiprotein Complex That Interacts with and Conveys Chitin Synthase III from the Trans-Golgi Network to the Cell Surface. *Mol Biol Cell*, 17(10), 4157–4166.
- Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T., & van Deurs, B. (2011). Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol*, 23(4), 413–420.
- Sato, K., Sato, M., & Nakano, A. (2003). Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol Biol Cell*, 14(9), 3605–16.
- Sawin, K. E., & Tran, P. T. (2006). Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast*, 23(13), 1001–1014.
- Sawin, K. E. (2004). Microtubule dynamics: faint speckle, hidden dragon. *Curr Biol*, 14(17), R702–4.
- Scarmato, P., & Kirchhausen, T. (1990). Analysis of clathrin light chain-heavy chain interactions using truncated mutants of rat liver light chain LCB3. *J Biol Chem*, 265(7), 3661–8.
- Schlake, T., & Gutz, H. (1993). Mating configurations in *Schizosaccharomyces pombe* strains of different geographical origins. *Curr genet*, 23(2), 108–14.
- Schledzewski, K., Brinkmann, H., & Mendel, R. R. (1999). Phylogenetic analysis of components of the eukaryotic vesicle transport system reveals a common origin of adaptor protein complexes 1, 2, and 3 and the F subcomplex of the coatomer COPI. *J Mol Evol*, 48(6), 770–8.
- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*, 66, 511–48.
- Schmid, S. L., Braell, W. A., Schlossman, D. M., & Rothman, J. E. (1984). A role for clathrin light chains in the recognition of clathrin cages by “uncoating ATPase”. *Nature*, 311(5983), 228–31.
- Schmitt, M. J., & Radler, F. (1990). Blockage of cell wall receptors for yeast killer toxin KT28 with antimannoprotein antibodies. *Antimicrob Agents Ch*, 34(8), 1615–8.
- Schmitt, M., & Radler, F. (1988). Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 170(5), 2192–6.

-
- Schweingruber, M. E., Edenharter, E., Zurlinden, A., & Stockmaier, K. M. (1992). Regulation of pho1-encoded acid phosphatase of *Schizosaccharomyces pombe* by adenine and phosphate. *Curr Genet*, 22(4), 289–292.
- Scott, P. M., Bilodeau, P. S., Zhdankina, O., Winistorfer, S. C., Hauglund, M. J., Allaman, M. M., Piper, R. C. (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol*, 6(3), 252–9.
- Seaman, M. N. J. (2005). Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol*, 15(2), 68–75.
- Segev, N. (2001). Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE* 2001(100).
- Sharifmoghadam, M. R., & Valdivieso, M.-H. (2009). The fission yeast SEL1 domain protein Cfh3p: a novel regulator of the glucan synthase Bgs1p whose function is more relevant under stress conditions. *J Biol Chem*, 284(17), 11070–11079.
- Shim, J., & Lee, J. (2000). Molecular genetic analysis of *apm-2* and *aps-2*, genes encoding the medium and small chains of the AP-2 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*, 10(3), 309–16.
- Silveira, L. A., Wong, D. H., Masiarz, F. R., & Schekman, R. (1990). Yeast clathrin has a distinctive light chain that is important for cell growth. *J Cell Biol*, 111(4), 1437–1449.
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol*, 1(2).
- Sipiczki, M., & Bozsik, A. (2000). The use of morphomutants to investigate septum formation and cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol*, 174(6), 386–392.
- Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L., & Pollard, T. D. (2010). Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Mol Biol Cell*, 21(16), 2894–2904.
- Skau, C. T., & Kovar, D. R. (2010). Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. *Curr Biol*, 20(16), 1415–1422.
- Solinger, J. A., & Spang, A. (2013). Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *FEBS J*, 280(12), 2743–57.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., & Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362(6418), 318–24.
- Sosa, R. T., Weber, M. M., Wen, Y., & O'Halloran, T. J. (2012). A single β adaptin contributes to AP1 and AP2 complexes and clathrin function in *Dictyostelium*. *Traffic*, 13(2), 305–16.
- Spang, A. (2009). On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Curr Opin Cell Biol*, 21(4), 531–6.
- Spasic, D., Raemaekers, T., Dillen, K., Declerck, I., Baert, V., Serneels, L., Annaert, W. (2007). Rer1p competes with APH-1 for binding to nicastrin and regulates gamma-secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J Cell Biol*, 176(5), 629–40.
- Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D., & Kahn, R. A. (1990). ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Sci USA*, 87(3), 1238–42.
- Stefan, C. J., Audhya, A., & Emr, S. D. (2002). The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *Mol Biol Cell*, 13(2), 542–57.
- Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Jones, T., Davis, R. W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*, 31(4), 400–4.
- Stimpson, H. E. M., Toret, C. P., Cheng, A. T., Pauly, B. S., & Drubin, D. G. (2009). Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 20(22), 4640–51.
- Strochlic, T. I., Schmiedekamp, B. C., Lee, J., Katzmann, D. J., & Burd, C. G. (2008). Opposing activities of the Snx3-retromer complex and ESCRT proteins mediate regulated cargo sorting at a common endosome. *Mol Biol Cell*, 19(11), 4694–706.
- Sugawara, T., Sato, M., Takagi, T., Kamasaki, T., Ohno, N., & Osumi, M. (2003). *In situ* localization of cell wall alpha-1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microscop*, 52(2), 237–42.

- Sugawara, T., Takahashi, S., Osumi, M., & Ohno, N. (2004). Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydr Res*, 339(13), 2255–65.
- Tanaka, N., Fujita, Y., Suzuki, S., Morishita, M., Giga-Hama, Y., Shimoda, C., & Takegawa, K. (2005). Characterization of O-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun*, 330(3), 813–820.
- Teckchandani, A., Mulkearns, E. E., Randolph, T. W., Toida, N., & Cooper, J. A. (2012). The clathrin adaptor Dab2 recruits EH domain scaffold proteins to regulate integrin β 1 endocytosis. *Mol Biol Cell*, 23(15), 2905–16.
- Tolić-Nørrelykke, I. M., Sacconi, L., Thon, G., & Pavone, F. S. (2004). Positioning and elongation of the fission yeast spindle by microtubule-based pushing. *Curr Biol*, 14(13), 1181–6.
- Touz, M. C., Kulakova, L., & Nash, T. E. (2004). Adaptor protein complex 1 mediates the transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Biol Cell*, 15(7), 3053–60.
- Trahey, M., & Hay, J. C. (2010). Transport vesicle uncoating: it's later than you think. *F1000 Biol reports*, 2, 47.
- Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E., & Spang, A. (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J*, 25(5), 943–954.
- Turi, T. G., Webster, P., & Rose, J. K. (1994). Brefeldin A sensitivity and resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. Isolation of multiple genes conferring resistance. *J Biol Chem*, 269, 24229–24236.
- Ungewickell, E., & Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature*, 289(5796), 420–2.
- Ungewickell, E., & Ungewickell, H. (1991). Bovine brain clathrin light chains impede heavy chain assembly *in vitro*. *J Biol Chem*, 266(19), 12710–4.
- Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S., & Schekman, R. W. (2002). The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell*, 2, 283–294.
- Valdivieso, M. H., Ferrario, L., Vai, M., Durán, A., & Popolo, L. (2000) Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 182, 4752–4757
- Vavylonis, D., Wu, J. Q., Hao, S., O'Shaughnessy, B., & Pollard, T. D. (2008). Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science*, 319(5859), 97–100.
- Venkatram, S., Tasto, J. J., Feoktistova, A., Jennings, J. L., Link, A. J., & Gould, K. L. (2004). Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast gamma-tubulin complex function. *Mol Biol Cell*, 15(5), 2287–301.
- Vida, T. A., & Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, 128(5), 779–792.
- Wagner, C., Graninger, W., Presterl, E., & Joukhadar, C. (2006). The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Pharmacology*, 78(4), 161–77.
- Walker, L. A., Munro, C. A., de Bruijn, I., Lenardon, M. D., McKinnon, A., & Gow, N. A. (2008). Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog*, 4(4), e1000040.
- Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biol*, 174(7), 973–983.
- Wang, H., Tang, X., Liu, J., Trautmann, S., Balasundaram, D., McCollum, D., & Balasubramanian, M. K. (2002). The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, 13(2), 515–529.

-
- Wang, J. T. H., Kerr, M. C., Karunaratne, S., Jeanes, A., Yap, A. S., & Teasdale, R. D. (2010). The SNX-PX-BAR family in macropinocytosis: the regulation of macropinosome formation by SNX-PX-BAR proteins. *PLoS one*, 5(10), e13763.
- Wang, Jing, Gossing, M., Fang, P., Zimmermann, J., Li, X., von Mollard, G. F., Teng, M. (2011). Epsin N-terminal homology domains bind on opposite sides of two SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(30), 12277–82.
- Wang, Jingshan, Virta, V. C., Riddelle-Spencer, K., & O'Halloran, T. J. (2003). Compromise of clathrin function and membrane association by clathrin light chain deletion. *Traffic*, 4(12), 891–901.
- Weinberg, J., & Drubin, D. G. (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol*, 22(1), 1–13.
- Wessels, D., Reynolds, J., Johnson, O., Voss, E., Burns, R., Daniels, K., Soll, D. R. (2000). Clathrin plays a novel role in the regulation of cell polarity, pseudopod formation, uropod stability and motility in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*, 113 (1), 21–36.
- Whittle, J. R. R., & Schwartz, T. U. (2010). Structure of the Sec13-Sec16 edge element, a template for assembly of the COPII vesicle coat. *J Cell Biol*, 190(3), 347–61.
- Wilbur, J. D., Chen, C.-Y., Manalo, V., Hwang, P. K., Fletterick, R. J., & Brodsky, F. M. (2008). Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *J Biol Chem*, 283(47), 32870–9.
- Wilbur, J. D., Hwang, P. K., Ybe, J. A., Lane, M., Sellers, B. D., Jacobson, M. P., Brodsky, F. M. (2010). Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Dev Cell*, 18(5), 841–8.
- Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M., & Strahl, S. (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol*, 57(1), 156–170.
- Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenson, M. L., Connolly, M. L., & Lerner, R. A. (1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell*, 37, 767–778.
- Win, T. Z., Gachet, Y., Mulvihill, D. P., May, K. M., & Hyams, J. S. (2001). Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring. *J Cell Sci*, 114(Pt 1), 69–79.
- Wolfe, B. A., & Gould, K. L. (2005). Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol*, 15(1), 10–18.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagsels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabbittnowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P(2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), 871–80.

- Wu, J. Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R., & Pollard, T. D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell*, 5(5), 723–734.
- Wu, J. Q., & Pollard, T. D. (2005). Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science*, 310(5746), 310–314.
- Wu, J. Q., Sirotkin, V., Kovar, D. R., Lord, M., Beltzner, C. C., Kuhn, J. R., & Pollard, T. D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol*, 174(3), 391–402.
- Ybe, J. A., Perez-Miller, S., Niu, Q., Coates, D. A., Drazer, M. W., & Clegg, M. E. (2007). Light chain C-terminal region reinforces the stability of clathrin heavy chain trimers. *Traffic*, 8(8), 1101–10.
- Ybe, J. A., Ruppel, N., Mishra, S., & VanHaften, E. (2003). Contribution of cysteines to clathrin trimerization domain stability and mapping of light chain binding. *Traffic*, 4(12), 850–6.
- Yeung, B G, & Payne, G. S. (2001). Clathrin interactions with C-terminal regions of the yeast AP-1 beta and gamma subunits are important for AP-1 association with clathrin coats. *Traffic*, 2(8), 565–576.
- Yeung, B. G., Phan, H. L., & Payne, G. S. (1999). Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell*, 10(11), 3643–3659.
- Yoko-o, T., Roy, S. K., & Jigami, Y. (1998). Differences *in vivo* acceptor specificity of two galactosyltransferases, the *gmh3+* and *gma12+* gene products from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem*, 257, 630–637.
- Yoko-o, T., Tsukahara, K., Watanabe, T., Hata-Sugi, N., Yoshimatsu, K., Nagasu, T., Jigami, Y., T. (2001). *Schizosaccharomyces pombe och1(+)* encodes alpha-1,6-mannosyltransferase that is involved in outer chain elongation of N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett*, 489(1), 75–80.
- Yonetani, A., Lustig, R. J., Moseley, J. B., Takeda, T., Goode, B. L., & Chang, F. (2008). Regulation and targeting of the fission yeast formin *cdc12p* in cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 19(5), 2208–19.
- Yu, I.-M., & Hughson, F. M. (2010). Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Ann Rev Cell Dev Bi*, 26, 137–56.
- Yu, Y, Kita, A., Udo, M., Katayama, Y., Shintani, M., Park, K., Sugiura, R. (2012). Sip1, a Conserved AP-1 Accessory Protein, Is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast. *PLoS one*, 7(9), e45324.
- Yu, Yang, Li, C., Kita, A., Katayama, Y., Kubouchi, K., Udo, M., Sugiura, R. (2013). Sip1, an AP-1 Accessory Protein in Fission Yeast, Is Required for Localization of Rho3 GTPase. *PLoS one*, 8(7), e68488.
- Zhdankina, O., Strand, N. L., Redmond, J. M., & Boman, A. L. (2001). Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. *Yeast*, 18(1), 1–18.
- Zuin, A., Carmona, M., Morales-Ivorra, I., Gabrielli, N., Vivancos, A. P., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2010). Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J*, 29(5), 981–91.
- Zupancic, M. L., Frieman, M., Smith, D., Alvarez, R. A., Cummings, R. D., & Cormack, B. P. (2008). Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol*, 68(3), 547–559.

