

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica
(USAL /CSIC)



TESIS DOCTORAL

El exómero de *Schizosaccharomyces pombe*
colabora en el tráfico vesicular entre el
aparato de Golgi y el sistema endosomal

Marta Hoya Gallego

Salamanca 2016



El **Dr. Francisco del Rey Iglesias**, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "**El exómero de *Schizosaccharomyces pombe* colabora en el tráfico vesicular entre el aparato de Golgi y el sistema endosomal**", presentada por la licenciada **Marta Hoya Gallego** para optar al grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^ª Henar Valdivieso Montero en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ___ de _____ de 201__.

Fdo. Dr. Francisco del Rey Iglesias



La **Dra. M^a Henar Valdivieso Montero**, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "**El exómero de *Schizosaccharomyces pombe* colabora en el tráfico vesicular entre el aparato de Golgi y el sistema endosomal**", presentada por la licenciada **Marta Hoya Gallego** para optar al grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 201__.

Fdo. Dra. M^a Henar Valdivieso Montero

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de una beca predoctoral del Programa de Formación JAE-Predocctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), proyectos del Plan Nacional de I+D (MICINN/Programa FEDER: BFU2007-61866 y BFU2010-15085) y (MINECO/Programa FEDER: BFU2013-48583-C2-2-P) y proyectos de la Junta de Castilla y León GR231 y SA073U14.

A mis padres,
por ser todo lo que soy

**"Conserva celosamente tu derecho a
reflexionar,
porque incluso el hecho de pensar
errónamente es
mejor que no pensar en absoluto"**

Hipatía de Alejandría
Paradigma de la mujer liberada

Abreviaturas, Siglas y Acrónimos

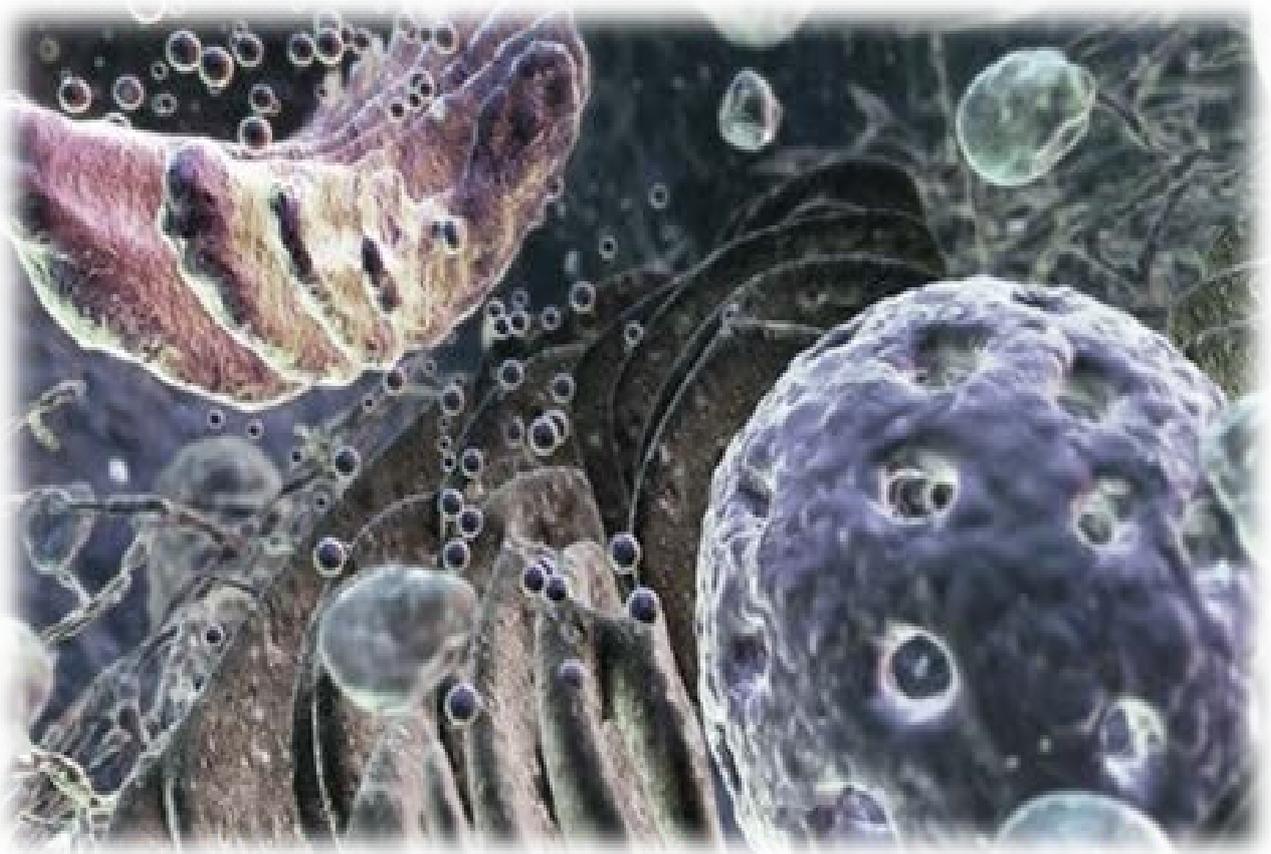
αGS	<u>α</u> -glucán <u>s</u> intasa
βGS	<u>β</u> -glucán <u>s</u> intasa
aa'	<u>A</u> mino <u>á</u> cidos
ADN	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico
ALP	Fosfatasa Alcalina (<u>A</u> lkaline <u>p</u> hosphatase)
AP	Proteína adaptadora (<u>A</u> ssembly <u>p</u> olypeptide)
ARF	Factor de ADP-ribosilación (<u>A</u> DP- <u>r</u> ibosylation <u>f</u> actor)
ARN	<u>Á</u> cido <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleico
BAR	<u>B</u> in/ <u>A</u> mphiphysin/ <u>R</u> vs-homology
BRCT	<u>B</u> reast <u>C</u> ancer <u>C</u> - <u>T</u> erminal
BSA	Albumina sérica bovina (<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
CCV	Vesícula cubierta por clatrina (<u>C</u> lathrin <u>c</u> oat <u>v</u> esicles)
CDCFDA	5, 6- <u>c</u> arboxi-2', 7'- <u>d</u> iclorofluoresceína <u>d</u> iacetato
ChAPs	<u>C</u> hs5-and- <u>A</u> rf-binding <u>p</u> roteins
Chs	Síntesis de quitina (<u>C</u> hitin <u>s</u> ynthesis)
COG	<u>C</u> onserved <u>o</u> ligomeric <u>G</u> olgi
COP	<u>C</u> oatomer <u>p</u> rotein
CORVET	<u>C</u> lass <u>C</u> <u>c</u> ore <u>v</u> acuole/ <u>e</u> ndosome <u>t</u> ethering
cpm	<u>C</u> uentas <u>p</u> or <u>m</u> inuto
DIC	<u>C</u> ontraste <u>i</u> nter <u>d</u> iferencial
DMSO	<u>D</u> imetil <u>S</u> ulfó <u>x</u> ido
D.O.	<u>D</u> ensidad <u>ó</u> ptica
DTT	<u>D</u> itio <u>t</u> reitol
EDTA	<u>Á</u> cido <u>e</u> tilén <u>d</u> iamino <u>t</u> etra- <u>a</u> cético
EE	Endosoma temprano (<u>E</u> arly <u>e</u> ndosome)
EGFP	Variante de la proteína verde fluorescente (<u>E</u> nhanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
EGTA	<u>Á</u> cido <u>e</u> tilén glicol bis <u>t</u> etra- <u>a</u> cético
ERES	Sitios de exportación del RE (<u>E</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum <u>e</u> xit <u>s</u> ites)
ESCRT	<u>E</u> ndosomal <u>s</u> orting <u>c</u> omplex <u>r</u> equired <u>f</u> or <u>t</u> ransport
FM4-64	[Dibromuro de N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(dietilamino) fenil) hexatrienil) piridina]
FN3	Fibronectina tipo III (<u>F</u> ibron <u>e</u> ctin <u>t</u> ype <u>III</u>)
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPásica (<u>G</u> TPase <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein)
GARP	<u>G</u> olgi- <u>a</u> ssoiated <u>r</u> etrograde <u>p</u> rotein
GDP	Guanosina 5'-difosfato (<u>G</u> uanosine 5'- <u>d</u> iphosphate)
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<u>G</u> uanine <u>n</u> ucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor)
GFP	Proteína verde fluorescente (<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
GGA	<u>G</u> olgi- <u>l</u> ocalized, <u>g</u> amma- <u>e</u> ar- <u>c</u> otaining, <u>a</u> rf- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein

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
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HOPS	<i>Homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting</i>
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
ILV	Vesícula intraluminal (<i>Intraluminal vesicle</i>)
IP	Inmunoprecipitación
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LatA	Latrunculina A
LB	Medio rico para <i>E. coli</i> (<i>Luria-Bertani</i>)
LE	Endosoma tardío (<i>Late endosome</i>)
MM	Medio mínimo para <i>S. pombe</i> (<i>Minimal media</i>)
MP	Membrana plasmática
MVB	Cuerpo multivesicular (<i>Multivesicular bodie</i>)
NPF	Factor promotor de la nucleación (<i>Nucleation promoting factor</i>)
ORF	Fase de lectura abierta (<i>Open reading frame</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PIP	Fosfatidil inositol fosfato (<i>Phosphatidyl inositol phosphate</i>)
PMSF	Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
PVC	Compartimento pre-vacuolar (<i>Pre-vacuolar compartment</i>)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
QS	Quíntin sintasa
RE	Retículo endoplasmático
RFP	Proteína roja fluorescente (<i>Red fluorescent protein</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Sample buffer
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>
TAE	Tampón Tris-Acético EDTA
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20 (<i>Tris-buffered saline Tween-20</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
TGN	Red trans del Golgi (<i>Trans-Golgi network</i>)
TPR	<i>Tetrapetide repeat</i>
Tris	Tris-(hidroximetilamino)-metano

Abreviaturas

xg	Veces la gravedad
WT	Estirpe silvestre (<i>Wild type</i>)
YES	Medio rico para <i>S. pombe</i> (<i>Yeast extract + supplements</i>)
2xYT	Medio muy rico para <i>E. coli</i> (<i>2x Yeast extract tryptone</i>)

Índice



Introducción	1
1. La levadura como modelo de estudio del tráfico intracelular	3
1.1 La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
2. La pared celular de <i>S. pombe</i>	7
2.1 Interés del estudio de la pared celular en levaduras	7
2.2 Composición de la pared celular	8
2.3 Biosíntesis y regulación de los componentes de la pared celular	10
2.3.1 α -glucano	10
2.3.2 β -glucano	10
2.3.3 Galactomanano	13
2.4 Quitina	13
2.5 Remodelación y degradación de la pared celular	15
3. Visión general del tráfico intracelular de proteínas con dominios transmembranales	16
3.1 Teoría del transporte vesicular	17
4. Ruta de secreción temprana	21
4.1 Vesículas COPII (<i>COatomer Protein II</i>)	21
4.2 Vesículas COPI (<i>COatomer Protein I</i>)	22
5. Ruta de secreción tardía	24
5.1 El aparato de Golgi y el sistema endosomal	24
5.2 Tráfico vesicular mediado por clatrina	27
5.2.1 Clatrina	27
5.2.2 Adaptadores de clatrina	29
5.2.3 Endocitosis mediada por clatrina	37
5.2.4 Secreción mediada por clatrina	40
5.3 Tráfico vesicular independiente de clatrina	41

5.3.1 El exómero	41
5.3.2 El retrómero	44
5.4 Degradación de proteínas transmembranales.....	45
Antecedentes y Objetivo	49
Resultados	53
1. Fenotipos del mutante <i>cfr1Δ</i> en el ciclo vegetativo	55
2. Caracterización del exómero de <i>S. pombe</i>.....	57
2.1 Funcionalidad del extremo amino terminal de la proteína Cfr1.....	57
2.2 Análisis bioinformático de la proteína Bch1	59
2.3 Localización de la proteína Bch1	60
2.3.1 Localización de la proteína Bch1 en el mutante <i>cfr1Δ</i>	60
2.4 El módulo FBE de Cfr1 es suficiente para promover la localización de la proteína Bch1 en el aparato de Golgi.....	62
2.5 Las proteínas Cfr1 y Bch1 forman un complejo	62
2.6 Las proteínas Cfr1 y Bch1 necesitan la actividad de la GTPasa Arf1 para localizarse en el aparato de Golgi.....	63
3. Localización del exómero de <i>S. pombe</i>.....	65
3.1 El exómero de <i>S. pombe</i> co-localiza con marcadores del TGN/EEs	65
3.2 El exómero de <i>S. pombe</i> co-localiza con endosomas tempranos	66
3.3 Localización del exómero de <i>S. pombe</i> en endosomas/PVC/vacuolas	67
4. Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y otros complejos de proteínas que participan en el transporte entre el aparato de Golgi y los endosomas.....	70
4.1 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y el adaptador AP-1.....	71
4.1.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles <i>cfr1Δ apm1Δ</i>	71
4.1.2 Las proteínas Cfr1 y Apm1 interactúan físicamente	72
4.1.3 Localización de la proteína Apm1 en el mutante <i>cfr1Δ</i> y viceversa	73

4.1.4 El exómero no participa en el proceso general de secreción celular	74
4.2 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y el adaptador AP-2.....	75
4.2.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles <i>cfr1Δ apl3Δ</i>	75
4.2.2 Las proteínas Cfr1 y Apm4 interaccionan físicamente	76
4.2.3 Localización de la proteína Apl3 en el mutante <i>cfr1Δ</i>	77
4.3 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y los adaptadores GGA.....	78
4.3.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles <i>cfr1Δ gga21Δ</i> y <i>cfr1Δ gga22Δ</i> y del mutante triple <i>cfr1Δ gga21Δ gga22Δ</i>	78
4.3.2 Las proteínas Cfr1 y Gga22 interaccionan físicamente.....	78
4.4 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y el adaptador AP-3.....	80
4.4.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles <i>cfr1Δ apm3Δ</i>	80
4.4.2 Las proteínas Cfr1 y Apm3 no interaccionan físicamente	80
4.5 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y la clatrina.....	81
4.5.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles <i>cfr1Δ clc1-232</i>	81
4.5.2 Las proteínas Cfr1 y Clc1 no interaccionan físicamente.....	82
5. Relación entre el exómero y la síntesis de pared celular en <i>S. pombe</i>	83
5.1 Interacción génica entre el gen <i>cfr1⁺</i> y los genes que codifican las enzimas β(1,3)-glucán sintasa	84
5.1.1 Análisis de la existencia de interacción génica entre <i>cfr1⁺</i> y <i>bgs1⁺</i>	84
5.1.2 Análisis de la existencia de interacción génica entre <i>cfr1⁺</i> y <i>bgs4⁺</i>	86
5.2 Análisis de la composición de la pared celular en los mutantes carentes del exómero en <i>S. pombe</i>	88
5.3 El exómero de <i>S. pombe</i> interacciona físicamente con las enzimas β(1,3)-glucán sintasa ..	90
5.4 El exómero y la enzima β-glucán sintasa Bgs4 co-localizan	91
5.5 El sorbitol corrige los defectos de crecimiento que presentan distintos mutantes relacionados con el tráfico vesicular	93
5.6 Valoración de la actividad β-glucán sintasa <i>in vitro</i> en el mutante doble <i>cfr1Δ apm1Δ</i>	96

6. Análisis de la regulación de algunas enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular por el exómero en <i>S. pombe</i>	97
6.1 Estudio de la localización de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular en mutantes carentes del exómero	98
6.2 Análisis de la cantidad de proteína de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de pared celular	102
6.3 Análisis de la distribución subcelular de la enzima β -glucán sintasa Bgs4 en el mutante <i>cfr1Δ</i>	103
7. Regulación de las enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular por el exómero de <i>S. pombe</i> en cepas carentes de adaptadores de clatrina	105
7.1 Análisis por microscopía de fluorescencia	105
7.2 Análisis por fraccionamiento subcelular	111
8. Distribución de marcadores de orgánulos en mutantes carentes de distintos adaptadores de clatrina y/o del exómero en <i>S. pombe</i>	113
8.1 Localización de algunos marcadores del TGN y del sistema endosomal en el mutante doble <i>cfr1Δ apm1Δ</i>	114
8.2 Localización de algunos marcadores del TGN y del sistema endosomal en mutantes carentes del exómero y/o de adaptadores GGA.....	118
9. Otros aspectos relacionados con tráfico vesicular en los mutantes del exómero en <i>S. pombe</i>	120
9.1 Proceso de endocitosis.....	121
9.2 Morfología y propiedades de las vacuolas.....	121
9.3 Transporte desde o hacia el retículo endoplasmático	123
9.3.1 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y las vesículas COPII	123
9.3.2 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y las vesículas COPI	125
9.3.3 Relación entre el exómero de <i>S. pombe</i> y el receptor Rer1	127
Discusión	129
<i>S. pombe</i> posee la forma más sencilla posible de un exómero	132
El exómero de <i>S. pombe</i> participa en el tráfico intracelular desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática	134

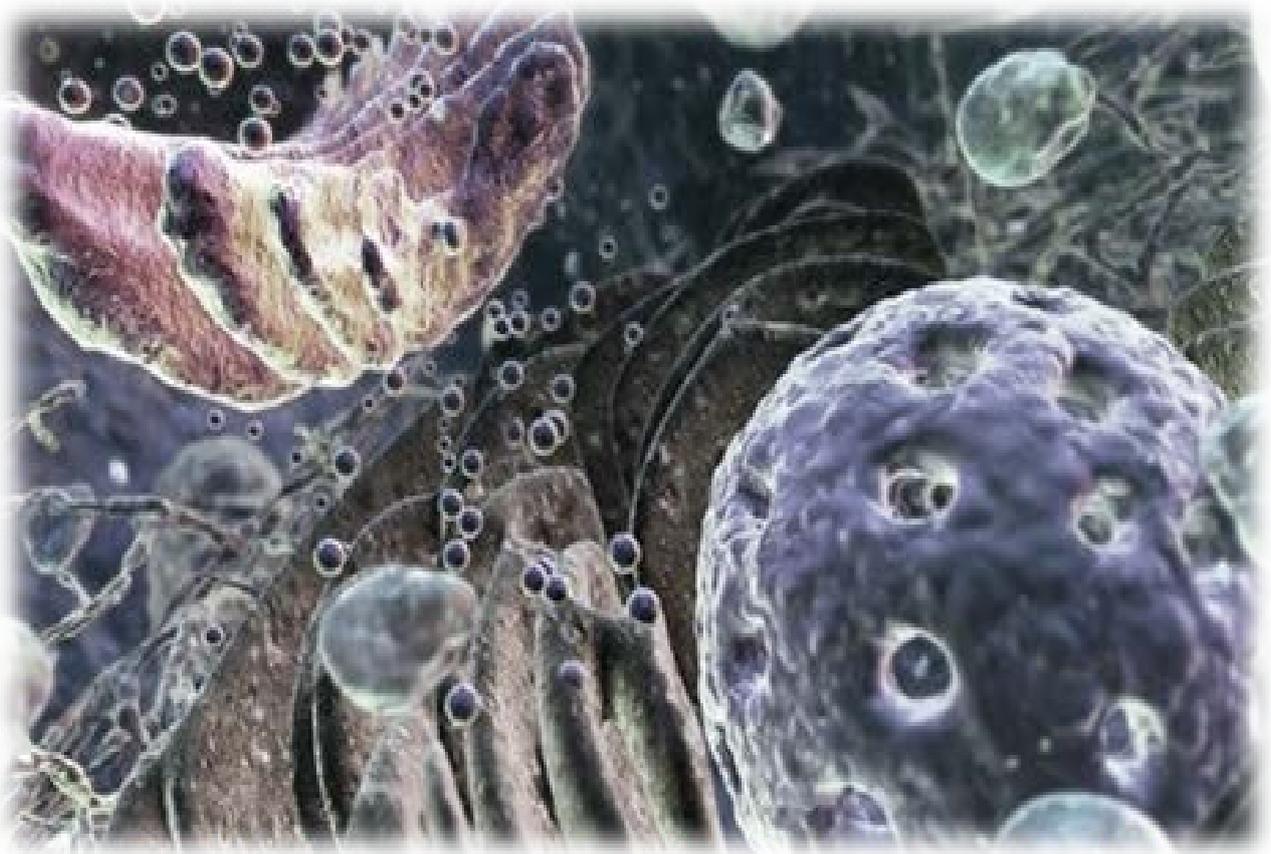
El exómero de <i>S. pombe</i> colabora con el complejo AP-1 en el tráfico intracelular entre el TGN y los endosomas tempranos.....	137
El exómero de <i>S. pombe</i> colabora con los adaptadores GGA en el tráfico entre el TGN y los endosomas tardíos	140
¿Cuál es la función conservada del exómero?	142
Relación evolutiva entre el exómero y otros adaptadores implicados en el tráfico vesicular	145
Visión general y perspectivas de futuro	147
Conclusiones	149
Materiales y Métodos	153
1. Microorganismos utilizados.....	155
2. Medios de cultivo	158
2.1 Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	158
2.2 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	160
3. Condiciones y estimación del crecimiento	160
3.1 Condiciones de cultivo para el crecimiento de <i>S. pombe</i>	160
3.2 Condiciones de cultivo para el crecimiento de <i>E. coli</i>	161
3.3 Ensayos de crecimiento en gota.....	161
3.4 Crecimiento de <i>S. pombe</i> en condiciones de cultivo especiales.....	161
4. Métodos genéticos.....	162
4.1 Conjugación.....	163
4.2 Aislamiento de ascosporas al azar	163
4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: análisis de tétradas	164
5. Técnicas generales de biología molecular	164
5.1 Vectores utilizados	164
5.1.1 Vectores de <i>E. coli</i>	164

5.1.2 Vectores de <i>S. pombe</i>	165
5.2 Obtención del ADN.....	165
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	166
5.4 Secuenciación de ADN.....	167
5.5 Manipulación de ADN	167
5.6 Mutagénesis dirigida in vitro.....	168
5.7 Transformación de <i>E. coli</i>	169
5.8 Transformación de <i>S. pombe</i>	169
5.9 Clonación del gen <i>bch1</i> ⁺	169
5.9.1 Obtención de mutantes nulos <i>bch1::KAN</i>	170
5.10 Marcaje del gen <i>bch1</i> ⁺	172
6. Análisis de proteínas	173
6.1 Obtención de extractos celulares.....	173
6.1.1 Obtención de extractos celulares para el análisis de proteínas de membrana.....	174
6.2 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	175
6.3 Inmunodetección de proteínas	176
6.4 Co-inmunoprecipitación de proteínas	177
6.4.1 Co-inmunoprecipitación de proteínas de membrana	178
6.5 Ensayo de <i>immunoblot</i> de colonias (<i>dot blot</i>).....	179
7. Fraccionamientos subcelulares por gradientes de sacarosa	180
8. Actividades enzimáticas	182
8.1 Valoración de la actividad de la fosfatasa ácida	182
8.2 Valoración de la actividad β -glucán sintasa	183
9. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular.....	185

10. Técnicas microscópicas.....	187
10.1 Microscopía de campo claro y de contraste de fases	188
10.2 Microscopía de fluorescencia.....	188
10.2.1 Fluorescencia directa con proteínas de fusión	188
10.2.2 Tinción con calcoflúor	189
10.2.3 Tinción con Hoechst 33258.....	190
10.2.4 Tinción con FM4-64	190
10.2.5 Tinción con CDCFDA.....	191
10.2.6 Microscopía confocal a tiempo real	192
10.2.7 Microscopía electrónica.....	192
11. Análisis bioinformático de datos.....	192
12. Análisis estadístico de los datos.....	192

Bibliografía

Introducción



1. La levadura como modelo de estudio del tráfico intracelular

La alteración del tráfico de proteínas a distintos niveles es la base de una gran variedad de enfermedades humanas como sucede en el cáncer, en procesos neurodegenerativos o en algunas patologías metabólicas (Foury & Kucej, 2002; Steinmetz 2002; Cho & Hofmann, 2004; Leto & Saltiel, 2012). Está descrito que el 25% de los genes humanos causantes de enfermedades tienen un homólogo en levaduras (Bassett *et al.*, 1996), por lo que estos microorganismos constituyen un sistema en el que poder estudiar los mecanismos moleculares afectados en dichas enfermedades. La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* ha sido muy utilizada para el estudio de procesos celulares y moleculares básicos debido a que se trata de un sistema sencillo y fácil de manipular en el laboratorio, que además es seguro dada la ausencia de patogenicidad.

El estudio de la regulación de distintas proteínas de membrana de levaduras ha aportado información sobre el transporte entre distintos compartimentos celulares, los mecanismos de plegamiento de proteínas, y los procesos de control de calidad. Por tanto, el conocimiento de la regulación del tráfico intracelular es un objetivo interesante que se ha mantenido a lo largo de los años. En este sentido la proteína Chs3 de *S. cerevisiae* ha sido muy utilizada en este tipo de estudios. Chs3 además de ser relevante por su propia función biológica, debido a que es la encargada de la síntesis de la mayor parte de la quitina de su pared celular, es un modelo para el estudio de las rutas de tráfico intracelular. Además el estudio de los mecanismos implicados en su síntesis es básico para el desarrollo de nuevos antifúngicos frente a esta diana.

En los últimos años se ha avanzado bastante en el conocimiento del sistema de transporte intracelular, y cómo éste garantiza la eficacia de muchas funciones celulares. De hecho, los hallazgos importantes obtenidos en este campo han dotado a tres grandes científicos del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2013. En concreto, uno de los investigadores galardonados ha sido Randy Schekman, quien utilizando como modelo de estudio la levadura *S. cerevisiae* fue capaz de conocer

cómo la célula organiza su sistema de transporte vesicular y de identificar muchos de los genes que son necesarios para dicho tráfico.

1.1 La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

El organismo elegido para la realización de este trabajo fue la levadura de fisión *S. pombe*. Este hongo unicelular pertenece a los ascomicetos y posee un genoma de 13,8 Mb con 4.824 genes repartidos en 3 cromosomas: I (5,7 Mb), II (4,6 Mb) y III (3,5 Mb). 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>.

Tanto la levadura de gemación *S. cerevisiae* como la levadura de fisión *S. pombe* se utilizan como modelos de estudio en biología molecular. Ambas levaduras son organismos unicelulares y, aunque presentan rasgos comunes, en general son muy diferentes entre ellas debido a que sus antecesores se separaron hace 330 a 420 millones de años (Sipiczki, 2000; Heckman *et al.*, 2001; Hedges, 2002) (Figura 1).

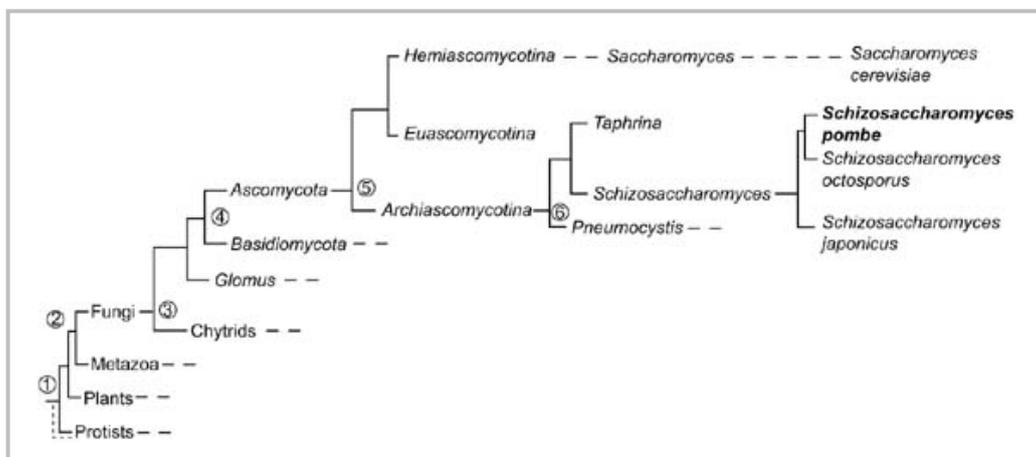


Figura 1. Árbol filogenético de las levaduras de fisión.

El tiempo es: ① 1,200 millones de años (Ma); ② de 1,100 a 1,000 Ma; ③ de 600 a 500 Ma; ④ 400 Ma; ⑤ de 420 a 330 Ma; ⑥ 250 Ma.

Figura adaptada de Sipiczki, 2000.

La levadura *S. pombe* se describió por primera vez en 1.893 por P. Lindner, quien la aisló de una cerveza de mijo del este de África, de hecho "*pombe*" significa cerveza en Swahili. Su nombre taxonómico hace referencia a que es una levadura

(-*saccharomyces*) y que se divide por fisión (*Schizo*-). La mayoría de las cepas usadas hoy en día en el laboratorio derivan de una estirpe homotálica h^{90} aislada por Ostewalder en Francia en 1921 a partir de un zumo de uva, del que se obtuvieron cepas heterotálicas con los dos tipos sexuales opuestos, h^+ y h^- (Leupold, 1950).

En las últimas décadas *S. pombe* se ha convertido en un organismo muy utilizado para el estudio de multitud de procesos biológicos por varias razones: es fácil de manejar en condiciones de laboratorio, no es patógeno, presenta un ciclo de vida rápido, fundamentalmente haploide, así como un ciclo sexual de corta duración por conjugación. Es susceptible de análisis genético clásico y molecular, lo que permite crear mutaciones, crear estirpes con proteínas marcadas con distintos epítomos, o condicionar la expresión de genes de manera sencilla.

Como organismo que presenta un ciclo celular eucariótico convencional, *S. pombe* es muy similar a las células eucariotas superiores, especialmente si nos referimos al modo de división celular por fisión transversal. Además, como todos los hongos presenta una pared celular que le proporciona protección mecánica, forma y estabilidad osmótica. Esto también permite que este organismo sea un buen modelo para el análisis de la biosíntesis y degradación de esta estructura, así como de los mecanismos de transporte vesicular que regulan dichos procesos.

Ciclo de vida de *S. pombe*

La levadura de fisión presenta un ciclo de vida 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 2).

Las células de esta levadura, que en condiciones normales son haploides, tienen forma cilíndrica, crecen de manera polarizada por extensión de sus extremos y finalmente se dividen por fisión. Cuando la célula madre alcanza el tamaño adecuado se forma un septo que divide dicha célula en dos células hijas que crecen hasta alcanzar el tamaño adecuado y se dividen de nuevo.

En *S. pombe* las células haploides pueden ser de dos tipos sexuales complementarios, h^+ y h^- . La fase diploide solo aparece cuando las 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 rápidamente sufre división meiótica de su núcleo, 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. Los diploides heterocigóticos h^+/h^- se pueden mantener de forma estable en medio rico durante unas generaciones, pero cuando el medio se empobrece esporulan originando un asca azigótica, que también contiene en su interior cuatro ascosporas haploides.

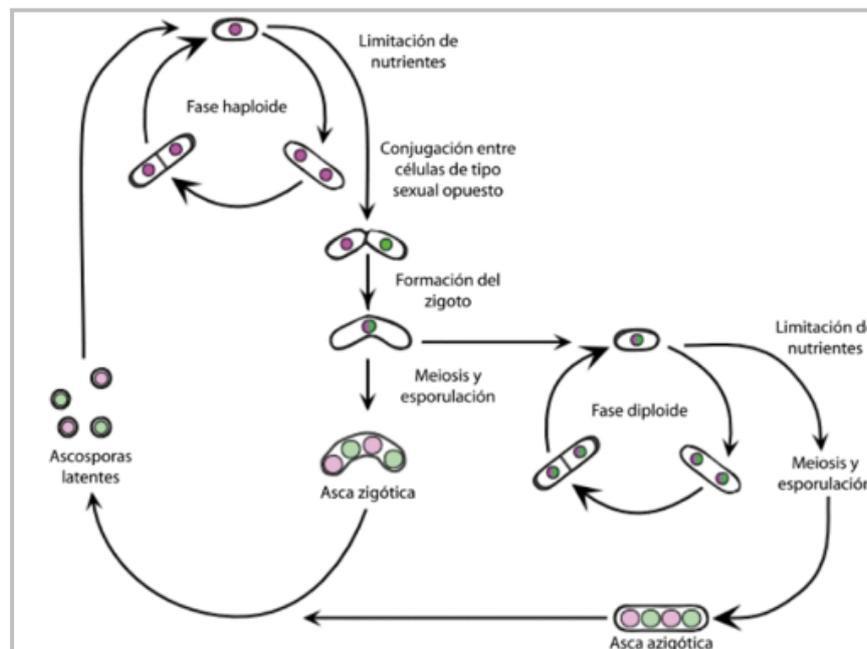


Figura 2. Ciclo de vida de *S. pombe*.

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 de 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. La pared celular de *S. pombe*

2.1 Interés del estudio de la pared celular en levaduras

Anteriormente se ha comentado la importancia del uso de las levaduras como organismos modelos para el estudio de distintos procesos celulares conservados en metazoos como la morfogénesis o la división celular. Sin embargo, las células de hongos y levaduras poseen una estructura denominada pared celular, ausente en células de mamíferos, pero presente en otros grupos taxonómicos: algas, bacterias y plantas.

Se trata de una estructura rígida, externa a la membrana plasmática, que proporciona protección contra la lisis osmótica y contra los daños mecánicos a la célula. La pared celular es una estructura fundamental debido a que es la responsable de la morfología celular, siendo una estructura dinámica capaz de adaptarse tanto a las variaciones morfológicas que tienen lugar a lo largo del ciclo de vida de los organismos como a los cambios debidos a estímulos externos, a los que las células están sometidas constantemente. Para que la pared celular pueda adaptarse a dichos cambios, manteniendo la integridad celular, es necesaria una perfecta coordinación entre el ciclo celular, el crecimiento y la biosíntesis/degradación de esta estructura.

A lo largo de la historia el conocimiento de los mecanismos implicados en la síntesis y degradación de los componentes de la pared celular, así como su regulación han sido importantes desde diversos puntos de vista:

- La pared celular es un elemento estructural esencial y funcional para la supervivencia de las células fúngicas y, al tratarse de una estructura específica de éstas, se convierte en una buena diana para la búsqueda de agentes antifúngicos contra el huésped pero no contra el hospedador.
- Su estudio presenta importancia biotecnológica debido a que por sus características físicas puede comportarse como una barrera que interfiere con la secreción de proteínas recombinantes.

- A su vez, la pared celular constituye una herramienta sencilla para el estudio del proceso de morfogénesis y su relación con el crecimiento celular.

Por todo ello, el estudio de la pared celular presenta un gran interés desde el punto de vista científico.

2.2 Composición de la pared celular

La pared celular de *S. pombe* se observa como una estructura trilaminar al microscopio electrónico de transmisión, con una capa externa y una interna densas a los electrones compuestas por galactomananos y una capa media menos densa compuesta principalmente por α y β -glucanos (Osumi 1998; Humbel *et al.*, 2001) (Figura 3A). El septo de división está muy organizado y presenta una capa interna menos densa denominada septo primario y a ambos lados se sitúan los dos septos secundarios que posteriormente formarán parte de la pared celular de las células hijas (Humbel *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003) (Figura 3B).

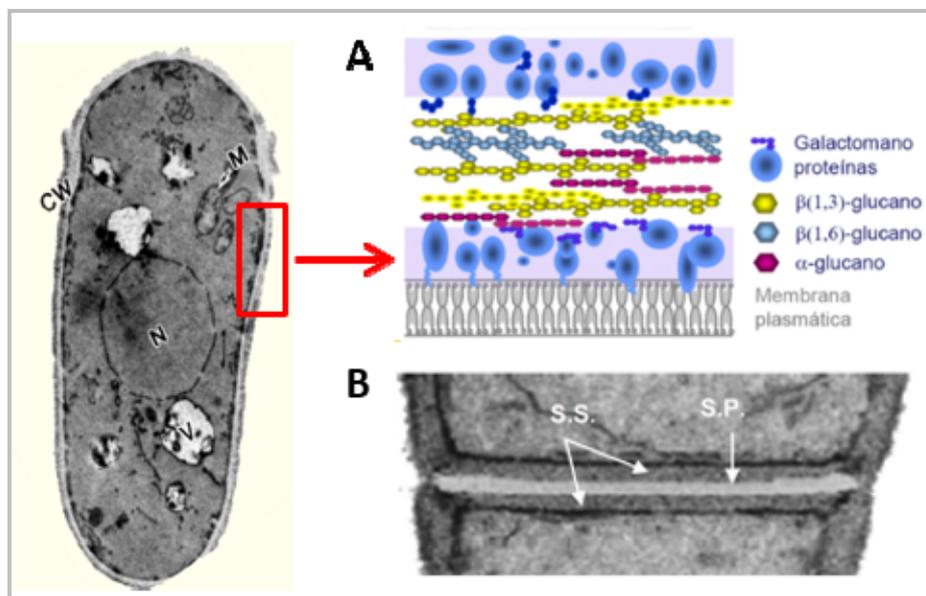


Figura 3. Estructura de la pared celular de *S. pombe*.

A. La pared lateral consta de tres capas. La capa interna y la capa externa las componen fundamentalmente galactomananos. La capa media es menos densa a los electrones y está formada por α y β glucanos.

B. Ultraestructura del septo de división. La capa menos densa a los electrones es el septo primario (S.P.) y las capas que se encuentran a ambos lados del septo primario son los septos secundarios (S.S.).

S. pombe presenta cuatro tipos esenciales de glucanos, que constituyen el 85% del total de su pared celular:

- **$\beta(1,3)$ -glucano lineal.** Lo componen monómeros lineales de $\beta(1,3)$ -glucano (Humbel *et al.*, 2001). Está presente principalmente en el septo primario y en menor cantidad en la pared celular. Este polímero a pesar de ser minoritario tiene mucha afinidad por el colorante calcoflúor, el cual tiñe tanto el septo primario como las zonas de crecimiento (Cortés *et al.*, 2007).
- **$\beta(1,3)$ -glucano con ramificaciones $\beta(1,6)$.** Es el componente más abundante de la pared (aproximadamente 50%) y consta de cadenas lineales con residuos de glucosa unidos por enlace $\beta(1,3)$ y con ramificaciones laterales mediante enlaces $\beta(1,6)$.
- **$\beta(1,6)$ -glucano.** Está constituido por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1,6)$ que contienen un gran número de ramificaciones en $\beta(1,3)$ (Manners & Meyer, 1977). Es un componente minoritario en la pared celular (3-6%) y se le ha denominado diglucano (Magnelli *et al.*, 2005).
- **α -glucano.** Es un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1,3)$ con una pequeña proporción de enlaces $\alpha(1,4)$ (Manners & Meyer, 1977). En *S. pombe* constituye casi un tercio de la pared (28%) (Magnelli *et al.*, 2005) y es un polímero importante en la morfogénesis celular, como lo demuestra el hecho de que mutantes con menor contenido en α -glucano adquieren forma redonda (Grün *et al.*, 2005).

El resto de los polisacáridos (10-15%) está formado por azúcares de las galactomanoproteínas presentes en la pared (Humbel *et al.*, 2001). La presencia de quitina en la levadura de fisión durante el ciclo vegetativo de crecimiento ha sido motivo de controversia (ver más adelante). La ausencia de quitina es una característica propia de la pared celular de *S. pombe*. Esta característica permite el estudio de la regulación de la síntesis de glucano sin interferencia de los mecanismos compensatorios que en otros hongos causan un aumento de la cantidad de quitina cuando la síntesis de glucano es defectuosa (García-Rodríguez *et al.*, 2000; Valdivieso *et al.*, 2000).

2.3 Biosíntesis y regulación de los componentes de la pared celular

2.3.1 α -glucano

El α -glucano es un polímero que está presente tanto en la pared celular de *S. pombe* (18-28% del total) como en la de otros hongos dimórficos y filamentosos (Bush *et al.*, 1974; Bobbitt *et al.*, 1977); sin embargo, está ausente en la pared celular de *S. cerevisiae*.

La enzima responsable de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular se denomina α -glucán sintasa (α GS). El gen *ags1⁺* codifica una proteína integral de membrana de 272 KDa que presenta cierta homología con proteínas implicadas en el metabolismo del glucano; por ello, se considera la enzima α -glucán sintasa, o al menos un componente de dicha actividad (Hochstenbach *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999; Konomi *et al.*, 2003). Además, existen otros cuatro genes con similitud de secuencia a *ags1⁺* denominados *mok11⁺*, *mok12⁺*, *mok13⁺* y *mok14⁺*, los cuales no son necesarios para la viabilidad celular pero sí participan en la síntesis de la pared celular de las ascosporas (García *et al.*, 2006a).

El α -glucano sintetizado por esta enzima es esencial para la integridad de la pared celular durante el crecimiento. Este polímero durante el proceso de septación interviene en la síntesis del septo secundario y en la correcta formación del septo primario, confiriéndole la rigidez necesaria para soportar la presión de turgencia que se genera durante el proceso de separación celular (Cortés *et al.*, 2012).

2.3.2 β -glucano

El término β -glucano engloba a todos los polisacáridos formados por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1,3)$ o $\beta(1,6)$. En esta levadura representa un 50-54% del contenido total de la pared, siendo el principal componente de la misma, así como el responsable de la fuerza mecánica y del mantenimiento de la forma de las células (Cortés *et al.*, 2002).

La enzima responsable de la biosíntesis del $\beta(1,3)$ -glucano de la pared celular es la denominada $\beta(1,3)$ -glucán sintasa (β GS) [UDP-glucosa: $\beta(1,3)$ -D-glucano-3- β -D-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.34]. Esta enzima está en la membrana plasmática y emplea UDP-glucosa como sustrato para formar cadenas lineales de glucosa. La actividad β GS está formada por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora (Cabib *et al.*, 1998; Douglas, 2001). En *S. pombe* se han identificado cuatro genes que podrían codificar isoformas de las 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; mientras que *bgs1⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺* son necesarios para la viabilidad celular, *bgs2⁺* lo es para el proceso de esporulación en la correcta maduración de las esporas (Ishiguro *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2013). Las proteínas Bgs son proteínas transmembranales de elevado peso molecular (aproximadamente 200 kDa) y presentan similitud con las subunidades de las enzimas β -glucán sintasa descritas en *S. cerevisiae*, las cuales se denominan Fks1 y Fks2 (Mazur *et al.*, 1995). Tanto las enzimas Bgs1 como Bgs3 y Bgs4 se localizan en el ecuador celular (Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Mulvihill *et al.*, 2006) y en los polos de crecimiento (Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007). También se pueden observar en puntos dispersos por el citoplasma que podrían corresponder a orgánulos de transporte. Por último, mencionar que la subunidad reguladora de la enzima $\beta(1,3)$ -glucán sintasa está constituida por la GTPasa Rho1 (Arellano *et al.*, 1996).

A continuación se detalla la importancia que presenta cada una de las subunidades catalíticas del complejo $\beta(1,3)$ -glucán sintasa:

- **Bgs1** es esencial para la síntesis del $\beta(1,3)$ -glucano lineal del septo primario (Humbel *et al.*, 2001; Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Las células con un bajo nivel de expresión del gen *bgs1⁺* presentan septos aberrantes que no pueden ser degradados correctamente, provocando la aparición de células encadenadas (Cortés *et al.*, 2007). Este hecho indica que Bgs1 tiene un papel importante en el proceso de citocinesis. El $\beta(1,3)$ -glucano no sólo está presente en el septo primario, sino que aparecen trazas del mismo en la pared celular del resto de la célula. Esto está de acuerdo con el hecho de que la proteína Bgs1 no solo aparece localizada en el ecuador celular, sino también en

los polos, indicando que participa en el proceso de polaridad y de morfogénesis (Cortés *et al.*, 2007). Se sabe que el citoesqueleto de actina es necesario para la localización de Bgs1 en la zona de división, aunque no para su mantenimiento en esta estructura (Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). La maquinaria de secreción es esencial para que la localización de esta enzima sea la correcta en los polos celulares (Liu *et al.*, 2002; Mulvihill *et al.*, 2006; Bendezu & Martín, 2011; Yu *et al.*, 2012). Todos estos resultados indican que la proteína Bgs1 es importante en la viabilidad celular, así como en la polaridad y en la morfogénesis de la levadura de fisión (Mulvihill *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2007).

- **Bgs2** es necesaria en el proceso de esporulación, pero no parece jugar ningún papel durante el crecimiento vegetativo. Análisis por microscopía electrónica de la pared celular de las ascas del mutante *bgs2Δ* muestran que esta pared es mucho más delgada que la de una cepa WT y además presenta una capa de β-glucano apenas detectable; por lo que las esporas que se forman son inmaduras y no pueden germinar (Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000).

- **Bgs3** es necesaria para el mantenimiento de la viabilidad celular (Martín *et al.*, 2003) y la polaridad durante el crecimiento vegetativo, aunque su función concreta se desconoce. En ausencia del gen *bgs3⁺* las células son redondeadas y tienen una pared celular más gruesa que la de una cepa WT. Además, se sabe que la pared celular de estos mutantes presenta una mayor cantidad de α-glucano, seguramente para compensar el descenso en la cantidad de β-glucano en la célula (Martín *et al.*, 2003). Esta proteína aparece localizada en la zona de división y en los polos, es decir, al igual que en el caso de Bgs1 en las zonas de crecimiento activo (Martín *et al.*, 2003). También está descrito que la expresión de esta proteína aumenta cuando se producen defectos en la síntesis de otras β-glucán sintasa como Bgs1 y Bgs4, por tanto Bgs3 podría actuar en algún mecanismo compensatorio en respuesta a daños en la pared celular (Cortés *et al.*, 2006).

- **Bgs4** es una proteína esencial en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento polarizado y la citocinesis, y para la germinación de las esporas. Está descrito que Bgs4 se encarga de la síntesis del β(1,3)-glucano de la pared celular y del

septo secundario, siendo sus lugares de localización el ecuador celular y los polos celulares. Además, se cree que puede formar parte de un mecanismo de reparación frente a un posible exceso de degradación de la pared celular durante el proceso de división. Mencionar también que Bgs4 es la responsable de la mayor parte de la actividad β -glucán sintasa detectada *in vitro* (Cortés *et al.*, 2005).

2.3.3 Galactomanano

El galactomanano de *S. pombe* constituye el componente glucídico de las glicoproteínas de la pared celular y representa del 9 al 14% del total de esta estructura. Está formado por un núcleo central de residuos de manosa unidos mediante enlaces $\alpha(1,6)$ y por cadenas laterales de manosa con enlaces $\alpha(1,2)$ terminadas en un resto de galactosa en los extremos no reductores (Bush *et al.*, 1974; Horisberger *et al.*, 1978; Magnelli *et al.*, 2005). La glicosilación de las proteínas de la pared celular se produce en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. Posteriormente, las glicoproteínas de la pared celular son secretadas, permaneciendo unidas a la membrana mediante grupos GPI (Glicosil Fosfatidil Inositol) o formando enlaces con la matriz de glucanos de la pared celular (Gemmill y Trimble, 2004).

2.4 Quitina

La pared celular fúngica varía tanto en composición como en estructura en los distintos grupos taxonómicos. Uno de los organismos en los que mejor se ha estudiado esta estructura es en la levadura de gemación *S. cerevisiae*. La pared celular de esta levadura está formada por β -glucano, quitina y diversas manoproteínas (Durán & Pérez, 2004). La quitina es producida por las enzimas denominadas quítin sintasa (QS). En todos los grupos de hongos se han descrito genes nombrados con las letras *CHS* (*CHitin Synthesis*) que codifican enzimas QS, también se han encontrado genes similares en otros grupos evolutivos como bacterias, protozoos e incluso vertebrados (Valdivieso *et al.*, 2004).

La presencia de quitina en la pared celular de *S. pombe* es un tema bastante controvertido. Esta controversia radica en que mientras algunos autores han detectado pequeñas cantidades de glucosamina en la pared celular de células en crecimiento vegetativo, mediante hidrólisis de su estructura y posterior análisis cromatográfico (Poole & Lloyd, 1972; Sietsma & Wessels, 1990; Dallies *et al.*, 1998), otros autores han sido incapaces de detectar quitina utilizando técnicas como la difracción de Rayos X o la tinción con la lectina aglutinina de germen de trigo o WGA (*Wheat Germ Agglutinin*), que reconoce específicamente residuos de N-Acetilglucosamina, unida a fluoresceína-5-isotiocianato o FITC (*Fluorescein-5-IsoTioCyanate*) (Kreger, 1954; Horisberger *et al.*, 1978).

A pesar de la poca importancia de la quitina en su pared celular, en el genoma de *S. pombe* existen genes con similitud a los genes *CHS* (Tabla I):

- Chs1 es una auténtica enzima QS necesaria para el proceso de esporulación (Arellano *et al.*, 2000). Pertenece a la Familia 1 de las enzimas QS (Roncero *et al.*, 2016).
- Chs2 presenta similitud con las enzimas QS de la Familia 1 aunque carece de actividad catalítica; esta proteína es necesaria para mantener la estabilidad del anillo contráctil de actomiosina durante la citocinesis, al igual que la proteína Chs2 de *S. cerevisiae* (Martín-García *et al.*, 2003; VerPlank & Li, 2005; Martín-García & Valdivieso, 2006).
- Hay cuatro genes que codifican proteínas similares a Chs4 de *S. cerevisiae* (necesaria para la localización y la regulación de Chs3, la subunidad catalítica de la actividad QSIII). Hasta el momento se ha estudiado Cfh3, necesaria para la estabilidad de la enzima β GS Bgs1 en la zona de septación, particularmente en condiciones de estrés (Sharifmoghadam & Valdivieso, 2009; Sharifmoghadam *et al.*, 2012).
- Cfr1 es una proteína que presenta similitud con Chs5 de *S. cerevisiae* (necesaria para el transporte de Chs3, ver más adelante) y que participa en el proceso de fusión celular durante la conjugación (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006).
- Bch1 es una proteína que presenta similitud a Bch1 de *S. cerevisiae* (necesaria en el transporte de Chs3, ver más adelante).

Actividad	Gen de <i>S. cerevisiae</i>	Gen de <i>S. pombe</i>	Región (aa')
QSI	CHS1	chs1 ⁺ (45%)	758
		chs2 ⁺ (29%)	650
QSII	CHS2	chs1 ⁺ (47%)	569
		chs2 ⁺ (32%)	643
QSIII	CHS3	chs1 ⁺ (28%)	223
		cfh1 ⁺ (26%)	553
	CHS4	cfh2 ⁺ (29%)	321
	cfh3 ⁺ (24%)	451	
	cfh4 ⁺ (33%)	151	
	CHS5	cfr1 ⁺ (32%)	585
	CHS6	bch1 ⁺ (23%)	162

Tabla I. Porcentaje de identidad entre las proteínas de *S. cerevisiae* y de *S. pombe* codificadas por los genes indicados.

Se indica la extensión, en aminoácidos, donde la identidad entre las proteínas es mayor.

2.5 Remodelación y degradación de la pared celular

La pared celular de *S. pombe* sufre una serie de cambios a lo largo de su ciclo de vida, lo que la convierte en un elemento muy dinámico, necesitando de procesos de remodelación y degradación continuos. Por este motivo, además de las 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.

Algunos de estas proteínas son las enzimas Gas que poseen actividad glucanosil-transferasa e intervienen en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento vegetativo, en la maduración de las ascosporas y en su viabilidad (de Medina-Redondo *et al.*, 2008; de Medina-Redondo *et al.*, 2010). La mayoría de estas enzimas implicadas en la síntesis y remodelación de la pared celular se localizan en la membrana plasmática o en la pared celular. Sin embargo, la proteína Exg3 localizada en el citoplasma posee actividad glucanásica y se encarga de la degradación del glucano en determinados momentos del ciclo celular de esta levadura (Dueñas-Santero *et al.*, 2010).

Mientras que en *S. cerevisiae* y en otros hongos se ha estudiado cómo se regula la síntesis de quitina, no se sabe prácticamente nada de cómo se regula la síntesis de glucano. De hecho, prácticamente los únicos reguladores de este proceso que se conocen hasta el momento son las GTPasas de la familia Rho y sus moduladores. En este trabajo se ha intentado conocer la implicación de algunas proteínas, potencialmente implicadas en el tráfico vesicular, y en la regulación de la síntesis del β -glucano. Para poder comprenderlo, pasamos a describir de forma general los mecanismos que constituyen el tráfico vesicular en las células eucariotas.

3. Visión general del tráfico intracelular de proteínas con dominios transmembranales

El sistema de endomembranas de las células eucariotas está formado por un conjunto de orgánulos que participan tanto en la ruta secretora como en la ruta endocítica. Estos son: el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, el sistema endosomal y los lisosomas en mamíferos o las vacuolas en levaduras y plantas. Aunque estos compartimentos celulares aparecen en todas las células eucariotas, se ha encontrado una gran variedad de adaptaciones en los distintos organismos [revisado en (Scott *et al.*, 2014)].

Todas las proteínas de secreción se insertan primero en el RE donde tiene lugar un complejo proceso de plegamiento y ensamblaje. A continuación, son transportadas al aparato de Golgi donde se procede a su correcta distribución hacia los distintos destinos celulares como la membrana plasmática (MP), los endosomas o las vacuolas. Como ya se ha mencionado anteriormente, muchas proteínas implicadas en la síntesis de la pared celular se localizan en la MP. La localización correcta de estas proteínas se controla a nivel del aparato de Golgi y de los endosomas, donde muchos eventos del transporte intracelular tienen lugar en respuesta a distintos estímulos (Scott & Gruenberg, 2010). De esta forma, los compartimentos secretores y endocíticos actúan de forma completamente coordinada en el complejo proceso del tráfico intracelular.

3.1 Teoría del transporte vesicular

George Palade estableció la teoría del tráfico intracelular en el año 1975 (Palade, 1975). Esta teoría postula que el transporte de proteínas entre los distintos orgánulos se produce a través de vesículas, que geman desde un compartimento de membrana donador y son transportadas hacia un compartimento receptor.

El transporte vesicular consta de una serie de pasos que de manera resumida serían los siguientes: concentración de los cargos en la membrana del compartimento donador, gemación de la vesícula, transporte de la misma a través del citoesqueleto, reconocimiento del compartimento aceptor y fusión con el mismo (Figura 4). En cada uno de los pasos actúan coordinadamente una serie de familias de proteínas con funciones específicas. A continuación, se resumen algunas de las características de las distintas familias de proteínas que intervienen en la ruta de secreción:

- **GTPasas** pequeñas o proteínas G, pertenecen a la superfamilia Ras y son las encargadas de coordinar todo el proceso de tráfico intracelular. Proteínas de esta familia, junto con una serie de lípidos específicos, determinan la formación de la vesícula. Estas proteínas alternan entre dos tipos de conformaciones; por un lado unidas a GTP o forma activa, y por otro, unidas a GDP o forma inactiva. La transición entre estos dos estados se produce debido a dos tipos de moduladores: los denominados GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) que promueven el intercambio de GDP por GTP, y los denominados GAP (*GTPase-Activating Proteins*) que facilitan la hidrólisis de GTP a GDP. Dentro de esta superfamilia existen tres familias importantes en el tráfico vesicular:

- GTPasas de la familia Rab (*RAs-relates in Brain*). Son los principales reguladores del tráfico intracelular, ya que participan en distintos procesos como formación, transporte y fusión vesicular. En *S. pombe* existen siete GTPasas Rab, muchas de ellas denominadas Ypt. En este organismo todas las GTPasas Rab producen un fenotipo detectable cuando el gen es eliminado del genoma como letalidad (Ypt1, Ypt2 e Ypt3), termosensibilidad (Rhy1), fragmentación de vacuolas (Ypt7), incremento del tamaño de las vacuolas (Ypt4) o acumulación de vesículas (Ypt5). Además, todas las GTPasas Rab de *S. pombe* están conservadas en otros organismos a excepción de Ypt4 (Pereira-

Leal & Seabra, 2001). Se sabe que estas proteínas suelen funcionar en cascadas, de manera que el reclutamiento de la primera, permite la unión y activación de la siguiente, favoreciendo la regulación de los distintos pasos en la maduración de la vesícula. Se sabe que la presencia de las GTPasas de esta familia en distintos compartimentos membranosos contribuye a la identidad de los mismos.

- GTPasas de la familia Arf (*ADP-Ribosylation Factor*). Participan en el reclutamiento de distintos efectores que intervienen en el tráfico vesicular, entre los que destacan las cubiertas vesiculares. La Arf Sar1 se encarga del reclutamiento de las cubiertas COPII, mientras que Arf1 recluta a cubiertas COPI y los adaptadores asociados a la clatrina [revisado en (Gillingham & Munro, 2007)].

- GTPasas de la familia Rho (*Ras HOMolog*). Entre otras funciones, son importantes en el establecimiento de la polaridad celular y en la regulación del citoesqueleto de actina. Una de estas proteínas es Cdc42, esencial y necesaria en muchos procesos, por ejemplo permitiendo que la secreción ocurra de manera polarizada al participar en el reclutamiento del exocisto [revisado en (Pérez & Rincón, 2010)].

• **Cubiertas vesiculares y adaptadores.** Las cubiertas median tanto la gemación de la propia vesícula desde la membrana del compartimento donador como la selección de los cargos que deben incorporarse a dicha vesícula. Aunque algunas proteínas poseen secuencias para interactuar directamente con la vesícula, normalmente esta interacción se produce a través de proteínas adaptadoras y/o receptores transmembranales que son las responsables de la especificidad del proceso de selección de los cargos [revisado en (Bonifacino & Glick, 2004)]. Ver más adelante.

• **Citoesqueleto y proteínas motoras.** La vesícula es transportada hasta el compartimento receptor mediante proteínas motoras que se desplazan a través de los componentes del citoesqueleto, tanto cables de actina como microtúbulos. Las proteínas motoras que se mueven sobre los cables de actina son las miosinas, mientras que las que se desplazan sobre los microtúbulos son las dineínas y las quinesinas (Anitei & Hoflack, 2011).

• **Factores amarra (*Tethering factors*) y de anclaje (SNAREs)**. Por último, la vesícula tiene que fusionarse con el compartimento receptor. Este proceso es bastante complejo por dos razones, por un lado requiere selectividad por parte del compartimento receptor, y por otro se necesita la maquinaria específica que favorezca un proceso termodinámicamente desfavorable como es la fusión de las membranas.

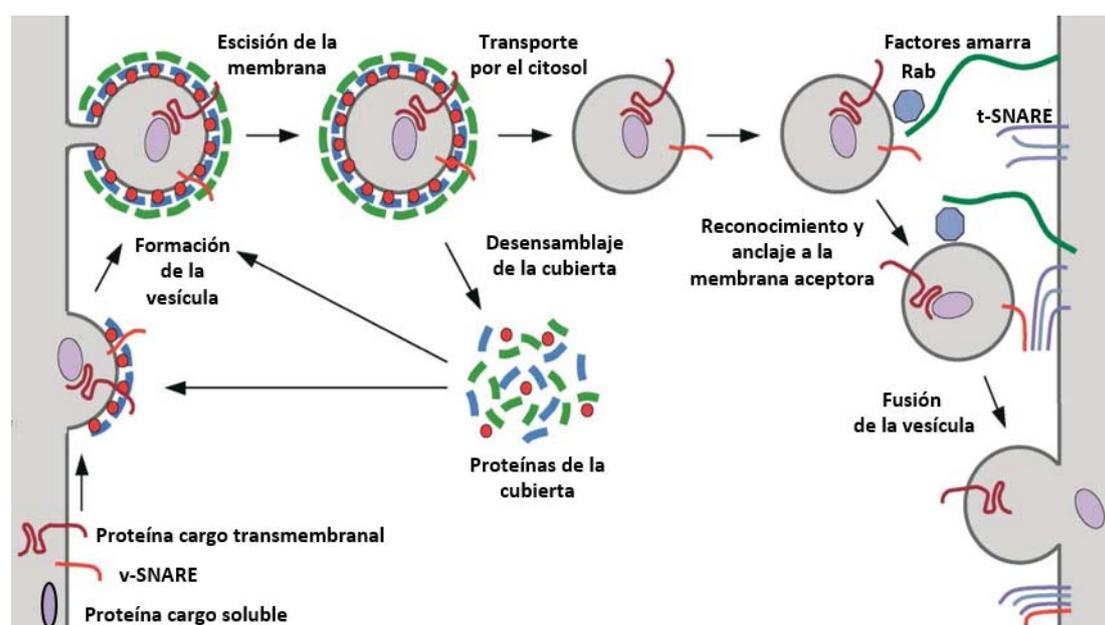


Figura 4. Diferentes pasos que sigue una vesícula desde su formación en la membrana del compartimento donador hasta su fusión con la membrana del compartimento receptor.

El proceso simplificado consiste en la formación de la vesícula mediante el reclutamiento de proteínas de la cubierta entorno 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 receptor que permiten el anclaje de ésta para facilitar la posterior fusión con la membrana de este compartimento a través de las proteínas de anclaje (SNAREs).

Figura adaptada de Bonifacino & Glick, 2004.

Para que la fusión de la vesícula a la membrana aceptora pueda completarse existen unos complejos denominados factores amarra (*Tethering factors*). Su misión es aproximar la vesícula a la membrana del compartimento receptor, de manera que se encargan del reconocimiento inicial de la vesícula. Estos factores son reclutados por GTPasas de la familia Rab, y además concentran a otros factores denominados SNAREs encargados de la fusión de la vesícula. Existen dos tipos de complejos amarra:

- Proteínas largas con múltiples hélices superenrolladas (dominios *colied-coil*): las primeras se describieron en el aparato de Golgi, por lo que se denominaron golginas.

Más recientemente se han encontrado algunas en los endosomas como el factor EEA1 (*Early Endosomal Antigen 1*).

- Complejos con múltiples subunidades o MTCs (*Multisubunit Tethering Complexes*), estos a su vez pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellos que participan en la fusión de membranas con orgánulos de la ruta de secreción, como son Dsl1, COG, GARP y el exocisto también denominados CATCHR (*Complexes Associated with Tethering Containing Helical Rods*) y aquellos que actúan en la ruta endosomal, que engloba CORVET y HOPS. Existe otro complejo denominado TRAPP (*TRANsport Protein Particle*) que combina el reconocimiento de la cubierta con el amarre de la vesícula y que no entraría en ninguna de las categorías anteriores [revisado en (Bröcker *et al.*, 2010; Yu & Hughson, 2010)].

La fusión de la vesícula con el compartimento receptor se produce gracias a pares específicos de proteínas transmembranales denominadas SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptors*). Inicialmente estas proteínas se clasificaron en función de su localización subcelular como v-SNARE, se localiza en la membrana de la vesícula, y t-SNARE se localiza en la membrana del compartimento aceptor. Sin embargo, muchas de estas proteínas pueden aparecer en ambas localizaciones y por ello se ha realizado una clasificación alternativa basada en la estructura cristalina del complejo SNARE. Dependiendo de si presenta una arginina (R) o tres glutaminas (Q) en la posición central de la cuarta hélice pasan a denominarse R-SNARE o Q-SNARE respectivamente. Muchas R-SNAREs actúan como v-SNAREs y muchas Q-SNAREs como t-SNAREs aunque existen algunas excepciones [revisado en (Hong & Lev, 2014)]. La energía que se libera en el proceso de unión de estas dos proteínas favorece la fusión de las dos membranas. Los complejos SNAREs formados se disocian por la acción de la AAA ATPasas NSF (*N-ethylmaleimide-Sensitive Factor*) y sus proteínas adaptadoras SNAPS (*Soluble NSF Attachment Protein*). Por lo que las SNAREs se reciclan para poder mediar otro nuevo evento de fusión (Risselada & Grubmüller, 2012). En *S. pombe*, se ha caracterizado el gen *syb1⁺/snc1⁺* que codifica una proteína v-SNARE similar a las sinaptobrevina (Edamatsu & Toyoshima, 2003), mientras que el gen *psy1⁺/sso1⁺* codifica una t-SNARE similar a la syntaxina (Nakamura *et al.*, 2009).

Por tanto, la perfecta coordinación del transporte vesicular depende del reconocimiento específico y de la captura de los cargos por las distintas cubiertas vesiculares, del reconocimiento de la vesícula por factores amarra y de la fusión de membranas mediada por las SNAREs. A su vez, la regulación de todos estos factores se debe a la acción de las distintas GTPasas. Estos mecanismos de transporte vesicular están conservados en todos los eucariotas.

La ruta de secreción puede dividirse en dos etapas desde un punto de vista funcional: una temprana y otra tardía. A continuación, se van a detallar dichas etapas.

4. Ruta de secreción temprana

Esta ruta se inicia en el RE. Es en este orgánulo donde se produce la inserción y el plegamiento de las proteínas transmembranales, además de su empaquetamiento en las distintas vesículas para ser transportadas a la cara *cis* del aparato de Golgi. El tráfico entre estos dos compartimentos celulares es bidireccional. Las cubiertas vesiculares denominadas COPII se encargan del transporte anterógrado, mientras que las cubiertas vesiculares COPI se encargan del transporte retrógrado desde el aparato de Golgi [revisado en (Barlowe & Miller, 2013)].

En el RE se produce la N-glicosilación inicial de las distintas proteínas. Este proceso es crucial en la secreción, debido a que influye en el plegamiento de las mismas, además de contribuir en los mecanismos de control de calidad del RE. Los residuos de azúcares unidos en este orgánulo estarán sujetos a distintos procesamientos en el aparato de Golgi, de ahí la complejidad del proceso.

4.1 Vesículas COPII (*COatmer Protein II*)

Las proteínas que salen del RE se concentran en unos dominios especializados de la membrana de este orgánulo denominados ERES (*Endoplasmic Reticulum Exit Sites*) o sitios transitorios del RE (tRE) (Spang, 2009a; Okamoto *et al.*, 2012). La GTPasa Sar1 pertenece a la familia Arf y va a ser la encargada del reclutamiento de todos los

componentes de la cubierta. Así, Sar1 se encuentra en el citosol en estado inactivo, y es reclutada a la membrana plasmática por su interacción con la proteína Sec12, GEF de esta GTPasa. La activación de Sar1 facilita la asociación del heterodímero Sec23/Sec24, quien reconoce de manera específica los cargos que van a ser transportados. A continuación, se recluta la capa externa de la cubierta formada por el heterotetrámero 2x Sec13/2x Sec31 (Jensen & Schekman, 2011). Otra proteína que juega un papel fundamental en este proceso es Sec16 necesaria en la estabilización del ensamblaje de esta cubierta, ya que actúa como andamio entre los distintos componentes de la misma en los ERES del RE (Whittle & Schwartz, 2010) (Figura 5A).

El reconocimiento entre las proteínas cargo y estas cubiertas vesiculares puede producirse de forma directa o mediada por receptores. Entre los receptores destaca la familia p24, que actúa como receptores de proteínas ancladas a GPI. La proteína Erv29 actúa como receptor de la carboxipeptidasa Y y Erv14 actúa como receptor de proteínas transmembranales dirigidas a la ruta de secreción [revisado en (Dancourt & Barlowe, 2010; Muñiz & Zurzolo, 2014)].

4.2 Vesículas COPI (*COatomer Protein I*)

El transporte retrógrado desde el RE es necesario para la recuperación de proteínas implicadas en el propio proceso de transporte desde el RE al Golgi que ciclan de forma continua entre estos dos orgánulos, así como en el transporte retrógrado dentro del aparato de Golgi (Hsu & Yang, 2009). El transporte retrógrado está mediado por las vesículas COPI. Las vesículas COPI y COPII no son iguales estructuralmente, aunque el proceso de ensamblaje de los distintos componentes que forman la cubierta vesicular es bastante parecido. En este caso la GTPasa necesaria en el reclutamiento es Arf1, que a su vez depende de los GEFs Gea1 y Gea2 para su activación. Arf1 activa se encarga del reclutamiento de un complejo heptamérico, el cual está formado por un complejo externo o COPI-B formado por las subunidades α , β' y ϵ (Ret1, Sec27 y Sec28 de levaduras) y un complejo interno o COPI-f formado por β , γ , δ y ζ (Sec26, Sec21, Ret2 y Ret3) (Gabriely *et al.*, 2007; Popoff *et al.*, 2011) (Figura 5B).

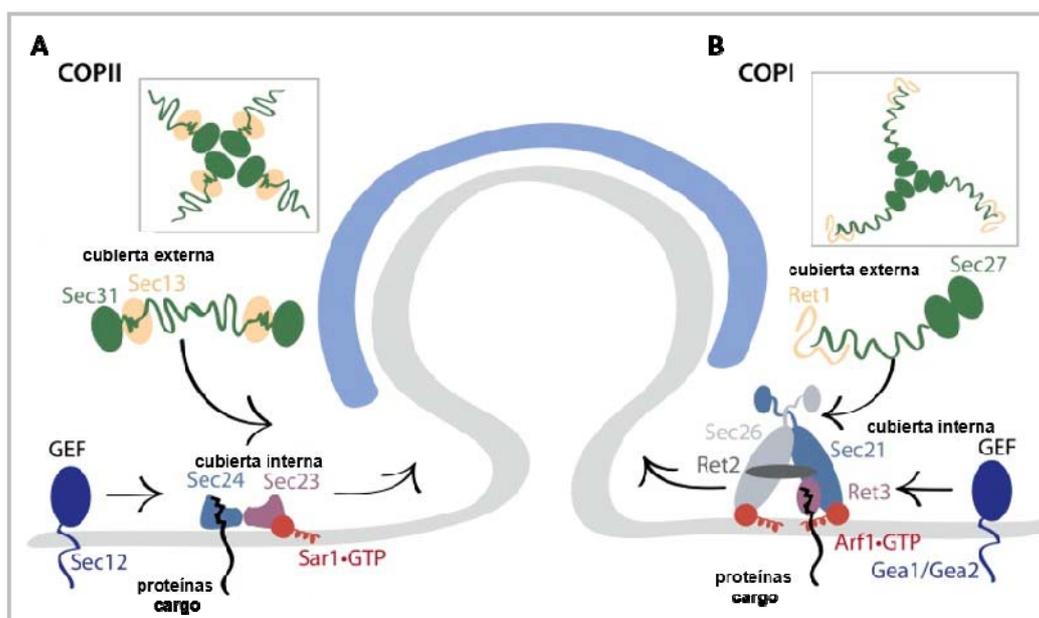


Figura 5. Formación de las cubiertas vesiculares COPII y COPI.

El ensamblaje de ambas cubiertas vesiculares COPII (A) y COPI (B) está mediado por GTPasas pequeñas de la familia Arf denominadas Sar1 y Arf1 respectivamente. En la cubierta vesicular COPII, Sar1 es activada por el correspondiente GEF denominado Sec12, el cual se localiza en la membrana del RE. Sar1-GTP activa recluta al dímero Sec23/Sec24 que constituye la capa interna de la vesícula y además posee la capacidad de unir a las proteínas cargo. A continuación, el heterotetrámero formado por 2x Sec31/2x Sec13 constituye la capa externa de la cubierta formando una estructura capaz de llevar a cabo la curvatura de la membrana. En el caso de la cubierta vesicular COPI, la GTPasa Arf1 se activa debido a la acción redundante de los dos GEFs denominados Gea1 y Gea2. Arf1-GTP activo recluta a la capa interna de la cubierta formada por las proteínas Sec21/Sec26/Ret2/ Ret3. A continuación, se reclutan las proteínas Sec27/Ret1/Sec28 para formar la capa externa de esta cubierta. Figura adaptada de Barlowe & Miller, 2013.

Las señales de reconocimiento entre las proteínas cargo y los receptores son muy variadas. El receptor KDEL o Erd2 (*ER retention defective 2*, homólogo en levaduras) reconoce proteínas solubles marcadas con el motivo KDEL (HDEL/ADEL en levaduras), para ser devueltas desde el aparato de Golgi hasta el RE (Lewis & Pelham, 1992). El retorno de proteínas de membrana en vesículas COPI se debe a un motivo di-lisina reconocido por Sec27 y Ret1, a un motivo di-arginina reconocido por Sec26 y Ret2 de COPI (Duden *et al.*, 1994; Eugster *et al.*, 2004), o a la presencia de una serie de residuos polares organizados específicamente en las hélices transmembranales de los cargos que son reconocidos por el receptor Rer1 (Sato *et al.*, 2003; Kaether *et al.*, 2007; Spasic *et al.*, 2007).

5. Ruta de secreción tardía

Una vez que las proteínas han salido del RE, pasan a formar parte de un sistema de endomembranas constituido por distintos orgánulos, entre los cuales existen complejas redes de transporte bidireccional. El aparato de Golgi constituye el principal centro de distribución de proteínas. Así, es en este orgánulo donde se produce la clasificación de las mismas para ser enviadas a la MP, a los endosomas y a las vacuolas o para ser devueltas al RE. Por otra parte, los endosomas constituyen un segundo centro de clasificación donde se decide si las proteínas procedentes del aparato de Golgi o de la MP han de ser degradadas vía vacuola, recicladas al aparato de Golgi o enviadas a la MP ([Figura 6](#)).

5.1 El aparato de Golgi y el sistema endosomal

El aparato de Golgi es el orgánulo receptor de las proteínas que proceden del RE. Su morfología varía entre los distintos organismos; este orgánulo está formado por un conjunto de cisternas de membrana dispersas por el citoplasma en *S. cerevisiae*, mientras que en *S. pombe* estas cisternas están apiladas unas con otras. A pesar de las diferencias en cuanto a su organización, el mecanismo relacionado con el tráfico de las distintas proteínas es bastante similar. Las proteínas de secreción entran por la cara *cis* del Golgi, progresan a través del Golgi *medial*, donde se modifica su estado de glicosilación. Finalmente salen por la cara *trans*, desde donde se produce su distribución a los distintos orgánulos [revisado en ([Suda & Nakano, 2012](#))].

El modelo más aceptado actualmente para explicar la maduración de la maquinaria de transporte a lo largo del aparato de Golgi es el modelo de la maduración cisternal. En este modelo, las cisternas son estructuras transitorias y son las proteínas cargo las que permanecen en la vesícula mientras la cisterna madura desde el *cis* al *trans* Golgi. Este proceso de maduración se basa en el transporte retrógrado de enzimas residentes en el aparato de Golgi, que es al menos en parte mediado por vesículas COPI. No obstante, el mecanismo que media la maduración de las cisternas no está claro, aunque el reclutamiento y la activación de una GTPasa podría desencadenar la

activación de una cascada de GEFs y GTPasas Rab que medien en el proceso (Losev *et al.*, 2006; Matsuura-Tokita *et al.*, 2006; Suda & Nakano, 2012).

El *trans* - Golgi network (TGN) es la zona del Golgi que actúa como verdadero centro de distribución de proteínas hacia el resto de orgánulos, pudiendo transportar las proteínas de vuelta hacia cisternas menos maduras, continuar la secreción hacia la MP o los endosomas, o bien enviar las proteínas hacia las vacuolas. Además, todos estos transportes pueden ser bidireccionales. Por tanto, es fundamental que las proteínas sean perfectamente clasificadas para que su destino final sea el correcto. En esta función participan fundamentalmente dos tipos de cubiertas vesiculares, la clatrina y el retrómero, así como una amplia variedad de adaptadores.

El fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) es el lípido mayoritario del aparato de Golgi distribuyéndose en un gradiente creciente desde las cisternas más tempranas del Golgi hacia el TGN. Este fosfoinosítido se genera por la fosforilación del fosfatidilinositol por la PI4P quinasa, Pik1, mientras que la fosfatasa Sac1 es la responsable de disminuir sus niveles [revisado en (Santiago-Tirado & Bretscher, 2011)]. El PI4P juega un papel importante en la regulación del transporte anterógrado mediante el reclutamiento de distintos efectores.

El sistema endosomal es una red dinámica e interconectada que permite el tráfico y la transferencia de los cargos entre los distintos compartimentos transmembranales. Las proteínas pueden llegar a los endosomas desde el aparato de Golgi o desde la MP, y a partir de los endosomas los cargos pueden ser reciclados a la MP, enviados al TGN por transporte retrógrado o liberados a las vacuolas para su degradación (Figura 6). La regulación de este sistema se basa en un amplio control tanto espacial como temporal.

Existen distintos tipos de endosomas dependiendo de la función que llevan a cabo. Los endosomas tempranos o EEs (*Early Endosomes*) se definieron como el primer compartimento en recibir los cargos (Helenius *et al.*, 1983); actualmente son considerados como el compartimento de clasificación de los cargos que llegan tanto del proceso de endocitosis (ver más adelante) como desde el Golgi. El proceso exacto por el que surgen los EEs no se conoce, pero inicialmente su membrana proviene de

varias vesículas procedentes de la endocitosis que se fusionan hasta alcanzar cierto tamaño. Tanto en plantas como en levaduras los endosomas participan activamente en las funciones de secreción. Además morfológicamente no se distinguen del TGN por lo que estos orgánulos pueden ser considerados conceptualmente como una prolongación del mismo [revisado en (Huotari & Helenius, 2011)]. A continuación, los EEs maduran a endosomas tardíos o LEs (*Late Endosomes*) para posteriormente formar los cuerpos multivesiculares o MVBs (*MultiVesicular Bodies*) los cuales se fusionarán a los lisosomas en mamíferos, o a las vacuolas en plantas y en levaduras, donde los cargos serán degradados (Spang, 2009b). En algunos organismos, como es el caso de plantas y levaduras, la distinción entre LE y MVB no está claramente definida; por ello se utiliza el término compartimento pre-vacuolar o PVC (*Pre-Vacuolar Compartment*) para englobar a ambos. Además, existen endosomas de reciclaje o REs (*Recycling Endosomes*) que reciben material desde los EEs y lo devuelven a la MP o al TGN (Hsu & Prekeris, 2010) (Figura 6).

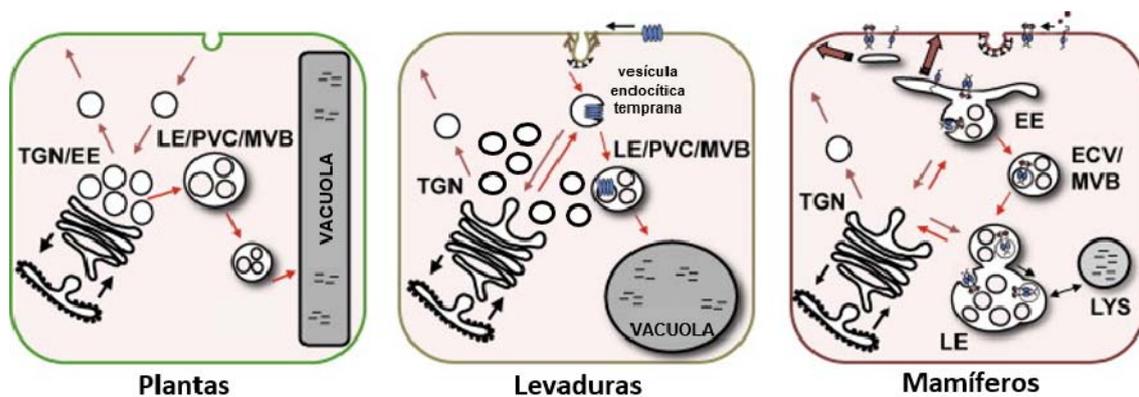


Figura 6. Semejanzas y diferencias en el sistema endosomal entre eucariotas.

Los distintos esquemas muestran una visión general de la organización del sistema de endomembranas en células de plantas (izquierda), levaduras (medio) y mamíferos (derecha). Existen una serie de peculiaridades a tener en cuenta: en plantas el TGN y los EEs forman parte del mismo compartimento, así como el hecho de que tanto en plantas como en levaduras exista un único compartimento entre los EEs y la vacuola denominado LE/PVC/MVB.

Abreviaturas: TGN o Golgi tardío; EE o endosoma temprano; LE o endosoma tardío; PVC o compartimento pre-vacuolar; MVB o cuerpo multivesicular; LYS o lisosoma.

Figura adaptada de Scott *et al.*, 2014.

El paso de EEs a LEs se produce a través de un proceso de maduración. En este proceso se produce una disminución del pH luminal, un cambio en la composición de los fosfoinosítidos regulado por quinasas y fosfatasas específicas, así como el reclutamiento y la activación de distintas GTPasas de la familia Rab [revisado en

(Huotari & Helenius, 2011)]. En EEs la GTPasa Rab5 (Vps21 o Ypt5 en levaduras) es un componente clave, junto con su efector Vps34 (Pik3 en *S. pombe*), una fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que genera fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) contribuyendo así a la identidad de este orgánulo. Este proceso de maduración involucra el cambio de la GTPasa Rab5 a Rab7 (Ypt7 en levaduras), así como una nueva fosforilación por la fosfatidilinositol 3-fosfato 5-quinasa (PI(3,5)K) PIKfyve (Fab1 en levaduras) que origina el fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (PI(3,5)P₂) característico, junto con la GTPasa Rab7, de los LEs [revisado en (Behnia & Munro, 2005)] .

5.2 Tráfico vesicular mediado por clatrina

5.2.1 Clatrina

Estructura de la clatrina

La cubierta que poseen las vesículas de clatrina o CCVs (*Clathrin-Coated Vesicles*) está compuesta por la propia clatrina y por un complejo adaptador. Existen distintos complejos adaptadores, que varían desde grandes adaptadores heterotetraméricos como los APs, hasta proteínas monoméricas como los GGAs o las epsinas (ver más adelante). Estas vesículas de clatrina regulan el tráfico entre distintos compartimentos celulares, jugando un papel fundamental en el transporte intracelular de proteínas y lípidos (Boehm & Bonifacino, 2001; Lafer, 2002; Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003) (Figura 7).

La unidad estructural de la clatrina se denomina trisquelión y está formada por un trímero de cadenas pesadas de clatrina (Chc1), que se unen de forma radial sobre un eje central; sobre cada una de estas cadenas pesadas se une una cadena ligera de clatrina (Clc1) (Kirchhausen & Harrison, 1981; Ungewickell & Branton, 1981). Cada uno de los tres brazos de los trisqueliones se pueden dividir en tres regiones diferentes: proximal siendo la más cercana al eje, distal o zona media y terminal correspondiente a la parte final. Aproximadamente 36 trisqueliones se ensamblan alrededor de la membrana correspondiente para formar la envuelta proteica de la vesícula (Fotin *et al.*, 2004). En esta estructura las cadenas ligeras quedan expuestas hacia el interior de

las vesículas, mientras que la región terminal de las cadenas pesadas queda libre para poder contactar con los diferentes adaptadores, así como con otras proteínas accesorias (Chu *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; Boettner *et al.*, 2011; Brodsky, 2012; Faini *et al.*, 2013) (Figuras 8A y 8B).

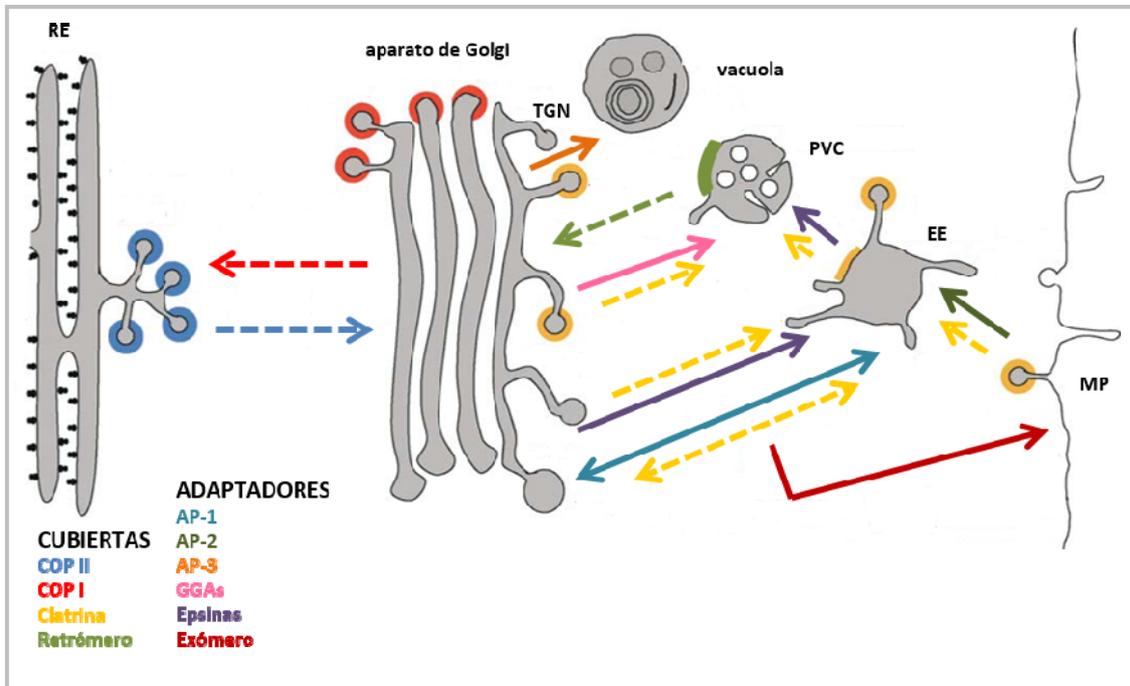


Figura 7. Cubiertas y adaptadores que intervienen en el tráfico vesicular.

Esquema de las cubiertas y adaptadores implicados en los distintos pasos del tráfico vesicular. Las flechas discontinuas muestran los pasos del tráfico donde intervienen las cubiertas vesiculares y las flechas continuas corresponden a los adaptadores vesiculares.

Abreviaturas: RE o retículo endoplasmático; TGN o Golgi tardío; EE o endosoma temprano; PVC o compartimento pre-vacuolar; MP o membrana plasmática.

Figura adaptada de Bonifacino & Glick, 2004.

Funciones de la clatrina

El papel principal de las vesículas de clatrina es participar en el transporte de proteínas y lípidos desde la membrana plasmática a los endosomas tempranos (endocitosis), así como el tráfico bidireccional entre el TGN y los endosomas (Weinberg & Drubin, 2012; Faini *et al.*, 2013).

En mamíferos Clc1 no es esencial, aunque es necesaria para la estabilidad de los trisqueliones (Ybe *et al.*, 2003; Ybe *et al.*, 2007). Además la delección, o la sobreexpresión, del gen *CLC1* sólo provoca un leve defecto en el proceso de endocitosis; sin embargo se producen diversos defectos del tráfico a nivel del TGN y los

endosomas (Huang *et al.*, 2004; Chen & Brodsky, 2005; Poupon *et al.*, 2008; Wilbur *et al.*, 2008). Estos resultados parecen indicar que la función de la clatrina es más importante en el proceso de secreción que en el proceso de endocitosis.

A lo largo de los años, se han realizado múltiples estudios de las CCVs en la levadura de gemación *S. cerevisiae*. Está descrito que la delección del gen *CHC1* provoca multitud de defectos, como crecimiento lento y morfología aberrante (Payne & Schekman, 1985; Lemmon & Jones, 1987). Sin embargo la ausencia del gen no es letal al no ser que las células presenten una segunda mutación en otro gen (Lemmon & Jones, 1987; Munn *et al.*, 1991). A pesar de presentar todos estos defectos, en el mutante *chc1Δ* algunas proteínas como la fosfatasa ácida o la invertasa se secretan de manera eficiente (Payne & Schekman, 1985; Payne *et al.*, 1987). Se sabe que mientras que Chc1 está bastante conservada, Clc1 es más divergente (Silviera *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2003). Aunque en *S. cerevisiae* la delección del gen *CHC1* o *CLC1* presenta fenotipos similares, el mutante *clc1Δ* es viable en todos los fondos genéticos estudiados (Silviera *et al.*, 1990; Chu *et al.*, 1996).

En la levadura de fisión *S. pombe* la delección del gen *clc1⁺* es letal, aunque esta letalidad es rescatada cuando las células se incuban en un medio estabilizado osmóticamente (de León *et al.*, 2013). Las células del mutante *clc1Δ* incubadas en presencia de sorbitol presentan múltiples defectos como crecimiento lento, morfología aberrante, incremento de tamaño, y defectos en el desarrollo sexual. Por lo tanto, en *S. pombe* la ausencia de Clc1 afecta a la estabilidad de Chc1 de forma mucho más drástica que lo que sucede en otros organismos. También está descrito que la letalidad del mutante *clc1Δ* se debe principalmente a defectos graves en la síntesis de la pared celular de la levadura de fisión (de León *et al.*, 2013).

5.2.2 Adaptadores de clatrina

La clatrina carece de dominios de unión a las membranas, por lo que necesita a los distintos adaptadores para su reclutamiento desde el citoplasma y para mediar la interacción con el cargo. Como se ha mencionado anteriormente, existen distintos

tipos de adaptadores que varían tanto en su estructura como en los distintos procesos en los que intervienen (Hirst & Robinson, 1998).

Complejos Adaptadores (APs)

Los complejos adaptadores o APs (*Assembly Polypeptides*) son heterotetrámeros que median el tráfico intracelular tanto en el proceso de endocitosis como en el proceso de secreción (Park & Guo, 2014).

En mamíferos, hasta el momento, se conocen cinco complejos APs diferentes: AP-1, AP-2 y AP-3 muestran interacción directa con la clatrina, mientras que para AP-4 y AP-5 no se ha encontrado dicha interacción. Estos cinco complejos APs se localizan en distintos compartimentos como la MP, el TGN y los endosomas, mediando el tráfico vesicular entre ellos (Boehm & Bonifacino, 2001; Robinson & Bonifacino, 2001; Hirst *et al.*, 2011; Park & Guo, 2014). En levaduras solamente se conocen tres de estos complejos denominados AP-1, AP-2 y AP-3.

Como ya se ha mencionado estos complejos son heterotetrámeros, formados por dos subunidades mayores denominadas genéricamente adaptinas (una subunidad $\alpha/\delta/\gamma/\epsilon$ o ζ y una subunidad β 1-5), que tiene un peso comprendido entre los 70-100 kDa; una subunidad mediana (μ 1-5) de unos 50 kDa, y una subunidad pequeña (σ 1-5), de unos 20 kDa (Boehm & Bonifacino, 2001; Robinson & Bonifacino, 2001) (**Figura 8B**). Las subunidades análogas de los distintos complejos APs poseen una homología a nivel aminoacídico del 21 al 90%. De modo general, las subunidades de los distintos complejos no son intercambiables entre sí; aunque existen algunas excepciones, como es el caso de las subunidades β 1 y β 2 de mamíferos y las subunidades híbridas β /2 de algunos invertebrados, que pueden formar parte tanto del complejo AP-1 como del complejo AP-2 (Boehm & Bonifacino, 2001).

Todos los complejos APs presentan la misma estructura. Las regiones amino terminales de las adaptinas forman un núcleo donde se unen además las subunidades mediana y pequeña, mientras que las regiones carboxilo terminales forman unos apéndices (también llamados orejas) 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 a la región terminal de las cadenas pesadas de la clatrina, a través de dominios específicos de unión a clatrina (*Clathrin box*) (Fotin *et al.*, 2004; Brodsky, 2012; Paczkowski *et al.*, 2015) (Figura 8B). La subunidad μ es la encargada de la interacción del complejo adaptador e interacciona con algunos cargos y la subunidad σ tiene un papel estabilizador en la estructura del complejo y también interacciona con algunos cargos (Paczkowski *et al.*, 2015) (Figura 8C).

En *S. cerevisiae* solamente se ha visto interacción física de la clatrina con el adaptador AP-1, y no con los otros dos adaptadores AP-2 y AP-3 (Yeung *et al.*, 1999; Lemmon & Traub, 2000). En el caso de *S. pombe* sí que se ha detectado interacción física de AP-2 con la clatrina (de León *et al.*, 2016).

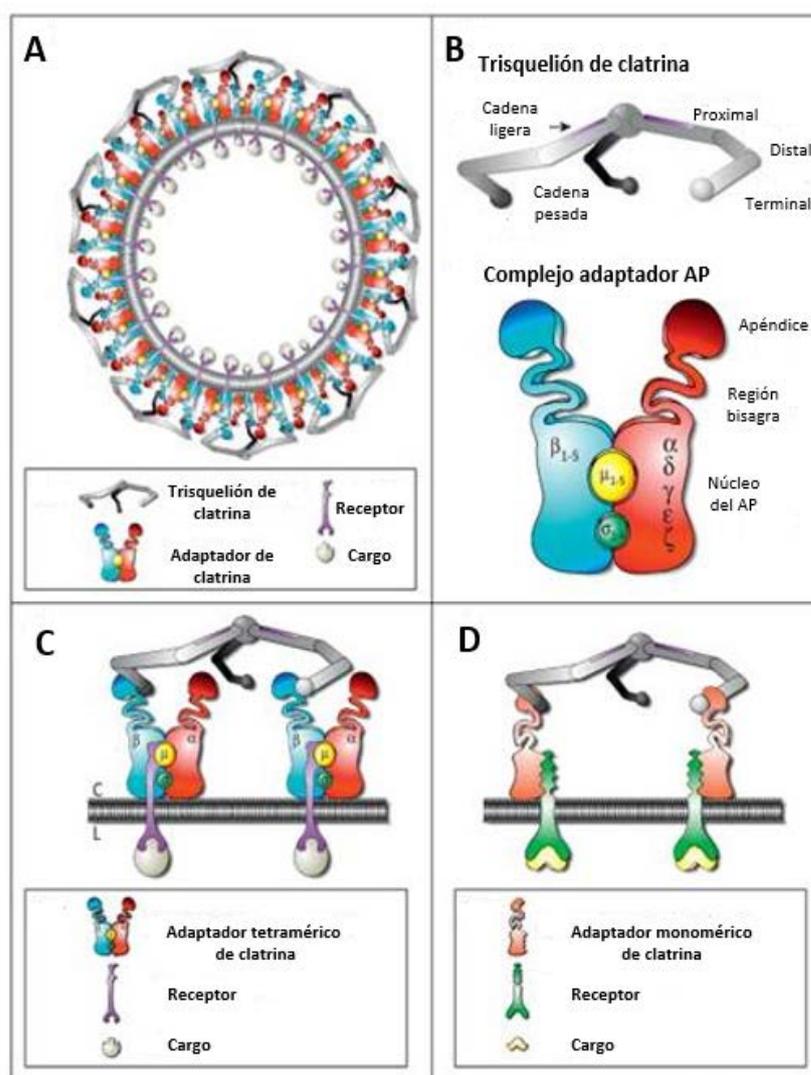


Figura 8. Arquitectura molecular de las vesículas de clatrina (CCVs).

A. La sección transversal de una CCV muestra que la capa más externa está formada por los trisqueliones de clatrina que se asocian a su vez a los adaptadores, en este caso tipo APs, los cuales interaccionan tanto con la clatrina como con el cargo en la membrana.

B. Estructura de un trisquelión de clatrina y de un adaptador tetramérico denominado complejo AP.

C. Interacción entre el trisquelión de clatrina, adaptadores tetraméricos denominados APs y el cargo.

D. Interacción entre el trisquelión de clatrina, adaptadores monoméricos como los GGAs o las proteínas tipo epsinas y el cargo.

Figura adaptada de Robinson & Pimpl, 2013.

A continuación se describe la localización y la función, y algunas peculiaridades de los complejos APs:

El complejo **AP-1** está formado por una adaptina γ o Apl4 y otra β 1 o Apl2, una subunidad mediana μ 1 denominada Apm1 y una subunidad pequeña σ 1 denominada Aps1 (Boehm & Bonifacino, 2001). Está descrito que este adaptador regula el tráfico bidireccional entre el TGN y los endosomas tempranos (Wang *et al.*, 2003; Touz *et al.*, 2004).

Este complejo AP-1 en mamíferos participa en el transporte del receptor de la manosa 6-fosfato (MPR) entre TGN y endosomas; también está implicado en el transporte de distintas proteínas de membrana desde el aparato de Golgi o desde los endosomas hasta la MP basolateral de las células epiteliales (Boehm & Bonifacino, 2002; Bonifacino, 2014).

En *S. cerevisiae* diferentes mutaciones en los componentes del complejo AP-1 producen letalidad sintética con mutaciones en el gen *CHC1*, pero por sí mismas sólo originan un pequeño defecto en el procesamiento de la feromona factor α (Boehm & Bonifacino, 2001). Además AP-1 es necesario para el reciclaje de distintas proteínas entre los endosomas y el aparato de Golgi, como son las proteasas Kex2 (Ha *et al.*, 2003) y Ste13 (Foote & Nothwehr, 2006), la t-SNARE Tlg1 (Yeung & Payne, 2001), la enzima QS Chs3 (Valdivia *et al.*, 2002; Sacristán *et al.*, 2013) y la permeasa general de aminoácidos Gap1 (O'Donnell *et al.*, 2010), así como de la proteína necesaria en el proceso de conjugación Fus1 (Barfield *et al.*, 2009). También es necesario para el transporte de la translocasa de fosfolípidos Drs2 desde el TGN a los endosomas, siendo a su vez esta proteína necesaria para el funcionamiento del complejo AP-1 (Liu *et al.*, 2008). En ausencia de algunos de los componentes del complejo AP-1 estas proteínas aparecen deslocalizadas en la MP o en la vacuola, en lugar de ser retenidas de forma eficiente en TGN/EEs.

En *S. pombe*, la ausencia de alguna de las subunidades del complejo AP-1 provoca fenotipos mucho más severos, como sensibilidad térmica y defectos en citocinesis, en la integridad de la pared celular, en la fusión de vacuolas y en la secreción de diversas enzimas (Kita *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las células del mutante *apm1 Δ*

presentan alteraciones morfológicas en el aparato de Golgi. En estos mutantes se deslocalizan algunas proteínas como la v-SNARE Syb1 que desaparece de los sitios de secreción polarizada quedando retenida en vesículas a nivel del TGN/EEs, lo que demuestra la importancia que tiene el complejo AP-1 en el tráfico vesicular a este nivel (Kita *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2009). Además se ha descrito que este complejo es necesario en el transporte de la enzima β GS Bgs1 hasta la superficie celular, así como para la localización de algunas GTPasas como Rho3 (Kita *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013).

El complejo **AP-2** es el adaptador mejor caracterizado de la familia de los APs. En este complejo las adaptinas α y β 2 se denominan Apl3 y Apl1 respectivamente, la subunidad mediana (μ 2) Apm4 y la subunidad pequeña (σ 2) Aps2 (Yeung *et al.*, 1999). Este adaptador se localiza en la MP, ya que juega un importante papel en la endocitosis mediada por clatrina (Boehm & Bonifacino, 2001).

En mamíferos existen numerosos estudios donde se pone de manifiesto la importancia que presenta el adaptador AP-2 en el proceso de endocitosis. Este adaptador, junto con otros adaptadores endocíticos, es fundamental para la formación de las vesículas sinápticas en las neuronas (Robinson, 2004; Kim *et al.*, 2013). Interviene en la endocitosis mediada por clatrina del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), del receptor de LDL (*Low Density Lipoprotein*) y del virus de la gripe, entre muchos otros (Motley *et al.*, 2003; Lakadamyali *et al.*, 2006; Maurer & Cooper, 2006; Goh *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae*, al igual que ocurre en otros organismos, el complejo AP-2 se localiza en lugares de endocitosis activa (Kaksonen *et al.*, 2005). Se ha descrito recientemente que en la levadura de gemación Apm4 interacciona físicamente con el sensor de estrés Mid2, y que mutantes del complejo AP-2 presentan defectos de polaridad y una mayor sensibilidad a la toxina *killer* K28 (Carroll *et al.*, 2009; Chapa-y-Lazo *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la ausencia de la subunidad mayor α del complejo AP-2, impide la formación de este complejo adaptador (Yeung *et al.*, 1999). Sin embargo, no se ha encontrado interacción física entre este adaptador y la clatrina

ni una alteración en la dinámica de los parches endocíticos cuando falta la subunidad β del complejo (Yeung *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 2009).

En *S. pombe*, a diferencia de lo que sucede en la levadura de gemación, la subunidad α del complejo AP-2 interacciona físicamente con la cadena ligera de la clatrina (de León *et al.*, 2016). Además en ausencia de Apl3 la dinámica de los parches endocíticos está alterada, por lo que se produce un defecto en la endocitosis y en la polaridad celular. Así mismo en mutantes del complejo AP-2 disminuye la actividad de las enzimas β GS, apareciendo daños en la pared celular (de León *et al.*, 2016).

El último de los complejos APs conocidos en levaduras es **AP-3**. En este caso, sus adaptinas δ y β 3 se denominan Apl6 y Apl5, mientras que Apm3 y Aps5 corresponden a las subunidades μ 3 y σ 3, respectivamente. El complejo AP-3 está relacionado con el transporte desde el TGN a las vacuolas.

En *S. cerevisiae*, la ruta mediada por este complejo adaptador va desde el TGN hasta las vacuolas de forma directa, es decir, sin pasar por los endosomas; esta ruta también se denomina ALP, ya que se descubrió al analizar el tráfico de la proteína fosfatasa alcalina o ALP (*Alkaline Phosphatase*). Este transporte, que requiere el complejo adaptador AP-3, sin embargo es independiente de clatrina. Otras de las proteínas que siguen esta ruta de transporte son la SNARE Vam3, la quinasa de la caseína Yck3 y Ncr1 localizadas en las membranas de las vacuolas (Anand *et al.*, 2009). Estudios realizados en mamíferos han demostrado la interacción de este adaptador con clatrina y su importancia en el tráfico de proteínas destinadas a los lisosomas (Robinson, 2004; Dell'Angelica, 2009).

GGAs

Los GGAs (*Golgi-localized, Gamma-ear-containing, Arf-binding proteins*) son adaptadores monoméricos que se identificaron inicialmente en base a su similitud con la secuencia del dominio *ear* carboxilo terminal (apéndice u oreja) del complejo AP-1. Se sabe que estos adaptadores regulan el tráfico intracelular desde el TGN hacia

LEs/PVC. Se han identificado tres GGAs en mamíferos, denominados *GGA1*, *GGA2* y *GGA3*, mientras que en levaduras solo se conocen dos, denominados *GGA1* y *GGA2* en *S. cerevisiae* y *gga21⁺* y *gga22⁺* en *S. pombe* debido a que presentan mayor similitud con el *GGA2* de la levadura de gemación (Boehm & Bonifacino, 2001).

Todos los GGAs presentan la misma estructura. En las regiones amino terminales se encuentra el dominio VHS (Vps27, Hrs, STAM) con una zona de reconocimiento del motivo di-leucina (Misra *et al.*, 2002), seguido de un dominio GAT (GGA y TOM) que presenta un sitio de unión con la GTPasa Arf1 (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2001) y otro sitio de unión para la ubiquitina (Scott *et al.*, 2004; Shiba *et al.*, 2004), y un dominio GAE (*Gamma-Adaptin Ear*) en las regiones carboxilo terminales que permite la unión con otras proteínas accesorias como γ -sinergina (Page *et al.*, 1999), p56 (Lui *et al.*, 2003), epsinR o Ent3 y Ent5 en levaduras (Hirst *et al.*, 2003) y rabaptina5 (Shiba *et al.*, 2002). Los dominios GAT y GAE están separados por una amplia región con zonas de unión a la clatrina (Bonifacino 2004) (Figura 8D).

En mamíferos, las proteínas GGA son esenciales para el transporte de hidrolasas lisosomales y de sus receptores (Hirst *et al.*, 2012). Además muestran relación funcional con el complejo AP-1 en el transporte entre el TGN y los EEs; la relación funcional entre estos adaptadores (AP-1 y GGAs) no está clara, porque parecen actuar en la misma ruta según algunos datos y en rutas paralelas según otros (Doray *et al.*, 2002; Hirst *et al.*, 2012).

En *S. cerevisiae*, la delección conjunta de *GGA1* y *GGA2* causa alteraciones drásticas a nivel del tráfico post-Golgi (Hirst *et al.*, 2000; Black & Pelham, 2000; Costaguta *et al.*, 2001; Zhdankina *et al.*, 2001). En los mutantes dobles *gga1 Δ gga2 Δ* se produce defecto en el tráfico de algunas proteasas vacuolares como la carboxipeptidasa Y (CPY) que es una proteína soluble (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Zhdankina *et al.*, 2001) y la carboxipeptidasa S (CPS) que es una proteína transmembranal (Costaguta *et al.*, 2001), así como defectos en el tráfico de la v-SNARE Pep12, que en ausencia de los GGAs se localiza en la superficie celular (Black & Pelham, 2000). Sin embargo la zona de actuación de los GGAs debe ser más amplia debido a que co-localizan y presentan interacción física y genética con proteínas implicadas en la ruta de transporte entre el

TGN y los EEs. En ausencia de los GGAs se produce defecto en la localización de la proteasa Kex2, necesaria para la correcta secreción del factor α (Costaguta *et al.*, 2001). Además los GGAs están implicados en la retención de algunas proteínas transmembranales, entre ellas Chs3, en el TGN/EEs. Finalmente la delección de estos adaptadores provoca un defecto en la localización de la sinaptobrevina (Snc1) en la MP, indicando una alteración a nivel de los EEs (Black & Pelham, 2000; Costaguta *et al.*, 2001; Copic *et al.*, 2007).

Proteínas de tipo epsina

Las proteínas con homología a las epsinas son otra clase de adaptadores monoméricos de las vesículas cubiertas por clatrina (**figura 8D**). En mamíferos existen también varias denominadas epsin1, epsin2, epsin3, epsin4 y epsinR. En *S. cerevisiae* se han descrito cuatro proteínas de tipo epsinas denominadas Ent1, Ent2, Ent3 y Ent5,

EpsinR de mamíferos está formada por un dominio ENTH (*Epsin N-Terminal Homology*) en su extremo amino terminal y un dominio largo sin ningún tipo de plegamiento (Owen *et al.*, 2004). El dominio ENTH es necesario no solo para la unión con el cargo sino también para la unión con el PI4P en el TGN favoreciendo la deformación de la membrana (Ford *et al.*, 2002). El dominio largo es necesario para la interacción con otros adaptadores de clatrina como AP-1 y GGAs, pudiendo colaborar con estos en las funciones de tráfico vesicular (Owen *et al.*, 2004). Está descrito que epsinR regula el tráfico de varios SNAREs como Vti1 entre el TGN, los endosomas y los lisosomas (Chidambaram *et al.*, 2004; Hirst *et al.*, 2004; Chidambaram *et al.*, 2008).

En levaduras, Ent1 y Ent2 son necesarias para la endocitosis de moléculas que poseen señales de ubiquitinación, como sucede con el receptor Ste2 (Reider & Wendland, 2011). Ent3 y Ent5, por su parte, son proteínas que intervienen en procesos de tráfico desde el TGN a los endosomas y a las vacuolas (Duncan *et al.*, 2003; Costaguta *et al.*, 2006; Copic *et al.*, 2007). El dominio ENTH de Ent5 posee múltiples residuos básicos que son importantes para la unión a los fosfoinosítidos de la membrana, estos residuos no se han encontrado en Ent3. Además Ent5, pero no Ent3, posee dominios de unión a la clatrina. Sin embargo, Ent1 y Ent2 poseen dominios de

unión a ubiquitina así como múltiples copias del motivo de unión al complejo AP-2, característico de proteínas con dominio ENTH endocítico y no encontrado en las otras dos proteínas de tipo epsinas (De Camilli *et al.*, 2002).

Se sabe que en *S. cerevisiae*, Ent3 y Ent5 actúan en paralelo con AP-1 para mediar la retención intracelular de la QS Chs3 (Copic *et al.*, 2007). Además, Ent3 pero no Ent5 facilita la unión de GGA2 con la v-SNARE Pep12 y la clatrina (Copic *et al.*, 2007).

5.2.3 Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es un proceso muy conservado desde levaduras a humanos. Este proceso constituye la mayor ruta de internalización de proteínas y de lípidos desde la superficie celular y está altamente regulado. La endocitosis mediada por clatrina puede dividirse en los siguientes pasos (Figura 9):

- Reclutamiento de proteínas tempranas: estas proteínas se unen al PI(4,5)P₂ de la membrana, marcando los sitios de formación de la vesícula. En levaduras, las proteínas tempranas son Ede1 (proteína con homología a Eps15) y Syp1 (proteína con dominios F-BAR/ μ 2) (Reider *et al.*, 2009; Stimpson *et al.*, 2009). Ede1 es importante para el reclutamiento de otras proteínas más tardías y Syp1 es necesaria para la formación de parches de actina de forma polarizada. Syp1 es esencial en las células de mamíferos (Henne *et al.*, 2010) pero no en el caso de las levaduras.
- Formación de la cubierta: junto con las proteínas tempranas se van a reclutar distintos adaptadores que son necesarios para la unión de la clatrina, componente principal de la cubierta vesicular. El complejo adaptador AP-2 es el principal adaptador de la endocitosis en las células de mamíferos. En *S. cerevisiae*, este complejo no es esencial para el proceso, aunque es importante para la endocitosis de algunos cargos (Carroll *et al.*, 2009). En esta levadura las proteínas tipo epsinas Ent1 y Ent2 y las proteínas Yap1801/2 (AP180) son los principales adaptadores que permiten el ensamblaje de la cubierta de clatrina (Maldonado-Báez *et al.*, 2008). A continuación la cubierta madura por el reclutamiento de una serie de proteínas como Sla1, que favorece la unión de los cargos, y Sla2/End4 con dominios específicos de unión al

PI(4,5)P₂ de la membrana, constituyendo las denominadas cubiertas intermedia y tardía, y que van a permitir la unión de los Factores Promotores de la Nucleación o NPFs (*Nucleation Promoting Factors*) de actina (Moseley & Goode, 2006; Boettner *et al.*, 2012). Sla2/End4 se unen a la actina y a la cadena ligera de la clatrina permitiendo la invaginación de la membrana (Boettner *et al.*, 2011).

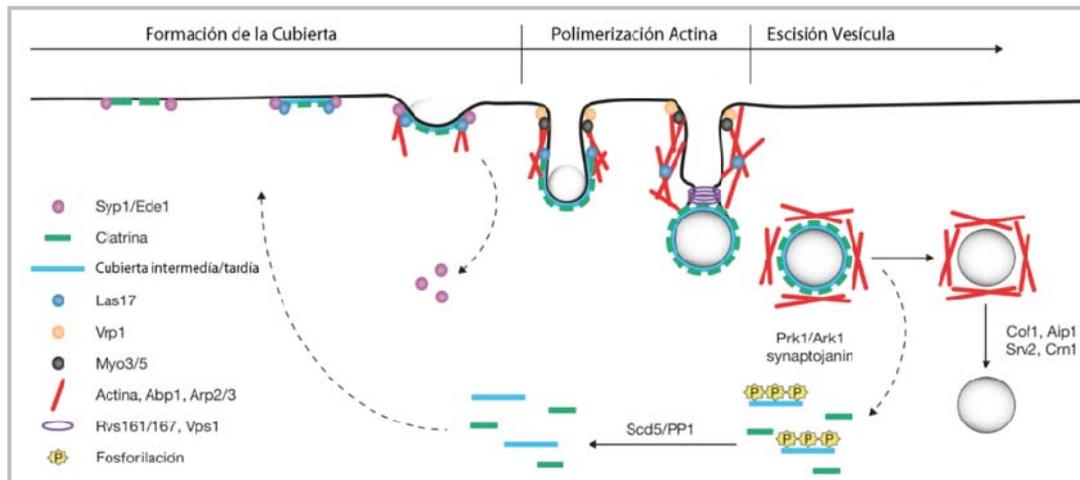


Figura 9. Modelo molecular para la endocitosis dependiente de clatrina, actina y miosinas tipo I.

La unión de las proteínas tempranas Syp1/Ede1 a la MP determina el ensamblaje de la cubierta cuyo componente principal es la clatrina. A continuación, la polimerización de la actina ejerce la fuerza necesaria para producir la invaginación de la membrana que se escindirá por la acción de las anfifisinas Rvs161 y Rvs167. Finalmente, la cubierta de clatrina va a fosforilarse lo que determina su desensamblaje de la vesícula. La posterior desfosforilación de los factores de la cubierta permitirá su reclutamiento en un nuevo evento endocítico.

Figura adaptada de Boettner *et al.*, 2012.

- Ensamblaje y polimerización de la actina: una vez formada la cubierta se ensambla una red ramificada de actina, que va a producir la fuerza necesaria para que se produzca la invaginación de la membrana. El ensamblaje de la actina se inicia con el reclutamiento de los NPFs. En *S. cerevisiae* se conocen cinco NPFs diferentes: Pan1 (proteína con homología a Eps15), Las17 (miembro de la familia WASP), Myo3 y Myo5 (miembros de la familia MYO), y la proteína Abp1, 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). Este conjunto de proteínas se mantiene asociado a la membrana y promueven la actividad del complejo Arp2/3. Este complejo es el responsable de la nucleación de la actina. De tal forma que el ensamblaje de los filamentos de actina ramificados, junto con la fuerza motora de las miosinas, empuja y deforma la membrana produciendo su invaginación (Boettner *et al.*, 2012).

- Escisión de la vesícula: para que la vesícula se escinda, las membranas de la base de la vesícula tienen que acercarse. En *S. cerevisiae* las anfifisinas Rvs161 y Rvs167 tienen la capacidad de tubular vesículas; también se piensa que la dinamina Vps1 puede tener algún papel en la liberación de la vesícula (Boettner *et al.*, 2012). Sin embargo, en el caso de *S. pombe* parece que las proteínas con dominios F-BAR Cdc15 y Bzz1 son las encargadas de la escisión de la vesícula (Arasada & Pollard, 2011). En este proceso es fundamental la acción de las fosfatasas del PI(4,5)P₂ denominadas Slj1 y Slj2 o sinaptojaininas. La base de la vesícula está cubierta por proteínas que carecen de dominios de unión a PI(4,5)P₂, y por tanto va a estar desprotegida de la acción de las fosfatasas. La hidrólisis de este lípido va a crear una serie de tensiones que deforman esta región, favoreciendo la acción de las anfifisinas (Liu *et al.*, 2009). Tras la escisión de la vesícula, todos los PI(4,5)P₂ son hidrolizados promoviendo el desensamblaje de la maquinaria de endocitosis.

Regulación de la endocitosis

La ubiquitinación es la principal señal que marca a una proteína para ser endocitada. Esta modificación se lleva a cabo por una ubiquitín ligasa, junto con una serie de adaptadores, incluyendo las arrestinas que se han descrito recientemente (Lauwers *et al.*, 2010; MacGurn *et al.*, 2012). Las proteínas diana pueden ser ubiquitinadas con una molécula de ubiquitina en una lisina (mono-ubiquitinación) o una molécula de ubiquitina en varias lisinas (multi-mono-ubiquitinación). Alternativamente, moléculas de ubiquitina pueden unirse unas con otras formando cadenas, en las que cada monómero está unido a su vez a una lisina del motivo anterior (poli-ubiquitinación). La mono-ubiquitinación promueve la endocitosis de la proteína, mientras que la poli-ubiquitinación marca a la proteína para ser enviada hacia las vacuolas. En otros casos este código determina el reciclaje de proteínas hacia el TGN (Lauwers *et al.*, 2010; MacGurn *et al.*, 2012).

La maquinaria endocítica parece reconocer a los cargos ubiquitinados debido a unos dominios de unión a ubiquitina o UBDs (*Ubiquitin-Binding Domains*), presentes en la propia maquinaria que permite reclutar a los cargos para su internalización.

Además la propia ubiquitinación permitiría la estabilización del complejo endocítico (interacción proteína - proteína), debido a la presencia de residuos ubiquitinables en las proteínas que forman parte de este complejo (Weinberg & Drubin, 2012).

Las vesículas generadas en el proceso de endocitosis pierden la cubierta y de esta manera ya podrían fusionarse generando los denominados endosomas tempranos, desde los cuales puede producirse el reciclaje de la proteína hacia el TGN, hacia la MP o bien su degradación mediante su transporte a las vacuolas.

5.2.4 Secreción mediada por clatrina

Como ya se ha mencionado antes el TGN es un centro de distribución de proteínas y lípidos hacia los distintos destinos celulares. El tráfico desde el TGN está mediado fundamentalmente por CCVs hacia los endosomas tempranos. En este paso es fundamental la función de los adaptadores de clatrina, siendo el papel del complejo AP-1 el mejor caracterizado, aunque las proteínas GGAs y las proteínas tipo epsinas Ent3 y Ent5 también parecen participar en este proceso. En los últimos años han aparecido una serie de estudios tratando de explicar cómo se produce este proceso de secreción.

La formación de la vesícula se produce en el TGN debido a la llegada de la GTPasa Arf1, que como ya se ha mencionado, es necesaria para el reclutamiento de los componentes de las CCVs, y de la proteína quinasa Pik1 que se encarga de la síntesis del PI4P. La presencia de Arf1 y la mayor cantidad de PI4P favorecen la llegada de los distintos adaptadores en dos olas coordinadas en el tiempo. En primer lugar se recluta Gga2; esto a su vez produce el reclutamiento de más Pik1, que produce una mayor cantidad de PI4P, que a su vez este promueve el ensamblaje de AP-1 en la membrana del TGN (Daboussi *et al.*, 2012). Además Gga2 interacciona con Ent3, que se une a SNAREs que marcarán la membrana de destino con la que se fusionará la vesícula. AP-1 interacciona con Ent5, que posee un dominio autorregulador encargado de la separación temporal de estas dos olas (Hung *et al.*, 2012). El ensamblaje de Gga2 y AP-1 está separado espacial y temporalmente, asegurándose así la formación en el TGN

de distintas clases de CCVs que se dirigirán a los distintos destinos celulares en función del adaptador de dicha vesícula (Guo *et al.*, 2014).

5.3 Tráfico vesicular independiente de clatrina

5.3.1 El exómero

El término exómero hace referencia a un conjunto de proteínas que se ha propuesto que llevan a cabo el transporte de proteínas transmembranales desde el TGN hasta la MP de los lugares de crecimiento polarizado. Hasta el momento, solamente se ha descrito en la levadura de gemación *S. cerevisiae* (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), aunque existen genes con similitud a sus componentes en todos los hongos y levaduras analizados (Roncero *et al.*, 2016). Al principio se propuso que era una cubierta vesicular por su capacidad de unirse a membranas *in vitro*, aunque no era capaz de deformarlas (Wang *et al.*, 2006). Este tema siempre ha sido bastante controvertido porque a medida que se ha avanzado en su conocimiento se ha pasado a considerar un adaptador. Sin embargo, el hecho de que recientemente se haya visto que uno de sus componentes tiene capacidad de vesicular membranas (Paczkowski & Fromme, 2014) sugiere que presenta características tanto de cubierta como de adaptador.

El exómero está formado por la proteína Chs5 y una familia de proteínas denominadas ChAPs (*Chs5-and-Arf-binding Proteins*) que incluye a Chs6, Bud7, Bch1 y Bch2, siendo Bch1 la más antigua (Ziman *et al.*, 1998; Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Roncero *et al.*, 2016). Se sabe que Chs5 co-localiza con la proteasa Kex2 (Santos & Snyder, 1997), proteína que marca el TGN/EEs, siendo esta localización independiente de las ChAPs. A su vez las distintas ChAPs también aparecen localizadas, al menos parcialmente, en la zona del TGN (Trautwein *et al.*, 2006).

La formación del exómero es jerárquica, ya que el reclutamiento de las ChAPs a la membrana depende del autoensamblaje de Chs5 (Trautwein *et al.*, 2006). Los 250 aminoácidos correspondientes a la región N-terminal de la proteína Chs5 incluyen

desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal: un motivo de dimerización de Chs5, una α -hélice por la que Chs5 se une a las ChAPs, y dos motivos (FN3 Y BRCT) consecutivos, que son necesarios para la interacción de Chs5 con Arf1 (Martín-García *et al.*, 2011; Paczkowski *et al.*, 2012) (Figura 10A). Esta zona N-terminal (módulo FBE) es necesaria y suficiente para que la proteína Chs5 se localice en el TGN y sea capaz de llevar a cabo su función, debido a que el resto de la proteína es dispensable (Martín-García *et al.*, 2011). La presencia de motivos FN3 (*FibroNectin type III*) y BRCT (*BR*east *C*ancer *C*-*T*erminal) en una proteína del aparato de Golgi es llamativa, ya que los primeros suelen aparecer en proteínas implicadas en el proceso de unión a la superficie celular y su presencia es rara en levaduras (Bateman & Chothia, 1996); y los motivos BRCT participan en procesos de daño al ADN (Zhang *et al.*, 1998; Huyton *et al.*, 2000) y suelen estar en proteínas nucleares.

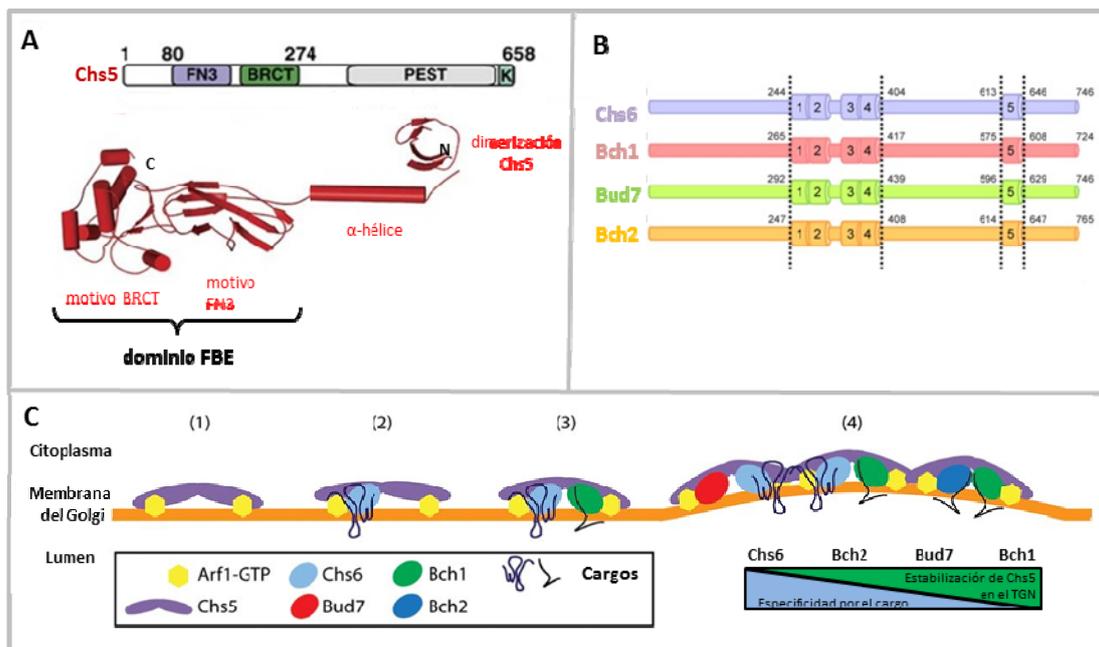


Figura 10. Estructura y modelo de ensamblaje de los componentes del exómero de *S. cerevisiae*.

A. Estructura de la proteína Chs5 con los dominios y motivos identificados (parte superior). Diagrama de la estructura del extremo amino terminal de la proteína Chs5 (1-299) indicando los cuatro motivos estructurales de los que consta (parte inferior).

Figura adaptada de Paczkowski *et al.*, 2012.

B. Estructura de las proteínas ChAPs (Chs6, Bch1, Bud7 y Bch2). Los números indican el primero y el último aminoácido de los dominios TPR.

Figura adaptada de Rockenbauch *et al.*, 2012.

C. Modelo del ensamblaje del complejo del exómero: (1) Chs5 y Arf1 inician la formación del complejo. (2) Chs6 comienza el reclutamiento para la formación de un complejo intermedio. (3) La unión de Bch1 favorece la estabilización del complejo en la membrana del aparato de Golgi. (4) Arf1, el exómero y el cargo forman un complejo que produce la deformación de la membrana. El diagrama de la derecha muestra las diferentes propiedades de las ChAPs en cuanto a especificidad por el cargo y a estabilización de la proteína Chs5 en la membrana del TGN.

Figura adaptada de Huranova *et al.*, 2006.

Las ChAPs poseen en su estructura cinco dominios denominados TPR (*Tetrapeptide Repeat*), cuatro de ellos situados en la zona central y uno más en el extremo C-terminal (**Figura 10B**). Estos TRPs son dominios de interacción proteína - proteína y cada repetición consiste en un motivo de 34 aminoácidos con la capacidad de formar grupos con múltiples repeticiones (Blatch & Lassle, 1999; Zhang *et al.*, 2010). Los dominios TPR1-4 son necesarios para la interacción con Chs5 y otras ChAPs, así como para la localización en el Golgi, probablemente por la interacción con Chs5. El dominio TPR5 es necesario para el reclutamiento eficiente de las ChAPs en el TGN (Rockenbauch *et al.*, 2012). Además, se ha propuesto que las ChAPs son las responsables de la interacción con las proteínas cargo, y por tanto de la especificidad, debido a que la delección de cada una de las ChAPs, o combinaciones de ellas, produce defectos celulares específicos. La ausencia de Chs6 produce un defecto en la síntesis de quitina (Ziman *et al.*, 1998); la ausencia de Bud7 origina un defecto en polaridad (Zahner *et al.*, 1996); la ausencia de Bch1 produce sensibilidad a temperaturas bajas y a concentraciones de amonio altas en el medio de cultivo (Trautwein *et al.*, 2006), y la ausencia de Bch2 no produce ningún fenotipo aparente (Trautwein *et al.*, 2006). La ausencia conjunta de Bch1 y Bud7 produce también defecto en la síntesis de quitina, similar al del mutante *chs6Δ*. Mientras que en ausencia de Chs5 debido a su función estructural se producen todos los fenotipos anteriores.

El exómero es un heterotetrámero, formado por dos copias de la proteína Chs5 y dos copias de las ChAPs que son reclutadas desde el citosol a la membrana del TGN por la GTPasa Arf1 (Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Paczkowski & Fromme, 2014). En un primer paso la GTPasa Arf1, en estado activo, junto con un dímero de Chs5 inician la formación del proceso; a continuación una de las ChAPs (Chs6), se une para formar un complejo intermedio al que se une Bch1, y finalmente el complejo se estabiliza con la incorporación del resto de las ChAPs en la membrana. Recientemente se ha descrito que, mientras que Bch1 posee una gran capacidad para estabilizar a Chs5 en el TGN, la proteína Chs6 tiene una mayor afinidad para el reconocimiento de los cargos, de manera que la función de todas las ChAPs no sería exactamente la misma dentro del complejo (Huranova *et al.*, 2016) (**Figura 11C**). También mencionar que entre las distintas interacciones con otros componentes del tráfico vesicular se

sabe que el exómero presenta interacción física con el complejo adaptador AP-1 (Sanchatjate & Schekman, 2006), pero no con la propia clatrina (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006).

Hasta el momento solamente se conocen tres cargos de este complejo, pero pueden existir más. El cargo mejor caracterizado es la enzima QS Chs3, perteneciente a la familia 2 de QS (Roncero *et al.*, 2016). Esta enzima es la responsable de la síntesis de quitina en el anillo del cuello entre la células madre e hija y en la pared celular. De hecho, los genes *CHS5* y *CHS6* se identificaron inicialmente por su defecto en la síntesis de quitina (Santos *et al.*, 1997; Bulawa, 1993) ya que en su ausencia la enzima queda retenida en TGN y EEs (Santos & Snyder, 1997; Valdivia *et al.*, 2002). Fus1 es una proteína de membrana necesaria para la fusión celular que también se transporta hasta la MP por el exómero en respuesta a feromonas (Santos *et al.*, 1997; Santos & Snyder, 2003; Barfield *et al.*, 2009). El último de los cargos descritos ha sido Pin2 (Ritz *et al.*, 2014), una proteína que presenta un dominio con similitud con los priones.

5.3.2 El retrómero

El retrómero es una cubierta implicada en el tráfico y recuperación de proteínas desde el PVC/LEs hacia el TGN (Seaman, 2005), que está conservada en levaduras y en mamíferos (Collins, 2008). En *S. cerevisiae* el retrómero está formado por dos subcomplejos, un heterotrímero formado por las proteínas Vps26, Vps29 y Vps35, y un heterodímero pequeño formado por las proteínas Vps5 y Vps17, que son dos proteínas de la familia SNX (*Sorting NeXin*). Las SNXs median la deformación de la membrana endosomal, mientras que el heterotrímero se encarga del reconocimiento del cargo. El ensamblaje de todas estas proteínas está mediado por la activación de la GTPasa Rab Ypt7 (Balderhaar *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Se conocen distintos adaptadores que se asocian al retrómero para el reconocimiento de algunos cargos. Por ejemplo, Snx3 participa en la recuperación del complejo transportador de hierro Frt1-Fet3 (Strochlic *et al.*, 2008). Otras proteínas cargos del retrómero son Kex2, Yif1 y la dipeptidil aminotransferasa (DPAP A) (Collins,

2008; Stochlic *et al.*, 2008). En las células animales participa recuperando el receptor de la manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-MPI) (Arighi *et al.*, 2004).

Las vesículas procedentes del PVC se dirigen hacia el TGN, donde van a ser reconocidas por el complejo amarra GARP (*Golgi-Associated Retrograde Protein*). GARP está formado por Vps51-Vps52-Vps53-Vps54, y es reclutado por la GTPasa Rab Ypt6 (Bonifacino & Hierro, 2011; Cullen & Korswagem, 2011; McGough & Cullen, 2011).

Tanto en *S. pombe* como en *S. cerevisiae* Vps26, Vps29 y Vps35 son las encargadas del transporte retrógrado del receptor Vps10 desde el PVC hasta el aparato de Golgi. Vps10 es un receptor encargado del reconocimiento de algunas proteínas que tienen que ser transportadas a las vacuolas, entre ellas la carboxipeptidasa Y (Bowers & Stevens, 2005; Iwaki *et al.*, 2006). En *S. pombe* Vps17 y Vps5 son necesarias en el proceso de esporulación (Koga *et al.*, 2004).

5.4 Degradación de proteínas transmembranales

El último paso en la vida de las proteínas de membrana es su degradación en las vacuolas. Las proteínas que provienen de la ruta endocítica son transportadas desde los endosomas tempranos al PCV, desde donde se dirigen a las vacuolas. Además, algunas proteínas son transportadas de manera directa desde el TGN a las vacuolas, sin pasar por la ruta endosomal. Algunas de estas rutas también llevan a cabo el tráfico de proteínas que deben ejercer su función en las vacuolas, como es el caso de algunas proteasas.

- Ruta endocítica hasta las vacuolas/los lisosomas

En *Saccharomyces* Vps21/Ypt5 (homóloga de Rab5 en mamíferos) es una GTPasa implicada en la regulación de la dinámica de los endosomas tempranos, mientras que en el caso de endosomas tardíos y vacuolas es Ypt7 (homóloga de Rab7 en mamíferos) la proteína que se encarga de su regulación (Spang, 2009b). La presencia de estas

proteínas contribuye a la identidad de cada orgánulo, de manera que el paso de una GTPasa a otra determina la maduración del endosoma desde temprano a tardío. Vps21/Ypt5 recluta al complejo CORVET (*class C core Vacuole/Endosome Tethering*) para promover la fusión de los endosomas con vesículas derivadas del aparato de Golgi (Bröcker *et al.*, 2010; Epp *et al.*, 2011). El complejo CORVET también es el encargado de reclutar al GEF de Ypt7, para promover el paso de endosoma temprano a endosoma tardío. A continuación Ypt7 activo recluta a su efector, el complejo HOPS (*HOmotypic fusion and vacuole Protein Sorting*), para finalmente fusionar el endosoma tardío con las vacuolas [revisado en (Solinger & Spang, 2013)].

Mediante microscopía electrónica se ha observado que el endosoma tardío muestra un conjunto de vesículas intraluminales o ILVs (*IntraLuminal Vesicles*) que forman el MVB (Prescianotto-Baschong & Riezman, 1998). Estas vesículas son el resultado de la internalización de proteínas transmembranales en el lumen del endosoma tardío, proceso que precisa de una maquinaria especializada denominada ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) formada por cinco subcomplejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y Vps4. Una vez formado, el MVB se fusionará con las vacuolas para que las ILVs y su contenido sean degradados por las proteasas vacuolares [revisado en (Henne *et al.*, 2011; Rusten *et al.*, 2012)].

- Ruta Cpy1

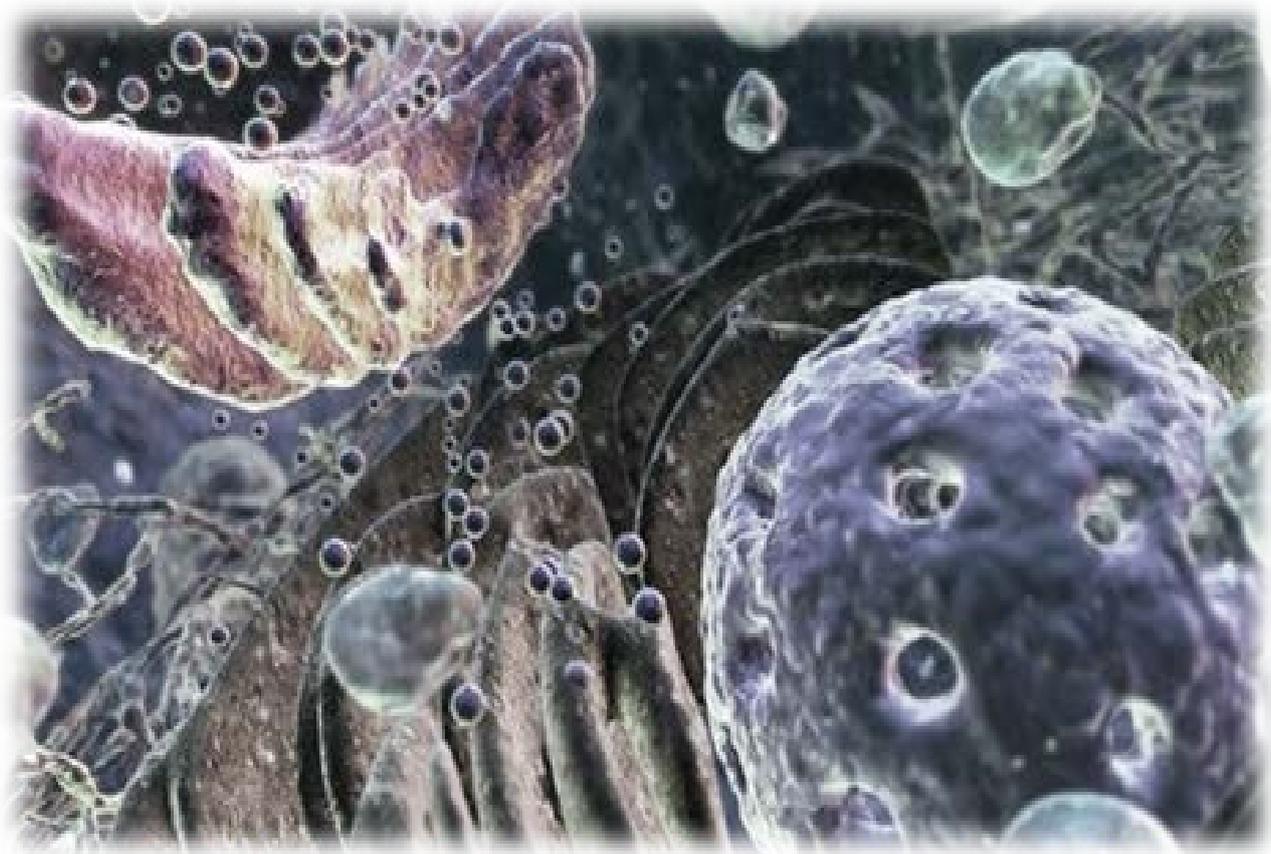
En esta ruta las proteínas van desde el TGN hasta las vacuolas pasando por el PVC. Se denomina así debido a que la carboxipeptidasa Y (Cpy1) fue el primer cargo que se describió. Cpy1 se sintetiza en el RE y viaja hasta el TGN, donde es reconocida por el receptor Vps10. Después el complejo formado es transportado hasta el PVC por las CCVs, actuando los GGAs como proteínas adaptadoras. Una vez que ha llegado al endosoma tardío Vps10 se disocia del cargo, y es reciclado hasta el TGN por el retrómero. Además Cpy1 es también sustrato del complejo ESCRT, siendo internalizado en el MVB para posteriormente ser activada mediante hidrólisis en las vacuolas. Existen otras proteínas que son transportadas a través de esta ruta como

Kex2, Ste13, Dap2, Vph1, PrA y PrB (Bowers & Stevens, 2005; Conibear & Stevens, 1998).

- Ruta AP-3 o ALP

Esta ruta va directamente desde el TGN hasta las vacuolas y debe su nombre a la fosfatasa alcalina (ALP). Esta proteína es capaz de llegar a la vacuola en mutantes Vps (*Vacuolar protein sorting*), en los que el paso desde el MVB hasta las vacuolas está bloqueado. En este transporte es necesario el complejo adaptador AP-3, siendo independiente de clatrina. Otras proteínas que siguen esta ruta son la SNARE Vam3, la quinasa de la caseína Yck3 y Ncr1 (Anand *et al.*, 2009).

Antecedentes y Objetivo



A pesar de su relevancia biológica, uno de los pasos menos conocidos del proceso de secreción es el transporte vesicular entre el Golgi y la membrana plasmática (Spang, 2015). Como ya se ha mencionado en la introducción, el exómero es un complejo de proteínas descrito en *S. cerevisiae* necesario para el transporte de ciertas proteínas transmembranales desde el TGN a la superficie celular. Aunque de momento este complejo solo se ha descrito en la levadura de gemación (Sanchatjate y Scheckman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), en otras levaduras existen proteínas similares tanto a Chs5 como a las ChAPs (Roncero *et al.*, 2016).

Aunque en *S. pombe* existen dos proteínas con similitud a enzimas QS, éstas son similares a las enzimas de la Familia1, que no se regulan por el exómero, pero no a las enzimas de la Familia2, a la que pertenece Chs3 (Roncero *et al.*, 2016). Tampoco hay proteínas similares a Fus1, ya que aunque en la levadura de fisión hay un gen denominado *fus1⁺* éste codifica una formina, ni a Pin2. Estos datos sugieren que podría haber otros cargos del exómero conservados en ambas levaduras, o que el exómero podría tener una función general conservada en el tráfico vesicular que en *S. cerevisiae* habría evolucionado para adaptarse a la regulación de la síntesis de quitina. Dado que en *S. pombe* la síntesis de quitina no juega un papel relevante durante el ciclo vegetativo, esta levadura es un buen sistema para analizar las posibles funciones conservadas del exómero.

Estudios previos en el laboratorio determinaron que Cfr1 es una proteína de *S. pombe* que posee similitud de secuencia y estructura con Chs5 de *S. cerevisiae*. En este estudio se describió un ligero defecto en el proceso de fusión celular durante el proceso de conjugación en el mutante *cfr1Δ*, pero no se encontró ninguna alteración evidente durante el crecimiento vegetativo. Además, también se observó que esta proteína se localizaba como puntos discretos en el citoplasma que co-localizaban con la proteína Gma12 y que desaparecían tras el tratamiento con Brefeldina A (una droga que inhibe la actividad de la GTPasa Arf1 y por tanto el tráfico a través del Golgi), determinándose así que Cfr1 se localizaba en el aparato de Golgi (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006). También se sabe que en ambas proteínas (Cfr1 de *S. pombe* y Chs5 de *S. cerevisiae*) el dominio FBE constituye un módulo necesario para la localización, y que el módulo FBE de Cfr1 se localiza en el Golgi en *S. cerevisiae* pero no es capaz de

Antecedentes y Objetivo

promover el reclutamiento de Chs6 al aparato de Golgi, ni por tanto la síntesis de quitina, sugiriendo que la interacción entre los componentes del exómero es específica de cada organismo (Martín-García *et al.*, 2011) (Figura 11). Además en el genoma de *S. pombe* hay un gen (SPBC31F10.16) que codifica una proteína que presenta similitud a las ChAPs y posee dominios TPR que hemos denominado *bch1*⁺.

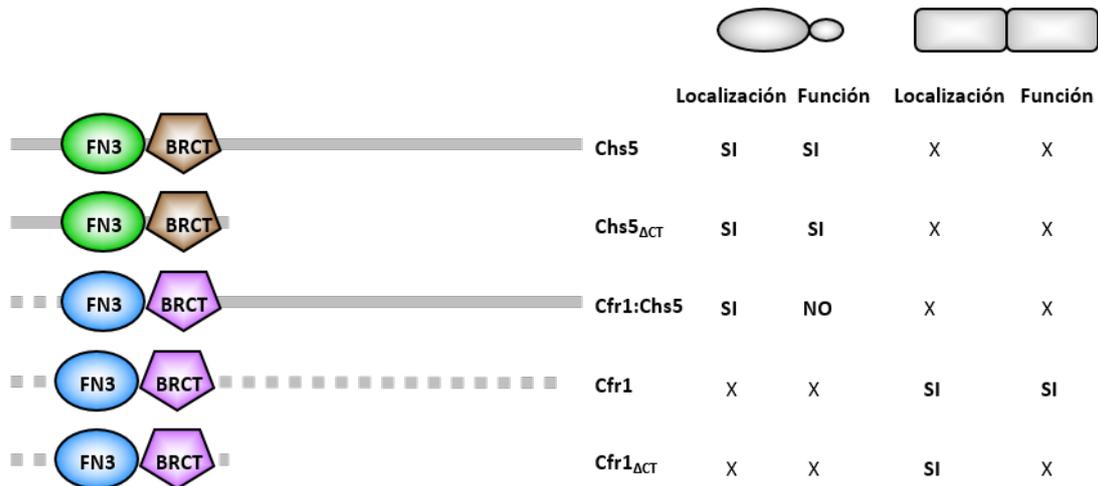


Figura 11. El módulo FBE formado por los motivos FN3 y BRCT de Cfr1 se localiza en el aparato de Golgi de *S. cerevisiae*.

Esquema de la proteína Chs5 de *S. cerevisiae*, de una forma truncada de Chs5 sin el extremo carboxilo terminal (Chs5_{ΔCT}), de una quimera formada por la parte amino de la proteína Cfr1 de *S. pombe* (motivos FN3 y BRCT) y la parte carboxilo de Chs5 (Cfr1:Chs5), de la proteína Cfr1 y de una forma truncada Cfr1 sin el extremo carboxilo terminal (Cfr1_{ΔCT}) indicando si son necesarios para la localización y la función de la proteína en *S. cerevisiae* o en *S. pombe*.

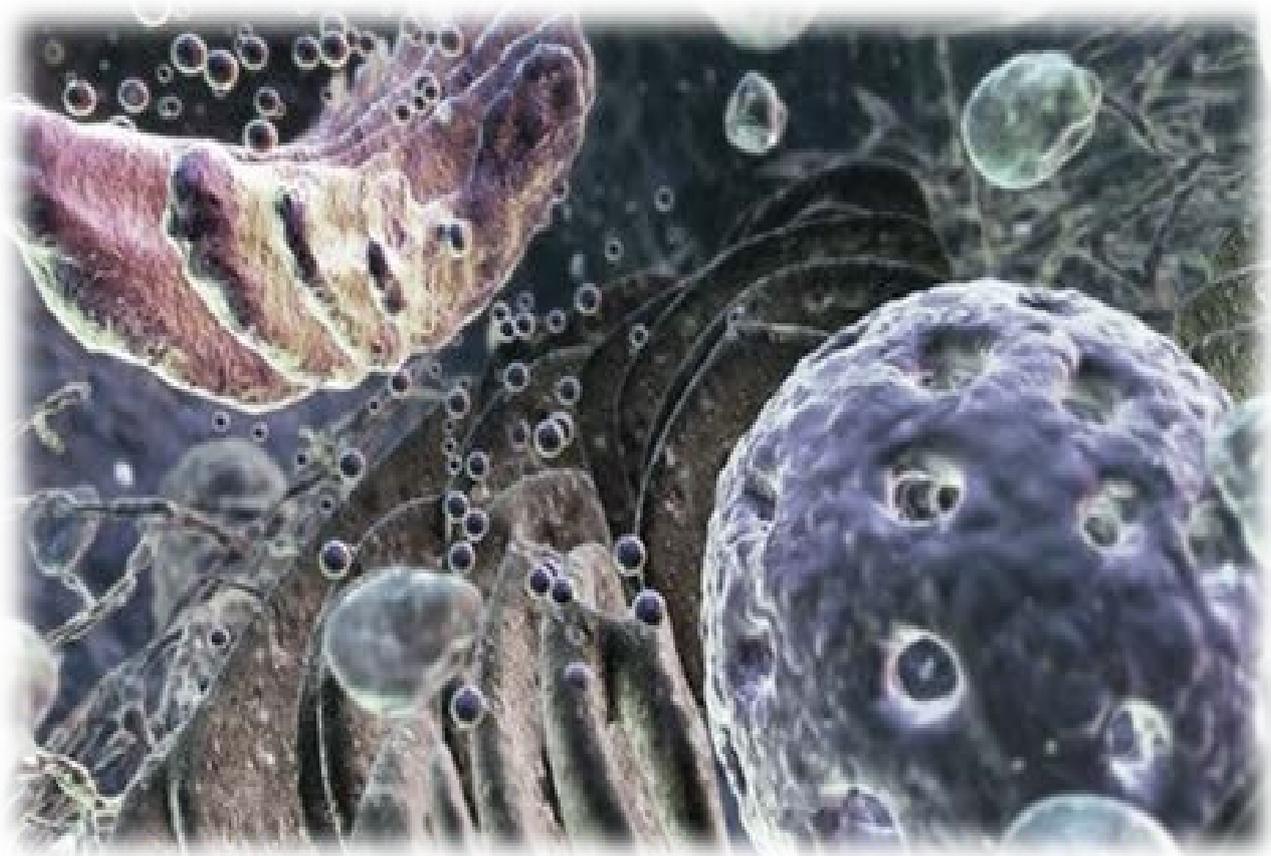
Figura adaptada de Martín-García *et al.*, 2011.

El OBJETIVO de esta Tesis Doctoral ha sido:

En base a toda esta información, el objetivo general de este trabajo ha sido caracterizar en más detalle las proteínas Cfr1 y Bch1 de *S. pombe* para:

- Analizar si forman un complejo similar al exómero.
- Analizar si participan en el tráfico vesicular.
- Determinar la posible función conservada del exómero.

Resultados



1. Fenotipos del mutante *cfr1Δ* en el ciclo vegetativo

Como punto de partida para la realización de este trabajo se volvió a analizar la existencia de fenotipos en el mutante nulo *cfr1Δ* durante el crecimiento vegetativo. Los análisis realizados fueron:

- Análisis del crecimiento en condiciones de estrés.

En un trabajo anterior, realizado en el laboratorio, se encontró que la función del gen *cfh3⁺* es más necesaria en condiciones de estrés que en condiciones de crecimiento estándar; Cfh3 es un regulador de la síntesis del $\beta(1,3)$ -glucano en *S. pombe* cuya secuencia es similar a la del gen *CHS4* de *S. cerevisiae* (Sharifmoghadam & Valdivieso, 2009). Este resultado podría indicar que los genes de la levadura de fisión con similitud a los genes *CHS* de *S. cerevisiae* podían ser especialmente relevantes en estas condiciones. Para saber si esto ocurría en el mutante *cfr1Δ*, se cultivaron la cepa silvestre y el mutante *cfr1Δ* en medio rico (YES) o en YES con KCl 0,6 M durante 16 horas a 28°C. Después las células se tiñeron con calcoflúor para observar su pared celular y su morfología en detalle; también se tiñeron con Hoechst para observar tanto la distribución de los núcleos como la pared celular. Como se observa en la **figura 12A**, y de acuerdo con lo que se había descrito (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006), las células del mutante cultivadas en condiciones estándar de laboratorio (medio YES, 32°C) no presentaban ninguna diferencia morfológica con las de la cepa silvestre. Sin embargo las células del mutante *cfr1Δ* cultivadas en presencia de KCl presentaban una mayor fluorescencia en la zona del septo de división que se correspondía con la presencia de más de un septo y de septos aberrantes, los cuales parecían estar en distintos estadios de formación; además estas células presentaban también engrosamientos en la pared celular lateral (indicados con flechas amarillas en la figura correspondiente). Las células de la cepa WT no presentaban ninguno de estos fenotipos en presencia de KCl. Además se comparó la sensibilidad de un mutante *cfr1Δ* a distintos agentes estresantes con la de una cepa WT y con la de los mutantes *cfh3Δ*, *cps1-191* (que porta una mutación puntual en el gen de la enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa *bgs1⁺*) y *spm1Δ* (mutante nulo de la quinasa de la ruta de integridad celular que es sensible a estrés) (Zaitsevskaya-Carter & Cooper, 1997). Como se observa en la **figura 12B**, a 28°C el

mutante *cfr1Δ* era incluso más sensible que el mutante *cfh3Δ* a la presencia de KCl y de cafeína en el medio de cultivo. A su vez, el mutante *cfr1Δ* era ligeramente resistente a calcoflúor, como lo eran los mutantes *cfh3Δ* y *spm1Δ*.

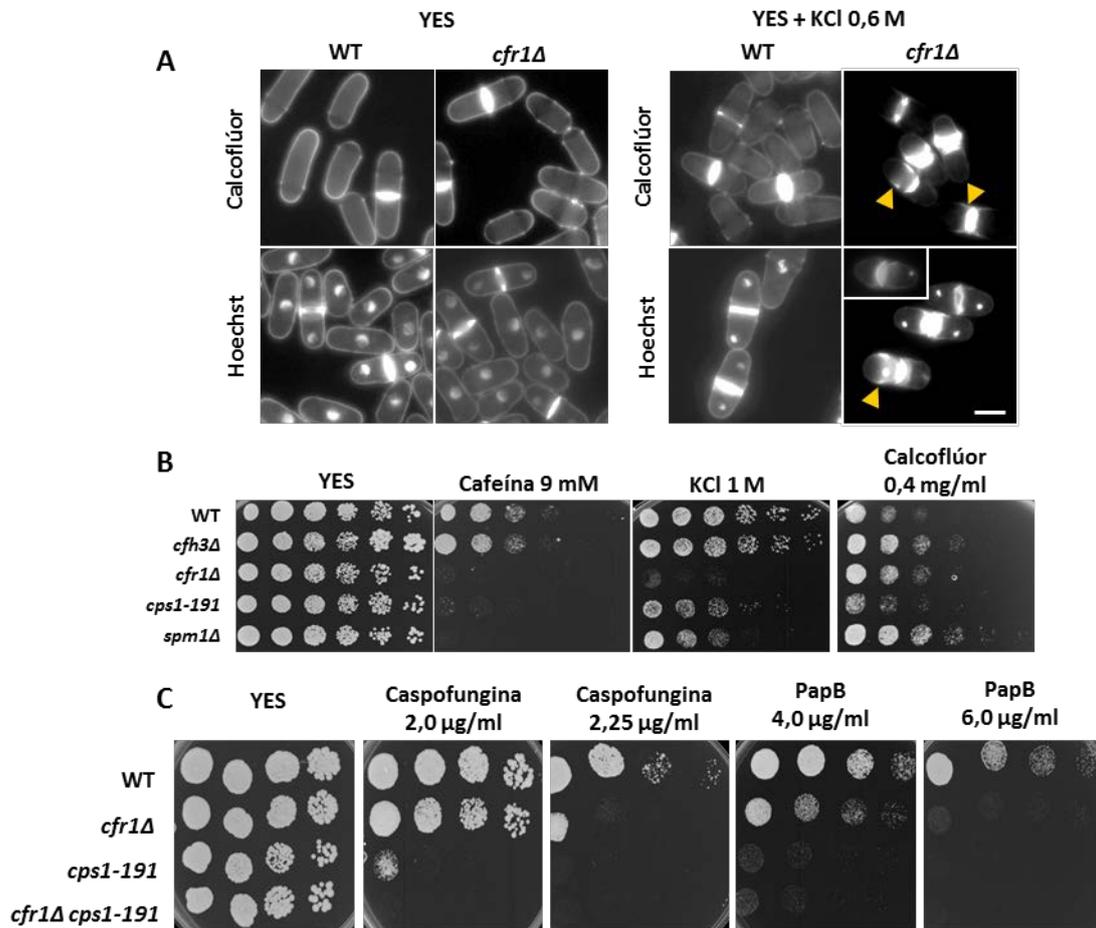


Figura 12. Fenotipos del mutante *cfr1Δ* en el ciclo vegetativo.

A. Fotografías de fluorescencia de células de la cepa silvestre (WT) y del mutante *cfr1Δ* cultivadas en medio líquido YES (paneles de la izquierda) o YES suplementado con KCl 0,6 M (paneles de la derecha) durante 16 horas a 28°C. Los paneles superiores muestran tinciones con calcoflúor (tinción de pared celular) y los paneles inferiores tinciones con Hoechst (tinción de núcleos y de pared celular). Las flechas amarillas indican engrosamientos en la pared celular lateral.

Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μm.

B. Análisis del crecimiento en condiciones de estrés.

Ensayo de crecimiento en gota en medio rico YES, con los compuestos que se indican, en los que se habían inoculado diluciones seriadas de suspensiones de células de las estirpes indicadas. El primer inóculo contenía 3×10^4 células y los sucesivos inóculos contenían diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ del mismo. Las placas se incubaron a 28°C durante 3 días.

C. Análisis de la sensibilidad a compuestos que inhiben la síntesis de β-glucano.

Ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) o YES suplementado con las concentraciones indicadas de caspofungina o papulacandina B (PapB), en las que se habían inoculado diluciones seriadas de suspensiones de células de las cepas indicadas. A partir de una suspensión que contenía 3×10^4 células se hicieron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$. Las placas se incubaron a 28°C durante 3 días.

- Análisis de la sensibilidad a compuestos que inhiben la síntesis del β -glucano.

Con el fin de averiguar si en ausencia de estrés el mutante *cfr1* Δ también tenía algún fenotipo (en particular nos interesaba la existencia de alteraciones en la pared celular) se estudió el crecimiento de este mutante, en comparación con el de una cepa silvestre y el del mutante *cps1-191*, en placas suplementadas con diferentes concentraciones de distintos antifúngicos inhibidores de la síntesis del β -glucano, como caspofungina (Cancidas) o papulacandina B. En la **figura 12C** se puede observar cómo el mutante *cfr1* Δ crece peor que la cepa silvestre en presencia de estos compuestos, lo cual sugiere que este mutante puede presentar daños en su pared celular. Sin embargo el hecho de que su sensibilidad sea muy inferior a la del mutante *cps1-191* sugiere que probablemente los daños en dicha estructura no sean muy drásticos.

Dada la existencia de fenotipos en el mutante *cfr1* Δ durante el crecimiento vegetativo relacionados con la síntesis de la pared celular y con el control de la morfología, se decidió continuar con la caracterización del exómero en la levadura de fisión.

2. Caracterización del exómero de *S. pombe*

Como ya se ha mencionado anteriormente el exómero de *S. cerevisiae* es un adaptador encargado del transporte de proteínas entre el Golgi y la membrana plasmática. Este adaptador está formado por la proteína Chs5 que sirve como anclaje para mantener el complejo ensamblado y por las ChAPs (Bch1, Bch2, Bud7 y Chs6) que son cuatro proteínas que determinan la especificidad del cargo (Sanchatjate & Scheckman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

2.1 Funcionalidad del extremo amino terminal de la proteína Cfr1

La proteína Cfr1 de *S. pombe* posee una identidad del 37% con la proteína Chs5 de *S. cerevisiae* (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006). Ambas proteínas poseen motivos FN3 y BRCT en su extremo amino terminal, formando el módulo FBE. En la levadura de

gemación este módulo es necesario y suficiente para que la proteína Chs5 se localice de forma correcta y lleve a cabo su función. Igualmente la región amino terminal de Cfr1 es suficiente para que esta proteína se localice en el aparato de Golgi (Martín-García *et al.*, 2011).

De esta forma, quedaba por comprobar si el módulo FBE de la proteína Cfr1 de *S. pombe* también era suficiente para llevar a cabo su función. Para dar respuesta a esta cuestión se realizó un ensayo de crecimiento en gota para comprobar si la cepa *cfr1Δ* transformada con el gen *cfr1⁺* completo (*cfr1Δ/cfr1⁺* en la **figura 13**) o con una forma truncada del gen que sólo posee el módulo FBE (*cfr1Δ/cfr1_{ΔCT}*) tenían un comportamiento semejante frente a distintos compuestos a los cuales las células del mutante nulo eran sensibles (*cfr1Δ/vector*). Como podemos observar en la **figura 13** las cepas que portaban el gen *cfr1⁺* completo y las que solo portaban el módulo FBE tenían un crecimiento parecido en medio YES suplementado con KCl (estrés osmótico) o con caspofungina (inhibidor de la síntesis del β-glucano), mientras que las células del mutante *cfr1Δ* transformado con el plásmido vacío tenían defectos de crecimiento en los compuestos ensayados.

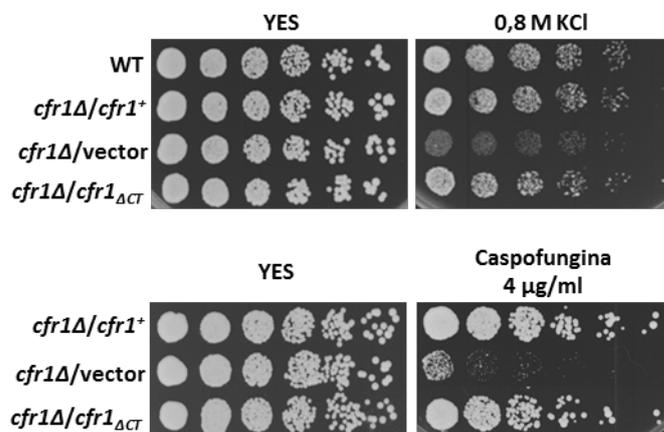


Figura 13. El módulo FBE situado en el extremo amino terminal de la proteína Cfr1 es necesario y suficiente para su funcionalidad.

Ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) o YES suplementado con las concentraciones indicadas de KCl o caspofungina en las que se habían inoculado diluciones seriadas de suspensiones de células de las estirpes indicadas. A partir de una suspensión que contenía 3×10^4 células se hicieron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$. Las placas se incubaron a 28°C durante 3 días.

Este resultado, junto con el hecho de que el módulo FBE de Cfr1 es capaz de promover la localización de Chs5 en el Golgi de *S. cerevisiae*, sugiere que las proteínas Chs5 y Cfr1 tienen unos requerimientos similares para su funcionalidad, y apoyan la existencia de cierta conservación funcional de este complejo en ambas levaduras.

2.2 Análisis bioinformático de la proteína Bch1

De acuerdo con la base de datos de *S. pombe* (<http://www.pombase.org>) la ORF SPBC31F10.16 codifica una proteína con similitud a las proteínas de la familia ChAPs de *S. cerevisiae*. Esta proteína posee una identidad que oscila entre el 21 y el 31% con las proteínas ortólogas de la levadura de gemación.

La levadura de gemación presenta dos parejas de ChAPs por similitud de secuencia que surgieron por duplicación de su genoma. Una de ellas formada por Bch1 y Bud7, más conservada a lo largo de la evolución, y la otra formada por Chs6 y Bch2 (Sanchatjate & Scheckman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Roncero *et al.*, 2016). Sin embargo otros hongos (como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* o *Ustilago maydis*) solo poseen una proteína semejante a las ChAPs (Roncero *et al.*, 2016). Los análisis filogenéticos sugieren que Bch1 es la ChAP más antigua. Por esta razón hemos denominado Bch1 a la proteína de *S. pombe*.

Las proteínas ChAP de *S. cerevisiae* poseen en su secuencia cinco dominios denominados TPR (*TetratricoPeptide Repeat*), cuatro de ellos en la zona central y uno más en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Está descrito que estos dominios son necesarios para la interacción con la proteína Chs5 y con otras ChAPs, así como para su localización en el aparato de Golgi (Rockenbauch *et al.*, 2012). Utilizando predicciones llevadas a cabo con distintos programas informáticos como Pfam o TPRpred hemos determinado que la proteína Bch1 de *S. pombe* presenta tres de estos dominios en la zona central y uno más en el extremo carboxilo terminal (Figura 14). Hasta el momento en *S. cerevisiae* se sabe que al menos son necesarios tres de estos dominios para que la proteína pueda llevar a cabo sus funciones biológicas (interacción proteína - proteína). En este trabajo no se ha llegado a determinar la relevancia biológica de estos dominios en la proteína Bch1 de *S. pombe*.

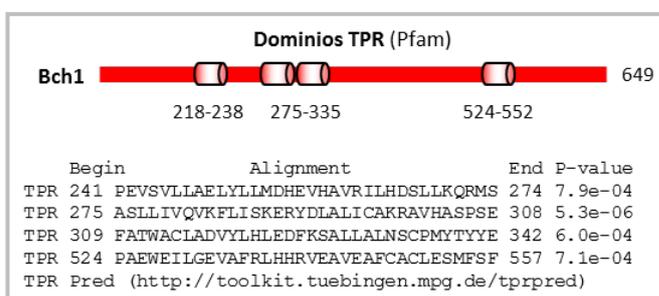


Figura 14. Predicciones informáticas de los posibles dominios TPR de la proteína Bch1 de *S. pombe*.

Los números indican el primero y el último aminoácido de los dominios TPR. A su vez, se indica el programa informático utilizado en cada caso.

2.3 Localización de la proteína Bch1

Antes de estudiar cual era la función de las proteínas Cfr1 y Bch1 de *S. pombe* se llevó a cabo el análisis de la localización de la proteína Bch1 *in vivo* para así poder conocer si su patrón de distribución era semejante al de la proteína Cfr1. Como ya se ha mencionado antes la proteína Cfr1 se localiza en el aparato de Golgi (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006).

La observación al microscopio de fluorescencia de células que portaban la proteína de fusión GFP-Bch1 permitió determinar que esta proteína se localizaba como puntos discretos en el citoplasma en una cepa silvestre, con un patrón similar al de la proteína Cfr1 (Figura 15A).

Con el fin de determinar si efectivamente ambas proteínas tenían el mismo patrón de distribución se construyó una cepa en la cual las proteínas estaban marcadas con distintas proteínas fluorescentes, Cfr1-RFP y GFP-Bch1. Utilizando los filtros adecuados para cada uno de los marcadores se confirmó que el patrón de localización era exactamente el mismo, ya que ambas proteínas co-localizaban (puntos amarillos en el panel de la superposición de las imágenes) (Figura 15A).

2.3.1 Localización de la proteína Bch1 en el mutante *cfr1Δ*

A continuación nos planteamos cual sería la localización de la proteína Bch1 en una cepa carente del gen *cfr1*⁺. Para poder abordar esta cuestión se construyó una cepa que portaba la proteína GFP-Bch1 pero tenía el gen *cfr1*⁺ deletado (*cfr1Δ* GFP-Bch1); también se llevó a cabo la construcción contraria, es decir, una cepa que tuviera la proteína Cfr1-GFP y careciera del gen *bch1*⁺ (*bch1Δ* Cfr1-GFP). Al tomar fotografías de fluorescencia de ambas cepas se pudo observar que en ambos casos cambiaba el patrón de la señal fluorescente. Cfr1-GFP aparecía completamente dispersa por el citoplasma, sin ningún patrón de localización discreto, en la cepa carente de *bch1*⁺ (Figura 15B). Por otro lado GFP-Bch1 se observaba dispersa por el citoplasma y acumulada en el núcleo en el mutante *cfr1Δ*. La aparición de la proteína Bch1-GFP en el núcleo del mutante *cfr1Δ* puede indicar la degradación de la proteína de fusión por el proteasoma nuclear, con la consecuente acumulación de la GFP en el núcleo, o al

hecho de que Bch1 tiene dos sitios potenciales de unión a proteínas 14-3-3. Las proteínas 14-3-3, al igual que las proteínas con dominios BRCT, se localizan preferentemente en el núcleo, donde se unen a proteínas implicadas en remodelación del ADN y en checkpoints. Así, es posible que en ausencia de Cfr1, la proteína Bch1 se acumule en el núcleo por unión inespecífica a proteínas 14-3-3.

En cualquier caso estos resultados demuestran que ambas proteínas, Cfr1 y Bch1, se necesitan mutuamente para su correcta localización en el aparato de Golgi.

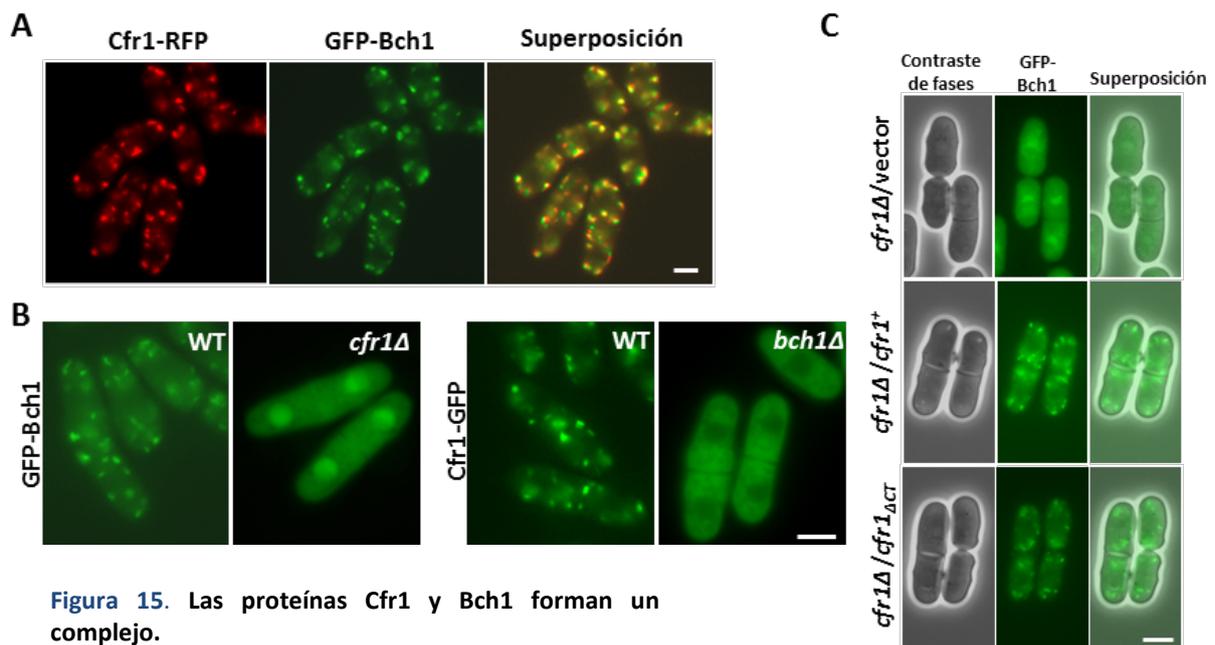


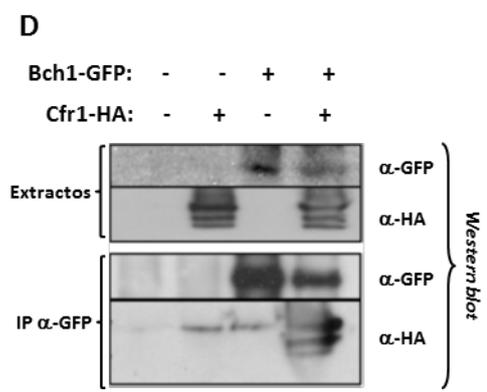
Figura 15. Las proteínas Cfr1 y Bch1 forman un complejo.

A. Localización de las proteínas Cfr1-RFP y GFP-Bch1 en las mismas células. El panel de la derecha muestra una superposición de ambas imágenes.

B. Localización de las proteínas GFP-Bch1 y Cfr1-GFP en una cepa silvestre (WT) o en los mutantes indicados.

C. Localización de la proteína GFP-Bch1 en ausencia o presencia del gen *cfr1*⁺ o en presencia de una forma truncada del gen que sólo posee el módulo FBE (*cfr1Δ/cfr1Δct*). El panel de la derecha muestra una superposición de la imagen de contraste de fases y de la imagen de fluorescencia. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μm.

D. Ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1-HA y GFP-Bch1. Los dos paneles superiores muestran ensayos de *Western blot* de extractos totales de las cepas que portan las proteínas marcadas que se indican, revelados con anticuerpos anti-GFP o anti-HA. Los dos paneles inferiores muestran ensayos de *Western blot* de las proteínas inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo policlonal anti-GFP y revelados con los anticuerpos monoclonales indicados.



2.4 El módulo FBE de Cfr1 es suficiente para promover la localización de la proteína Bch1 en el aparato de Golgi

Sabemos que el extremo amino terminal de la proteína Cfr1 formado por el módulo FBE es suficiente para que la proteína Cfr1 se localice correctamente en el Golgi. También sabemos que las proteínas Cfr1 y Bch1 se necesitan mutuamente para su correcta localización. Por ello nos planteamos si este módulo FBE era suficiente para promover la localización de la proteína Bch1 en el Golgi. Para comprobarlo se comparó la localización de la proteína Bch1 marcada con la GFP (GFP-Bch1) en una cepa *cfr1Δ* transformada con el gen *cfr1*⁺ completo (*cfr1Δ/cfr1*⁺), con una forma truncada del gen que sólo poseía el módulo FBE (*cfr1Δ/cfr1_{ΔCT}*) o con el vector vacío (*cfr1Δ/vector*). Como se puede observar en la **figura 15C**, y como se ha mencionado antes, al deletar el gen *cfr1*⁺ la proteína GFP-Bch1 perdía su localización específica, sin embargo la localización de GFP-Bch1 era similar en las cepas mutantes transformadas con el gen completo o con la forma truncada del gen que solo posee el módulo FBE, observándose como puntos discretos en el citoplasma.

Este resultado nos permite concluir que el módulo FBE de la proteína Cfr1 es necesario y suficiente para que el complejo Cfr1/Bch1 se localice correctamente en el aparato de Golgi.

2.5 Las proteínas Cfr1 y Bch1 forman un complejo

En los apartados anteriores se describen dos resultados interesantes:

- Las proteínas Cfr1 y Bch1 de *S. pombe* tienen el mismo patrón de localización en el aparato de Golgi.
- La localización de las proteínas Cfr1 y Bch1 de *S. pombe* es interdependiente, es decir, se necesitan mutuamente para su correcta localización.

Estos datos nos hicieron pensar que ambas proteínas podían formar un complejo. Para comprobar si esto era así se llevó a cabo un ensayo de co-inmunoprecipitación.

Para la realización de este ensayo se utilizó una cepa WT, una cepa que portaba la proteína Cfr1 fusionada al epítipo HA (Cfr1-HA), una cepa donde la proteína Bch1 estaba fusionada a GFP (Bch1-GFP) y una cepa que poseían las dos proteínas marcadas. En la **figura 15D** se observa cómo la proteína Cfr1-HA aparecía en los inmunoprecitados (IP) de la cepa que portaba las dos proteínas marcadas, pero no en el control negativo (WT) ni en las cepas que solo tenían una de las dos proteínas marcadas.

Este resultado confirma que entre ambas proteínas existe una interacción física. Aunque esta técnica no permite determinar si la interacción entre ambas es de forma directa, sí que apoya la idea de que las proteínas Cfr1 y Bch1 de *S. pombe* pueden formar un complejo.

2.6 Las proteínas Cfr1 y Bch1 necesitan la actividad de la GTPasa Arf1 para localizarse en el aparato de Golgi

Las GTPasas de la familia Arf (*ADP-Ribosylation Factor*) reclutan distintos efectores que participan en el tráfico vesicular. Arf1 desempeña un papel importante en el reclutamiento de algunas cubiertas vesiculares como COPI y clatrina (Gillingham y Munro, 2007). Además está descrito que esta GTPasa Arf1 es necesaria para que se produzca el reclutamiento de las proteínas que forman el complejo del exómero en *S. cerevisiae* (Sanchatjate y Scheckman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Packowski *et al.*, 2012).

En los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio se había demostrado que la localización de Cfr1-GFP en el aparato de Golgi dependía de Arf1. Sin embargo, este dato se había obtenido tras un tratamiento muy largo (2 horas) con Brefeldina A (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006), por lo que decidimos confirmar este dato. En *S. pombe* el mutante nulo *arf1Δ* es letal y no se conocen mutantes puntuales del gen *arf1*⁺. Por ello, se volvió a realizar el experimento utilizando Brefeldina A, pero tratando las células durante 10 minutos a 30°C.

Se utilizó como control del experimento una cepa con la proteína Anp1 fusionada a la proteína RFP (Anp1-mCherry) como marcador del aparato de Golgi. Se observó que tras un tratamiento de 10 minutos con Brefeldina A esta proteína pasaba a localizarse en el RE, lo que demostraba que ese tratamiento era suficiente para inhibir a la GTPasa Arf1. A continuación se observó que las proteínas Cfr1-GFP y GFP-Bch1 también perdían su localización tras el mismo tratamiento con este compuesto (**Figura 16**).

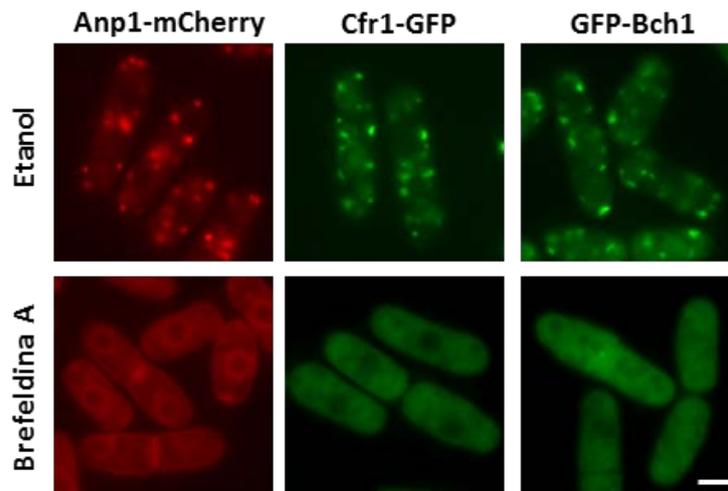


Figura 16. Las proteínas Cfr1 y Bch1 forman un complejo que necesita la actividad de la GTPasa Arf1. Fotografías de fluorescencia de células tratadas con etanol (paneles superiores) o con Brefeldina A (paneles inferiores) durante 10 minutos a 30°C. En los paneles de la izquierda aparece la proteína Anp1-mCherry (marcador del aparato de Golgi) como control del experimento. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

Estos resultados nos llevan a concluir que la GTPasa Arf1 es necesaria para la correcta localización del complejo Cfr1/Bch1 en *S. pombe*, siendo ésta una característica común con el exómero de *S. cerevisiae*.

En resumen, las proteínas Cfr1 y Bch1 de *S. pombe* tienen características de secuencias similares a los componentes del exómero. Además ambas proteínas forman un complejo que se localiza en el aparato de Golgi dependiendo de la GTPasa Arf1, y el módulo FBE es suficiente para promover la localización de Cfr1 en el Golgi y para la función del complejo. Por lo tanto podemos concluir que el complejo Cfr1/Bch1 de *S. pombe* representa la forma más sencilla de un exómero funcional.

3. Localización del exómero de *S. pombe*

Teniendo en cuenta que el complejo formado por las proteínas Cfr1/Bch1 en *S. pombe* presenta un patrón de distribución correspondiente al aparato de Golgi y que la proteína Chs5, componente estructural del exómero de *S. cerevisiae*, co-localiza con la proteína Kex2 marcador del *trans*-Golgi network (TGN) y de los endosomas tempranos (EEs) pero no con marcadores de *cis* Golgi (Santos & Snyder, 1997), quisimos analizar con más detalle cuál era la localización exacta del complejo de la levadura de fisión.

3.1 El exómero de *S. pombe* co-localiza con marcadores del TGN/EEs

Para dar respuesta a esta cuestión, lo primero que hicimos fue analizar la posible co-localización de Cfr1 con un marcador de Golgi temprano (*cis* Golgi) y un marcador del Golgi tardío (TGN). La proteína elegida como marcador del *cis* Golgi fue Anp1 (Jungmann & Munro, 1998), una proteína que forma parte del complejo $\alpha(1,6)$ -manosiltransferasa.

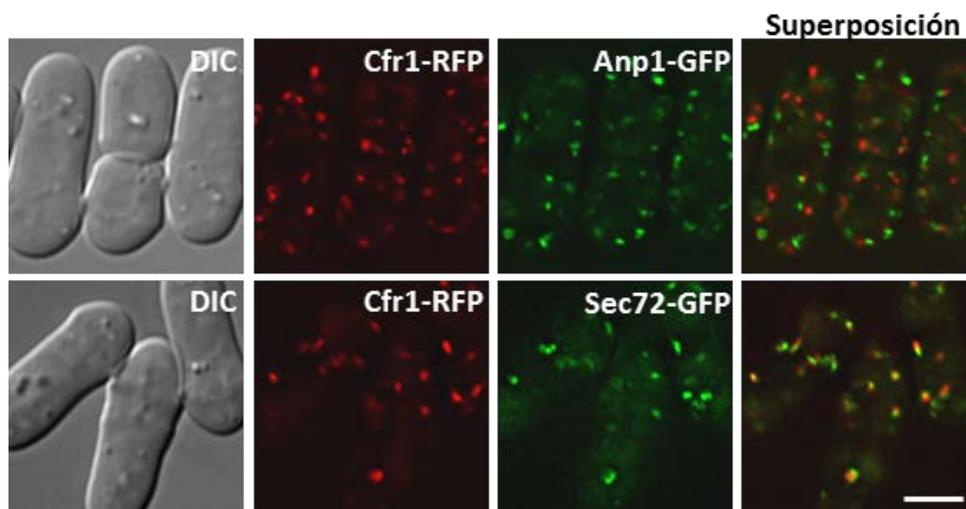


Figura 17. El exómero co-localiza con marcadores del TGN/EEs.

Los paneles superiores muestran fotografías de fluorescencia de la localización de la proteína Cfr1-RFP o Anp1-GFP (marcador del *cis* Golgi) en las mismas células.

Los paneles inferiores muestran fotografías de fluorescencia de la localización de la proteína Cfr1-RFP o Sec72-GFP (marcador del TGN/EEs) en las mismas células.

Los paneles de la derecha muestran una superposición de ambas imágenes. El color amarillo indica co-localización. Los paneles de la izquierda fotografías de contraste interdifereencial (DIC) de las células.

Las imágenes son un plano medio de las células adquiridas con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μ m.

Como se observa en la **figura 17** no existía co-localización al superponer dos imágenes de fluorescencia tomadas a partir de una cepa con las dos proteínas marcadas, ya que no se observan puntos amarillos. Por el contrario se vio que Cfr1-GFP co-localizaba parcialmente con Sec72 (ortóloga de Sec7, marcador del TGN) en una cepa que portaba Cfr1-RFP y Sec72-GFP (Franzusoff *et al.*, 1991). La proteína Sec72 es un GEF de la GTPasa Arf1 cuya localización es el TGN y los EEs (se desconoce hasta qué punto estos dos compartimentos están separados).

Llegados a este punto sabemos que el complejo Cfr1/Bch1 de *S. pombe* co-localiza con marcadores del TGN/EEs. Con el fin de analizar con más detalle la localización del exómero de *S. pombe* se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

3.2 El exómero de *S. pombe* co-localiza con endosomas tempranos

El colorante FM4-64 es un compuesto orgánico, lipofílico 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). Por tanto, a tiempo corto de tratamiento con este colorante (5 minutos) se podían observar los endosomas tempranos y analizar una posible co-localización con la proteína Cfr1-GFP, que fue la utilizada como marcador del exómero. Con este fin se realizó un estudio de *time-lapse* que permitió el seguimiento del proceso endocítico a lo largo del tiempo. Para poder realizarlo se empleó un microscopio confocal Spinning-Disk Olympus IX-81. Se obtuvieron imágenes cada 0,5 segundos de un único plano de 0,200 μm . Como se puede observar en la **figura 18A**, había co-localización parcial (puntos amarillos) entre el colorante y la proteína Cfr1-GFP. Al analizar las vesículas se pudo ver cómo la proteína Cfr1-GFP y el marcaje del FM4-64 aparecían separados (panel 0,5" de la **figura 18B**) y después se juntaban (paneles sucesivos de la **figura 18B**), lógicamente no se producía una co-localización perfecta ya que se trataba de partículas en movimiento. Realizamos la cuantificación con el programa JaCoP (*Just another Colocalization Plugin*) del software ImageJ y los resultados mostraron que un 27,5% de los puntos correspondiente al marcaje de endosomas tempranos mediante

FM4-64 co-localizaba con los puntos correspondientes a la proteína de fusión Cfr1-GFP y que un 31,0% de los puntos de esta proteína de fusión co-localizaba con endosomas tempranos (Figura 18C).

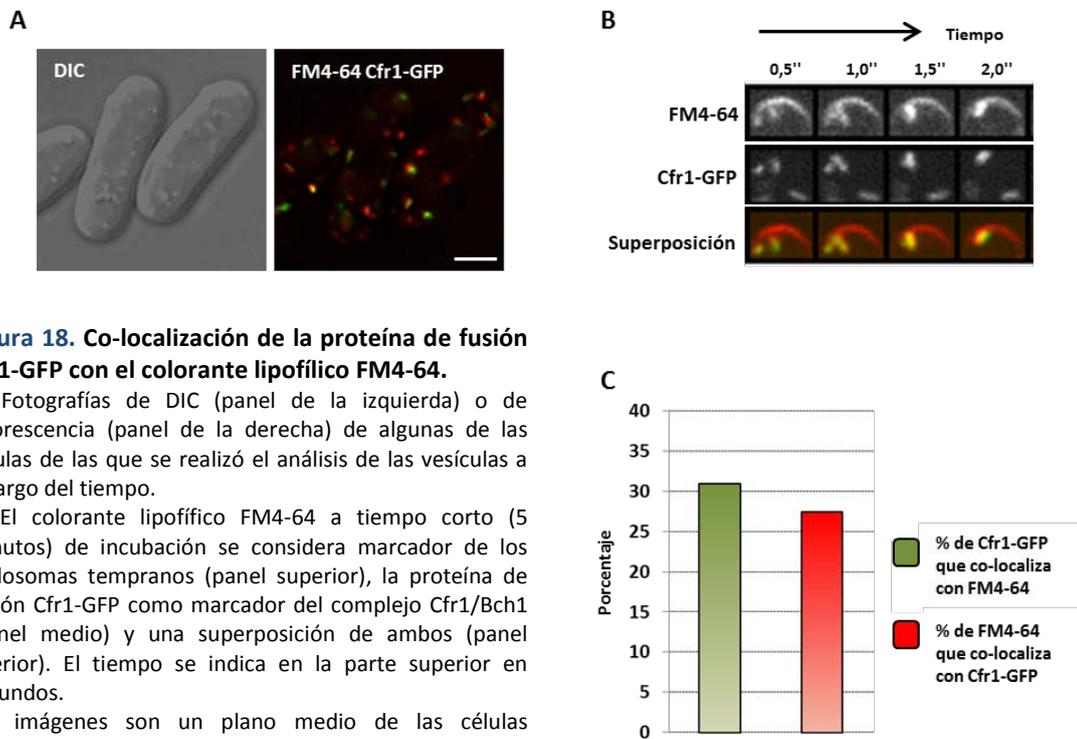


Figura 18. Co-localización de la proteína de fusión Cfr1-GFP con el colorante lipofílico FM4-64.

A. Fotografías de DIC (panel de la izquierda) o de fluorescencia (panel de la derecha) de algunas de las células de las que se realizó el análisis de las vesículas a lo largo del tiempo.

B. El colorante lipofílico FM4-64 a tiempo corto (5 minutos) de incubación se considera marcador de los endosomas tempranos (panel superior), la proteína de fusión Cfr1-GFP como marcador del complejo Cfr1/Bch1 (panel medio) y una superposición de ambos (panel inferior). El tiempo se indica en la parte superior en segundos.

Las imágenes son un plano medio de las células adquiridas con un microscopio confocal Spinning-Disk. Barra de escala, 5 μ m.

C. Cuantificación del % de puntos de la proteína de fusión Cfr1-GFP que co-localizan con el marcaje del FM4-64 (endosomas tempranos) y viceversa.

3.3 Localización del exómero de *S. pombe* en endosomas/PVC/vacuolas

Una de las formas de poder conocer en más detalle los compartimentos subcelulares en los que el complejo podría localizarse, para así intentar delimitar su función en la célula, es la realización de fraccionamientos subcelulares utilizando gradientes de sacarosa. Para la realización de este tipo de ensayos se necesitan marcadores de los distintos compartimentos celulares que se quieren estudiar. Después de tratar de recabar toda la información posible en la bibliografía, y conociendo las limitaciones que existen en la levadura de fisión, los marcadores elegidos fueron los siguientes (Sánchez-Mir *et al.*, 2012):

- Sec72-GFP (GEF de la GTPasa Arf1), se utilizó como marcador del TGN/EEs.

- Pep12 (t-SNARE necesaria para el transporte de proteínas vacuolares), se utilizó como marcador del compartimento pre-vacuolar (PVC).
- Vma2 (subunidad de la ATPasa vacuolar), se utilizó como marcador de las vacuolas.
- Pma1 (subunidad de la ATPasa H⁺ de la MP), se utilizó como marcador de la MP.

La cepa utilizada portaba tanto Sec72-GFP como Cfr1-RFP, siendo esta última la proteína de estudio. En la **figura 19** se puede observar uno de los resultados obtenidos. Se obtuvieron datos prácticamente iguales en seis experimentos diferentes. Por un lado, los marcadores aparecían bien definidos; en la zona izquierda del gel (fracciones más ligeras del gradiente, extraídas de la parte superior del tubo) aparecían el PVC y las vacuolas (Pep12 y Vma2, respectivamente), que como era de esperar compartían algunas fracciones. Hacia el otro extremo del gel (fracciones pesadas del gradiente) aparecía el TGN/EEs (Sec72-GFP). El marcador de la MP (Pma1) se distribuyó por todas las fracciones, incrementándose en la zona del TGN/EEs. La proteína Cfr1 se detectaba a lo largo de todas las fracciones y, aunque su presencia era mayoritaria en la zona del TGN/EEs, también se detectaba en las fracciones correspondientes al PVC y a las vacuolas. Tratamos de dar un valor numérico a esta distribución de modo que llevando a cabo las normalizaciones adecuadas, si se sumaba el valor de todas las cuantificaciones de la zona correspondiente TGN/EEs o PVC/vacuolas y se calculaba el porcentaje respecto a la cantidad total, podíamos decir que un 70% de la proteína aparecía localizada en la zona del TGN/EEs, mientras que el 30% restante aparecía localizada en la zona del PVC/vacuolas. Por tanto, con estos datos podemos decir que el exómero de *S. pombe* presenta una localización mayoritaria, pero no exclusiva, en la zona del TGN/EEs, estando también presente en la zona del PVC/vacuolas.

Dado que en el análisis del gradiente subcelular habíamos detectado la presencia de Cfr1-RFP en PVC/vacuolas quisimos averiguar si el exómero jugaba algún papel en el tráfico a través de estos compartimentos. Un ensayo sencillo para analizar si el tráfico a nivel del PVC/vacuolas está alterado es detectar el desvío de Cpy1 hacia la superficie celular. Esta enzima vacuolar es inicialmente sintetizada como un pro-precursor en el RE y transportada a través de los endosomas a la vacuola donde es finalmente procesada y transformada en su forma madura (Tabuchi *et al.*, 1997; Mukaiyama *et al.*,

2011). Cualquier defecto en el transporte, vía endosomal, desde la región TGN hasta las vacuolas o bien problemas en la formación de estos orgánulos, impiden la localización de Cpy1 en la vacuola y se produce la secreción de la misma al exterior celular (Iwaki *et al.*, 2006; Miyatake *et al.*, 2007).

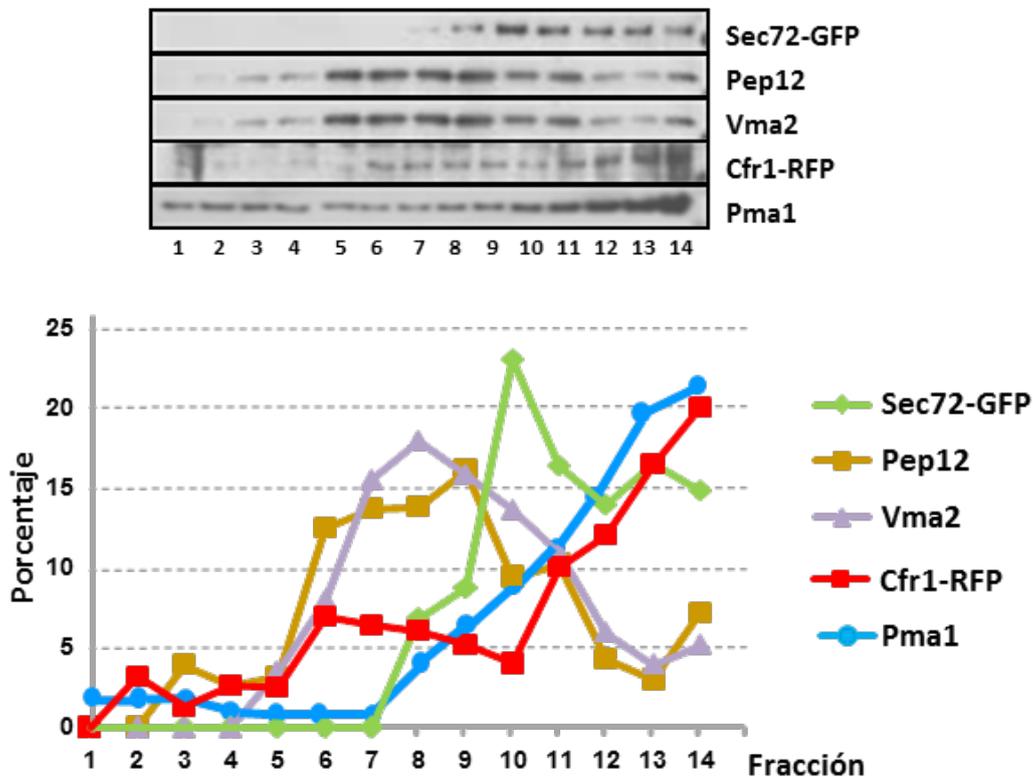


Figura 19. Localización del exómero en distintos compartimentos subcelulares.

Fraccionamientos subcelulares utilizando gradientes de sacarosa. Los extractos celulares preparados a partir de una cepa que portaba tanto Cfr1-RFP como Sec72-GFP se cargaron en gradientes 30-55% de sacarosa y se centrifugaron durante 20 horas. Las fracciones son recogidas desde la parte superior del gradiente y analizadas por ensayos de *Western blot* revelados con anti-GFP, anti-Pep12, anti-Vma2, anti-RFP y anti-Pma1. El panel superior muestra los ensayos de *Western blot* revelados con los anticuerpos indicados donde se observan las distintas fracciones y el panel inferior muestra una representación gráfica de las distintas fracciones de los compartimentos subcelulares.

Para comprobar si en el mutante *cfr1Δ* la proteína Cpy1 se transporta a la vacuola de manera eficiente se realizó un ensayo denominado *dot blot* (ver apartado 6.5 de Materiales y Métodos). En la **figura 20** se puede observar que tanto en los mutantes simples *cfr1Δ* y *bch1Δ* como en el mutante doble *cfr1Δ bch1Δ* esta proteína presentaba defecto en su transporte hacia la vacuola, ya que se secretaba a la superficie celular, como ocurría en el caso del mutante *cdc42-L160S* (Estravís *et al.*, 2011) utilizado como control positivo del experimento.

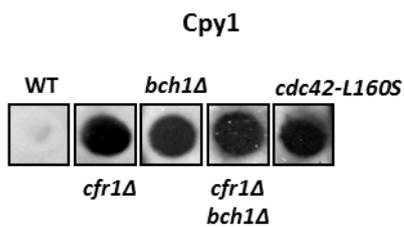


Figura 20. El transporte de la carboxipeptidasa Y (Cpy1) está alterado en las cepas carentes del exómero.

Análisis de la presencia de la proteína Cpy1 en el exterior celular mediante ensayo *dot blot* de colonias de células de la cepa silvestre (WT) y de los mutantes *cfr1Δ*, *bch1Δ*, *cfr1Δ bch1Δ* y *cdc42-L160S* (control positivo), incubadas en medio mínimo a 28°C durante 5 días.

Todos los resultados de este apartado parecen indicar que la función del exómero en *S. pombe* podría ejercerse en el tráfico vesicular a nivel del TGN/endosomas/PVC/vacuolas. Este hecho nos hizo plantearnos que la función de este complejo en el tráfico vesicular en la levadura de fisión es diferente o al menos no tan específica como el papel que se ha descrito para el exómero de *S. cerevisiae*. Para saber si la presencia de Cfr1 en los distintos compartimentos subcelulares tenía un significado biológico analizamos la existencia de alguna relación funcional entre los componentes del complejo Cfr1/Bch1 y los de otros adaptadores que ejercen su función en cada uno de estos compartimentos.

4. Relación entre el exómero de *S. pombe* y otros complejos de proteínas que participan en el transporte entre el aparato de Golgi y los endosomas

El transporte bidireccional entre el aparato de Golgi y los endosomas depende en gran medida de la clatrina. La clatrina carece de dominios de unión a la membrana por lo que su reclutamiento desde el citoplasma a la vesícula depende de adaptadores, que además median la interacción con las proteínas cargo. Teniendo en cuenta que la zona de actuación de estos adaptadores es también la zona de localización del complejo Cfr1/Bch1, quisimos saber si existía algún tipo de interacción entre estos componentes del tráfico vesicular. A continuación se describen las interacciones encontradas con algunos de los complejos adaptadores de clatrina, así como con la propia cubierta vesicular.

4.1 Relación entre el exómero de *S. pombe* y el adaptador AP-1

Se ha demostrado que el complejo AP-1 es capaz de unirse a la clatrina (Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst *et al.*, 2011). Este adaptador media el tráfico bidireccional entre el TGN y los endosomas tempranos (Touz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esta información, quisimos saber si existía algún tipo de interacción entre el complejo AP-1 y el exómero de *S. pombe*.

4.1.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles *cfr1Δ apm1Δ*

Lo primero que quisimos averiguar fue si existía interacción génica entre *apm1⁺* (gen que codifica para la adaptina mediana del adaptador AP-1) y el gen *cfr1⁺*. Para poder comprobarlo se construyó el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* y se realizó un ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) a distintas temperaturas. Como se puede observar en la **figura 21A** el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* crecía peor que el mutante simple *apm1Δ* a algunas de las temperaturas ensayadas 25°C, 28°C y 32°C; a partir de 34°C ya no se observó crecimiento ni del mutante sencillo *apm1Δ* ni del mutante doble. Estos resultados pueden indicar que ambas proteínas actúan en rutas paralelas de un mismo proceso.

Cuando estas cepas se cultivaron en medio líquido y se tiñeron con el colorante específico de la pared celular calcoflúor, se observó que tanto en el mutante sencillo *apm1Δ* como en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* había cierto número de células teñidas por completo. Este resultado indica que esas células están lisadas, lo que permite que el colorante entre en las células y tiña todo el interior celular. Además también había células con varios septos, mayoritariamente en el mutante doble. Con el fin de cuantificar mejor estos resultados se realizó el siguiente experimento. Las células de las cepas de interés se cultivaron en medio líquido YES a la temperatura permisiva de 25°C o a la semi-restrictiva de 32°C durante 5 horas. Las células se tiñeron con calcoflúor y se cuantificó tanto el fenotipo de lisis como de multiseptación. Los datos mostraron que en la cepa control (WT) y en el mutante *cfr1Δ* no había células lisadas ni multiseptadas a ninguna de las dos temperaturas probadas; en el mutante *apm1Δ* aparecía un 3% de lisis que se incrementaba con la temperatura hasta un 12%; sin

embargo apenas se encontraron células multiseptadas a ninguna de las temperaturas. Por último, en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* se observó un porcentaje de lisis de un 50% y un porcentaje de multiseptación de un 10% a las dos temperaturas ensayadas (Figura 21B).

Estos resultados confirmaron que efectivamente entre los genes *apm1⁺* y *cfr1⁺* existe interacción génica.

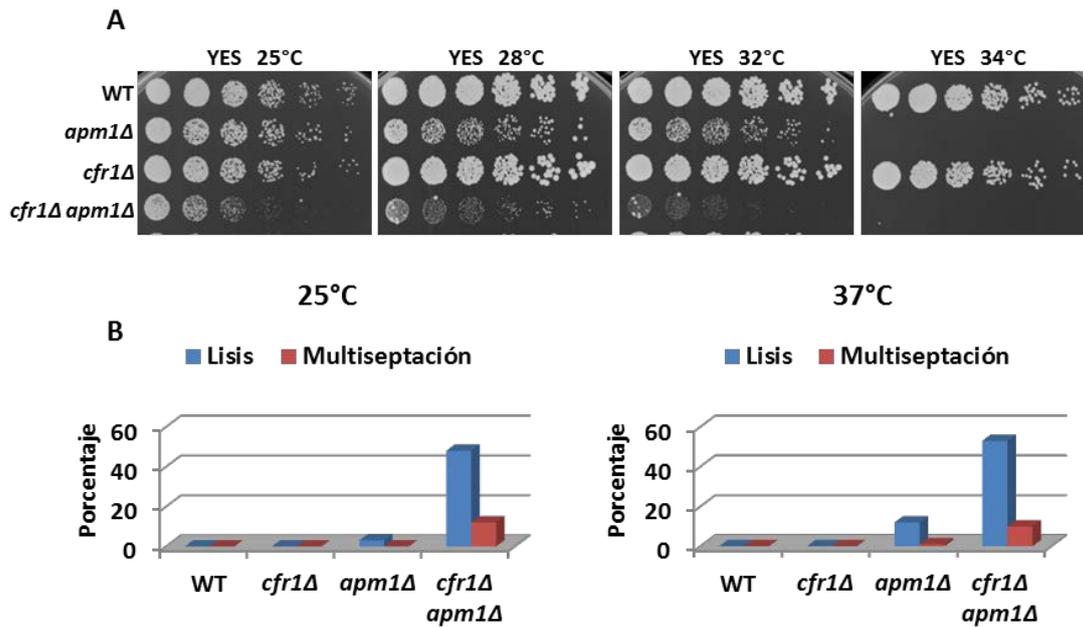


Figura 21. Análisis del fenotipo de los mutantes dobles *cfr1Δ apm1Δ*.

A. Ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) de las cepas indicadas. A partir de una suspensión de células que contenía 3×10^4 células se hicieron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-5 días dependiendo de la temperatura.

B. Las células de las cepas indicadas se cultivaron en medio líquido YES a la temperatura permisiva de 25°C o a la semi-restrictiva de 32°C durante 5 horas. Las células se tificaron con calcoflúor y se cuantificó tanto el fenotipo de lisis como de multiseptación.

4.1.2 Las proteínas Cfr1 y Apm1 interactúan físicamente

El siguiente paso en nuestra investigación fue analizar si entre las proteínas Cfr1 y Apm1 existía algún tipo de interacción física. Para analizar esta posibilidad se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación. Los extractos celulares procedentes de cepas que portaban las proteínas de fusión Cfr1-HA y Apm1-GFP, o de la cepa que portaba ambas proteínas marcadas, se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal anti-GFP. Tras la realización de la inmunoprecipitación y el correspondiente ensayo de *Western blot*

pudo observarse que, como se muestra en la **figura 22A**, la proteína Cfr1-HA aparecía en los inmunoprecipitados (IP) de la cepa que portaba las dos proteínas marcadas pero no en los de las cepas que solo tenían una de las dos proteínas marcadas.

Este resultado indica que los componentes del exómero y AP-1 interactúan en *S. pombe* (aunque esta técnica no nos permite asegurar si de forma directa) y que por lo tanto pueden colaborar en algunas de las funciones que llevan a cabo dentro del tráfico vesicular entre el aparato de Golgi y los endosomas tempranos.

4.1.3 Localización de la proteína Apm1 en el mutante *cfr1Δ* y viceversa

A continuación nos planteamos si cada uno de estos dos adaptadores sería necesario para la localización del otro en el TGN/EEs. Para poder abordar esta cuestión se construyó una cepa que portaba la proteína Apm1-GFP y tenía el gen *cfr1*⁺ deletado (*cfr1Δ* Apm1-GFP). La localización de la proteína de fusión Apm1-GFP en el mutante *cfr1Δ* se comparó con la que presentaba esta proteína en una cepa WT. Al analizar fotografías de fluorescencia de ambas cepas se pudo observar que la proteína Apm1-GFP presentaba el mismo patrón de localización, en el citoplasma y en el núcleo, en el mutante *cfr1Δ* y en la cepa WT. Por otro lado se construyó la cepa contraria, es decir, una cepa que tuviera la proteína Cfr1-GFP pero con el gen *apm1*⁺ deletado (*apm1Δ* Cfr1-GFP) y se comparó la localización de Cfr1-GFP en esta cepa y en una cepa WT. En el mutante *apm1Δ* la proteína Cfr1-GFP presentaba una localización ligeramente alterada con respecto al control (WT), presentando más puntos en el interior celular que en ocasiones tenían una morfología más irregular (**Figura 22B**). Sin embargo, dado que se sabe que el mutante *apm1Δ* presenta defectos morfológicos en el aparato de Golgi (*Kita et al., 2004*), es posible que el defecto en la apariencia de la señal fluorescente de Cfr1-GFP fuera una consecuencia indirecta de que el Golgi tiene una morfología diferente en el mutante *apm1Δ*. En cualquier caso, Cfr1-GFP se localiza en orgánulos intracelulares en ausencia de AP-1 y viceversa.

Según estos datos ninguno de los dos adaptadores es esencial para la localización del otro en la zona del TGN/EEs.

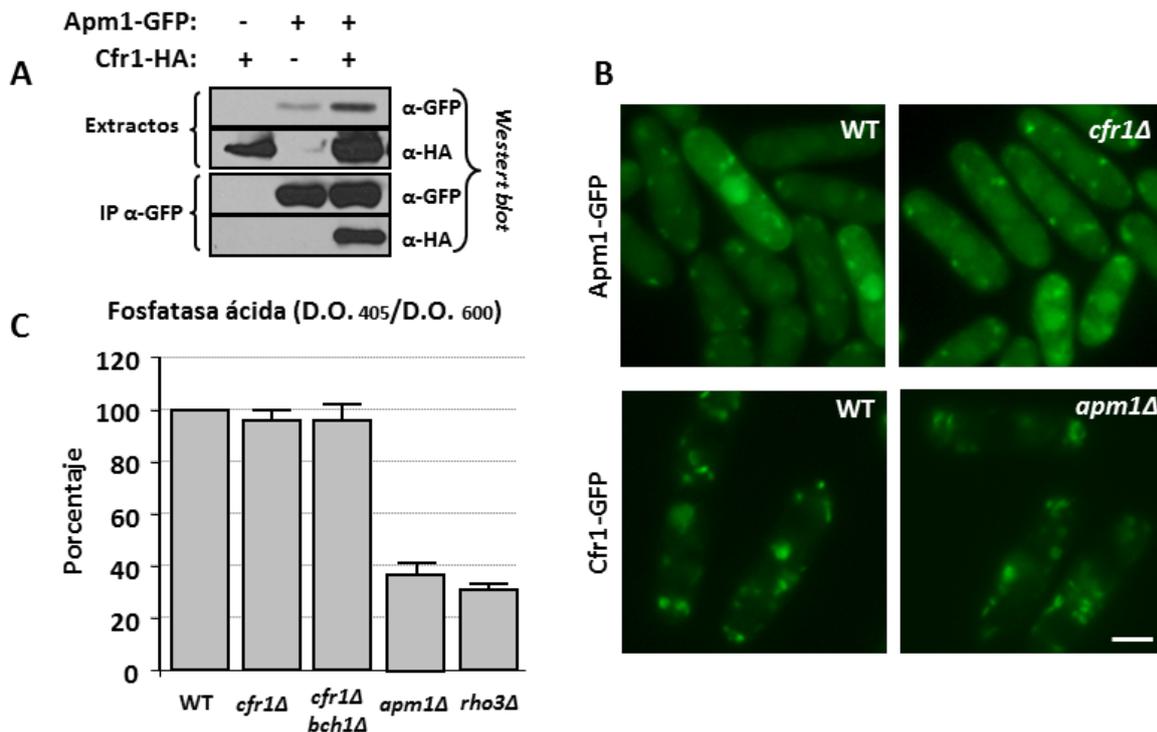


Figura 22. Relación entre el exómero de *S. pombe* y el adaptador AP-1.

A. Apm1 y Cfr1 co-inmunoprecipitan.

Extractos celulares de las cepas que expresan las proteínas de fusión Apm1-GFP y/o Cfr1-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 (IP) y se analizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-GFP y anti-HA.

B. El complejo Cfr1/Bch1 no es necesario para la correcta localización de adaptador AP-1.

Fotografías de fluorescencia de la localización de la proteína Apm1-GFP en una cepa silvestre (WT) y en el mutante *cfr1Δ* (paneles superiores) y de la localización de la proteína Cfr1-GFP en una cepa silvestre (WT) y en el mutante *apm1Δ* (paneles inferiores).

Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

C. La secreción de la fosfatasa ácida no está alterada en ausencia del complejo Cfr1/Bch1.

Se valoró la actividad de la fosfatasa ácida secretada al medio de cultivo a partir de células de cultivos que estaban creciendo logarítmicamente a una densidad de 2×10^7 células/ml. Se muestra el valor medio de cuatro experimentos independientes y la desviación estándar.

4.1.4 El exómero no participa en el proceso general de secreción celular

Para analizar si el complejo Cfr1/Bch1 participa en el proceso de exocitosis general, como lo hace el complejo AP-1, se valoró la secreción de la enzima fosfatasa ácida secretada al medio de cultivo en los mutantes *cfr1Δ* y *cfr1Δ bch1Δ*, en comparación con una cepa silvestre y utilizándose como controles del experimento los mutantes *apm1Δ* y *rho3Δ* que se sabe que presentan un defecto en este proceso (Kita *et al.*, 2011).

En *S. pombe* 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). Como se puede observar en la **figura 22C** la actividad fosfatasa detectada en los sobrenadantes de los cultivos de los mutantes del exómero fue similar a la cantidad detectada en el cultivo de la cepa silvestre, y superior a la detectada en el caso de *apm1Δ* y *rho3Δ* indicando que apenas existía defecto en este proceso en ausencia del complejo Cfr1/Bch1. Los datos representados en la gráfica son una media de cuatro experimentos independientes.

Este resultado permitió descartar que el exómero de *S. pombe* participe en el proceso general de secreción.

4.2 Relación entre el exómero de *S. pombe* y el adaptador AP-2

El complejo AP-2 es el mejor caracterizado dentro de la familia de los adaptadores AP (Boehm & Bonifacino, 2001; Reider & Wendland, 2011). Este adaptador se localiza en la membrana plasmática y participa en la endocitosis mediada por clatrina (Boehm & Bonifacino, 2001), un proceso que genera vesículas que parecen ser el origen de los endosomas tempranos. Además, como se ha mencionado antes, Cfr1-GFP co-localiza en los endosomas con el colorante FM4-64, que entra en las células por endocitosis. Teniendo en cuenta estos datos quisimos saber si existía algún tipo de interacción entre el adaptador AP-2 y el complejo Cfr1/Bch1 en *S. pombe*.

4.2.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles *cfr1Δ apl3Δ*

Como en el caso anterior, lo primero que nos planteamos fue analizar si existía interacción génica entre genes que codifican proteínas de estos dos complejos. Para poder estudiarlo se utilizó el mutante *apl3Δ* (carente de una de las subunidades mayores del complejo AP-2), el mutante *cfr1Δ* y el mutante doble *cfr1Δ apl3Δ*. Se realizó un ensayo de crecimiento en gota en medio rico a distintas temperaturas: 28°C, 32°C, 36°C y 37°C. Como podemos observar en la **figura 23A**, el mutante doble no presentaba crecimiento distinto al de los mutantes simples a ninguna de las temperaturas ensayadas.

Por tanto, este resultado nos indica que entre los genes *apl3⁺* y *cfr1⁺* no existe interacción génica para el crecimiento a temperatura alta.

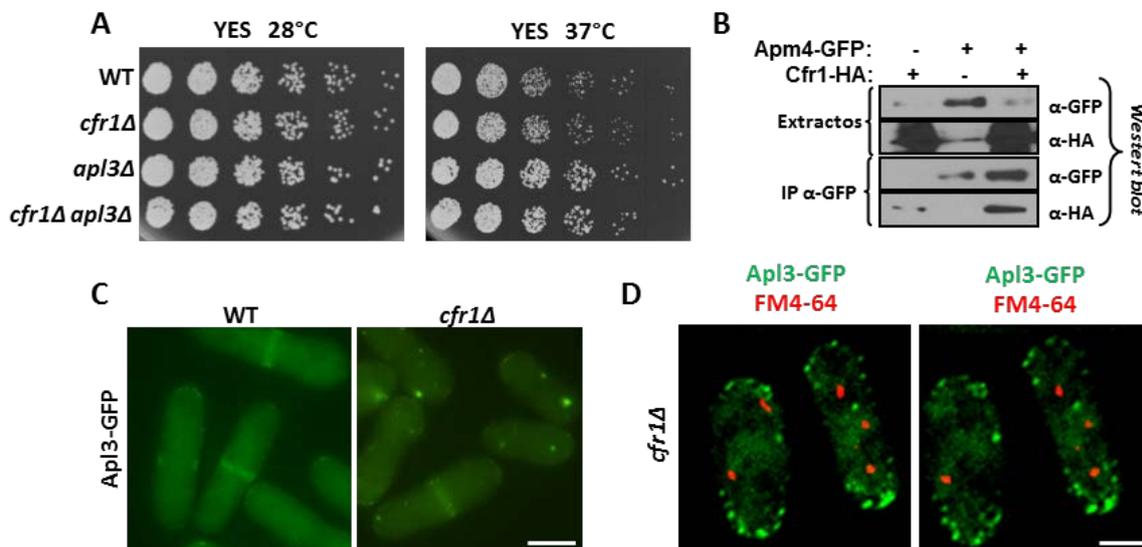


Figura 23. Relación entre el exómero de *S. pombe* y el adaptador AP-2.

A. El complejo Cfr1/Bch1 y el adaptador AP-2 no presentan interacción génica.

Ensayo de crecimiento en gota a partir de una suspensión que contenía 3×10^4 células y diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ de las cepas indicadas en placas de medio rico (YES). Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2 (37°C) ó 3 (28°C) días.

B. Apm4 y Cfr1 co-inmunoprecipitan.

Los dos paneles superiores muestran ensayos de *Western blot* de extractos totales de las cepas que portan las proteínas marcadas que se indican, revelados con anticuerpos anti-GFP o anti-HA. Los dos paneles inferiores muestran ensayos de *Western blot* de las proteínas inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo policlonal anti-GFP y revelados con los anticuerpos monoclonales indicados.

C. La proteína Apl3-GFP del complejo AP-2 se deslocaliza en el mutante *cfr1Δ*.

Las fotografías de fluorescencia muestran la localización de la proteína Apl3-GFP en una cepa silvestre (WT) y en el mutante *cfr1Δ*. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

D. Los puntos citoplasmáticos de Apl3-GFP en el mutante *cfr1Δ* no co-localizan con los endosomas tempranos.

Fotografías de fluorescencia donde aparecen marcados en las mismas células la proteína de fusión Apl3-GFP y los endosomas tempranos mediante el colorante FM4-64 (5 minutos). Las imágenes son un plano medio de las células adquiridas con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μ m.

4.2.2 Las proteínas Cfr1 y Apm4 interaccionan físicamente

Al igual que se hizo en el caso del complejo AP-1, quisimos comprobar si entre el complejo Cfr1/Bch1 y el adaptador AP-2 existía algún tipo de interacción física y para ello realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1 y Apm4 (subunidad mediana del adaptador AP-2). Las cepas utilizadas portaban cada una de las proteínas marcada con un epítipo diferente, (Cfr1-HA o Apm4-GFP) o las dos proteínas marcadas con dichos epítipos en la misma cepa. Después de la realización del ensayo pudimos comprobar que la proteína Cfr1-HA aparecía en los

inmunoprecipitados (IP) de una cepa que poseía marcadas las dos proteínas con mayor intensidad que en la cepa donde solo Cfr1-HA estaba marcada, en este caso seguramente se tratase de una banda inespecífica (**Figura 23B**). La interacción entre Cfr1 y Apm4 parece ser más débil que la interacción entre Cfr1 y Apm1.

Con este resultado podíamos confirmar que, además de estar presente en los mismos orgánulos, entre el exómero y AP-2 de *S. pombe* existe interacción física de algún tipo.

4.2.3 Localización de la proteína Apl3 en el mutante *cfr1Δ*

Nos planteamos a continuación analizar si la localización del complejo AP-2 sería la misma en una cepa silvestre y en una cepa mutante *cfr1Δ*. Para poder comprobar si esto era así se construyó una cepa con la proteína Apl3 fusionada a la GFP y el gen *cfr1⁺* deletado (*cfr1Δ* Apl3-GFP). Se utilizó una subunidad de AP-2 diferente que en el ensayo de inmunoprecipitación porque habíamos observado que Apl3 daba una señal más fuerte que Apm4 por microscopía, mientras que Apm4-GFP se detectaba mejor que Apl3-GFP por *Western blot*. Después de la realización de fotografías de fluorescencia pudimos comprobar que Apl3-GFP presentaba distinto patrón de localización en las dos cepas estudiadas. Como se ha descrito ([de León et al., 2013](#)) en una cepa silvestre la proteína Apl3 aparecía localizada mayoritariamente como puntos alineados en la membrana de la zona media y de los polos de la célula; sin embargo en el mutante *cfr1Δ* una parte de la proteína presentaba una localización anómala apareciendo como puntos brillantes en el citoplasma (**Figura 23C**). Por ello, este resultado nos permitió concluir que el adaptador AP-2 necesita la presencia del exómero para su correcta localización en *S. pombe*. Quisimos saber si estos puntos que aparecían en el citoplasma del mutante podían ser endosomas tempranos. Para poder comprobarlo, se realizó tinción con el colorante lipofílico FM4-64 que como ya se ha mencionado a tiempo corto (5 minutos) marca estas estructuras. Al analizar las imágenes de fluorescencia comprobamos que Apl3-GFP y el marcaje de los endosomas tempranos, aunque a veces se encontraban adyacentes, no llegaban a co-localizar (**Figura 23D**). Por lo tanto, el adaptador AP-2 no se acumulaba en endosomas tempranos en ausencia de *cfr1⁺*. En cualquier caso, aunque desconocemos la

naturaleza de esta acumulación de Apl3 en el citoplasma, podemos concluir que el complejo AP-2 tiene un comportamiento aberrante en ausencia del exómero de *S. pombe*.

4.3 Relación entre el exómero de *S. pombe* y los adaptadores GGA

Los GGAs son adaptadores de las vesículas de clatrina que regulan el tráfico intracelular desde el TGN hacia el PVC. En *S. pombe* se han identificado dos de estos adaptadores denominados Gga21 y Gga22 (Boehm & Bonifacino, 2001).

4.3.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles *cfr1Δ gga21Δ* y *cfr1Δ gga22Δ* y del mutante triple *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ*

Para poder comprobar si existía o no interacción génica entre los genes *cfr1⁺* y *gga21⁺* y/o *gga22⁺* se realizó un ensayo de crecimiento en gota. En este ensayo se analizó el crecimiento de los mutantes dobles *cfr1Δ gga21Δ* y *cfr1Δ gga22Δ* y del mutante triple *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ* en medio rico (YES) a distintas temperaturas: 22°C, 28°C y 36°C. Como se puede observar en la [figura 24A](#) el mutante *cfr1Δ gga22Δ* crece peor a 22°C que el mutante simple *gga22Δ*. También se observó que el mutante doble *gga21Δ gga22Δ* es criosensible, presentando un crecimiento muy reducido a 22°C. El mutante triple es aún más sensible al frío ya que no fue capaz de crecer nada a 22°C. Por otro lado, si observamos lo que ocurre en placas a 36°C vemos que el mutante doble *cfr1Δ gga22Δ* crece menos que el mutante simple *gga22Δ* y además que el mutante triple crece también peor que el mutante doble *gga21Δ gga22Δ* ([Figura 24A](#)).

Estos resultados demostraron que entre el gen *cfr1⁺* y el gen *gga22⁺* existe interacción génica y que los genes *gga21⁺* y *gga22⁺* no tienen la misma función.

4.3.2 Las proteínas Cfr1 y Gga22 interaccionan físicamente

La interacción entre el complejo Cfr1/Bch1 y el adaptador Gga22 se analizó con un ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1-HA y Gga22-GFP. De tal

forma que los extractos celulares procedentes de las cepas que portaban una de las proteínas de fusión (Cfr1-HA y Gga22-GFP) o la cepa que portaba las dos proteínas de fusión se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal anti-GFP. Se realizó un ensayo tipo *Western blot* utilizando anticuerpos anti-HA o anti-GFP para la detección de las proteínas marcadas en los inmunoprecipitados (IP) y en los extractos celulares (Figura 24B).

Con este resultado podíamos confirmar que entre, Cfr1 y Gga22, existe interacción física. La interacción entre estos dos complejos parecía ser más débil que la interacción entre el exómero y AP-1.

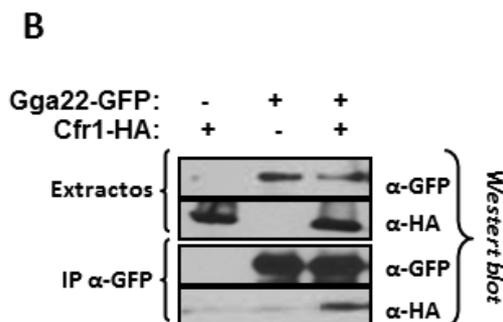
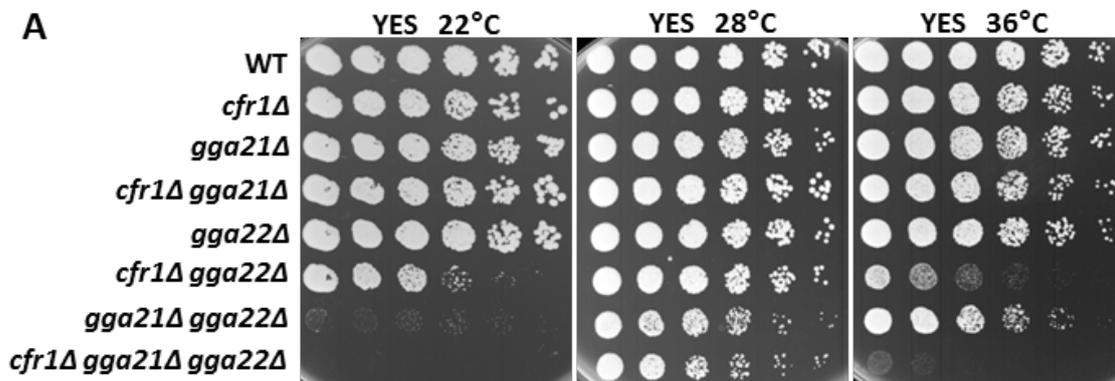


Figura 24. Relación entre el exómero de *S. pombe* y los adaptadores GGA.

A. El complejo Cfr1/Bch1 presenta interacción génica con los adaptadores GGAs.

Ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) en las que se habían inoculado diluciones seriadas de suspensiones de células de las cepas indicadas. A partir de una suspensión que contenía 3×10^4 células se hicieron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-5 días dependiendo de la temperatura.

B. Gga22 y Cfr1 co-inmunoprecipitan

Extractos celulares de las cepas que expresan las proteínas de fusión Gga22-GFP y/o Cfr1-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 (IP) y se analizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-GFP y anti-HA.

4.4 Relación entre el exómero de *S. pombe* y el adaptador AP-3

El adaptador AP-3 está relacionado con el transporte de proteínas desde el TGN a las vacuolas y, a pesar de pertenecer a la familia de los complejos AP, su función parece ser independiente de clatrina en levaduras (Boehm & Bonifacino, 2001; Dell'Angelica, 2009).

4.4.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles *cfr1Δ apm3Δ*

En este caso también se realizó el ensayo de crecimiento en medio rico a distintas temperaturas de incubación para comprobar la existencia de posible interacción génica entre los genes *apm3⁺* (subunidad mediana del complejo AP-3) y el gen *cfr1⁺*. Los resultados obtenidos mostraron que no existe interacción génica entre ellos (Figura 25A).

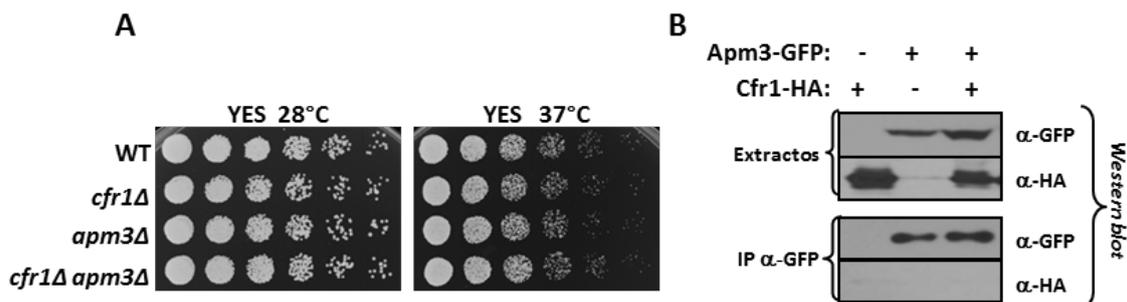


Figura 25. Relación entre el exómero de *S. pombe* y el adaptador AP-3.

A. Ensayo de crecimiento en gota en medio rico YES, en los que se habían inoculado diluciones seriadas de suspensiones de células de las estirpes indicadas. El primer inóculo contenía 3×10^4 células y los sucesivos inóculos contenían diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ del mismo. Las placas se incubaron durante 2 (37°C) ó 3 (28°C) días.

B. Ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1-HA y Apm3-GFP. Los dos paneles superiores muestran ensayos de *Western blot* de extractos totales de las cepas que portan las proteínas marcadas que se indican, revelados con anticuerpos anti-GFP o anti-HA. Los dos paneles inferiores muestran ensayos de *Western blot* de las proteínas inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo policlonal anti-GFP y revelados con los anticuerpos monoclonales indicados.

4.4.2 Las proteínas Cfr1 y Apm3 no interaccionan físicamente

A pesar de que no habíamos visto ningún tipo de interacción génica entre los complejos Cfr1/Bch1 y AP-3, decidimos analizar si ambos interaccionaban físicamente. Para ello utilizamos como componente de complejo AP-3 la proteína Apm3-GFP y como en anteriores ocasiones la proteína Cfr1-HA como componente del exómero.

Una vez que realizamos el ensayo, llevado a cabo como en los casos anteriores, observamos que en este caso no existía interacción física entre ambas proteínas (**Figura 25B**). Estos resultados indican que no existe interacción alguna entre estos dos complejos en *S. pombe*.

4.5 Relación entre el exómero de *S. pombe* y la clatrina

Todos estos resultados descritos hasta aquí demuestran que hay algún tipo de interacción entre el complejo Cfr1/Bch1 y los diferentes complejos adaptadores que se unen a clatrina (AP-1, AP-2 y GGAs), mientras que no la hay con AP-3 que en levaduras no se une a clatrina (Hirst & Robinson, 1998; Nakayama & Wakatsuki, 2003). Estos resultados nos llevaron a plantearnos si existiría algún tipo de relación entre el exómero de *S. pombe* y la clatrina.

4.5.1 Análisis del fenotipo de los mutantes dobles *cfr1Δ clc1-232*

Lo primero que teníamos que hacer para analizar cualquier tipo de interacción era la construcción de un mutante doble *cfr1Δ clc1Δ*. En el caso de *S. pombe* esta construcción no era sencilla debido a que el gen que codifica para la cadena ligera de la clatrina (*clc1⁺*) es esencial en ausencia de sorbitol, y está muy enfermo en presencia del estabilizador osmótico (de León, *et al.*, 2013). Por ello recurrimos a utilizar una cepa que porta una mutación puntual denominada *clc1-232*. Una vez obtenida la cepa con la doble mutación pasamos a realizar un ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) para analizar el crecimiento del mutante doble *cfr1Δ clc1-232* en relación al de una cepa control (WT) y al de los mutantes simples *cfr1Δ* y *clc1-232* a distintas temperaturas. Como se puede observar en la **figura 26A**, el mutante doble no crecía peor que el mutante simple *clc1-232* a ninguna de las temperaturas ensayadas: 25°C, 28°C, 32°C y 34°C.

Estos datos permitieron concluir que no existe interacción génica entre los genes *cfr1⁺* y *clc1⁺* y sugieren que el exómero actúa en los mismos procesos en los que actúa la clatrina, colaborando con cada uno de sus adaptadores en aquellas rutas de transporte vesicular en las que participan.

4.5.2 Las proteínas Cfr1 y Clc1 no interactúan físicamente

Como ya se ha descrito en el caso de AP-2, el hecho de que no existiera interacción génica para el crecimiento a alta temperatura entre genes que codifican componentes del adaptador de clatrina y del exómero no significaba que no pudiera existir una interacción de tipo físico entre sus componentes. Cuando se realizó la co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1-HA y Clc1-GFP se observó que no co-inmunoprecipitaban, es decir, que entre ambas proteínas no existía interacción física (**Figura 26B**). Como control del experimento se incluyó la cepa que portaba Cfr1-HA y Apm1-GFP. El hecho de no detectar interacción física entre Cfr1 y Clc1 no nos sorprendió demasiado debido a que en *S. cerevisiae* también se ha descrito que no hay interacción física entre el exómero y la clatrina (Sanchatjate & Scheckman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006).

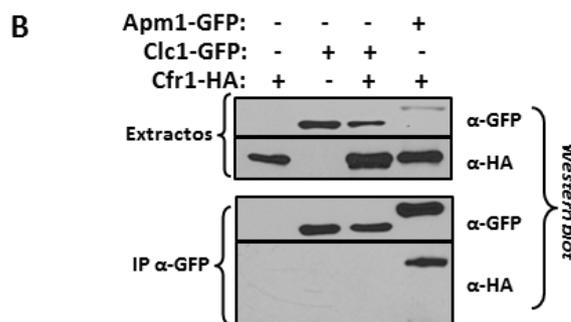
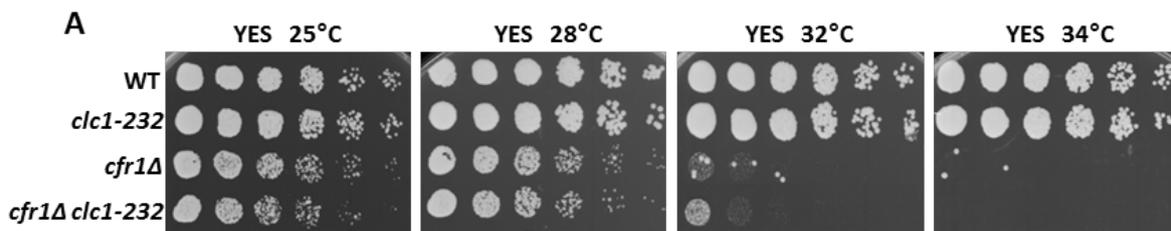


Figura 26. Relación entre el exómero de *S. pombe* y la clatrina.

A. El complejo Cfr1/Bch1 y la clatrina no presentan interacción génica.

Ensayo de crecimiento en gota a partir de una suspensión que contenía 3×10^4 células y diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ de las cepas indicadas en placas de medio rico (YES). Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-5 días dependiendo de la temperatura.

B. Clc1-GFP y Cfr1-HA no co-inmunoprecipitan.

Los dos paneles superiores muestran ensayos de *Western blot* de extractos totales de las cepas que portan las proteínas marcadas que se indican, revelados con anticuerpos anti-GFP o anti-HA. Los dos paneles inferiores muestran ensayos de *Western blot* de las proteínas inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo policlonal anti-GFP y revelados con los anticuerpos monoclonales indicados. La cepa que porta Apm1-GFP y Cfr1-HA se utilizó como control positivo del experimento.

En resumen, en este apartado hemos visto que el exómero de *S. pombe* presenta algún tipo de interacción con cada uno de los adaptadores de las vesículas de clatrina. Con el adaptador AP-1 (tráfico bidireccional entre TGN y endosomas tempranos) hemos detectado tanto interacción génica como interacción física. En el caso del adaptador AP-2 (endocitosis) hemos visto que éste necesita al exómero para su correcta localización y además hemos detectado interacción física. Por último, con los adaptadores GGA (tráfico entre el TGN y el PVC) presenta tanto interacción génica como física. Dado que el exómero no presenta interacción física con la clatrina, que forma parte de la cubierta junto con el adaptador, estos datos sugieren que la interacción con los adaptadores ocurre antes de que se produzca el ensamblaje de las cubiertas de clatrina o después del desensamblaje de las mismas.

5. Relación entre el exómero y la síntesis de pared celular en *S. pombe*

Como ya se ha mencionado la pared celular fúngica es una estructura externa a la membrana plasmática implicada en numerosos e importantes procesos celulares. La pared celular de esta levadura de fisión está formada por tres componentes mayoritarios: β -glucanos (50-54% del total), α -glucanos (18-28% del total) y galactomanano (9-14% del total) (Ishiguro, 1998). Dado que la función mejor caracterizada del exómero en *S. cerevisiae* está relacionada con la síntesis de la pared celular (en concreto con la síntesis de quitina), que en *S. pombe* el polímero estructural mayoritario de esta estructura no es la quitina sino el β -glucano, y que habíamos observado que el mutante *cfr1 Δ* era ligeramente sensible a antifúngicos que inhiben la síntesis del $\beta(1,3)$ glucano (Figura 12C), decidimos estudiar en más detalle la existencia de alguna relación entre el complejo Cfr1/Bch1 de *S. pombe* y la síntesis de este polímero. La cuestión en la que queríamos profundizar era si el exómero de *S. pombe* está implicado en la síntesis de la pared celular. Los genes encargados de la síntesis del $\beta(1,3)$ -glucano se denominan $\beta(1,3)$ -glucán sintasa (β GS) y son esenciales.

5.1 Interacción génica entre el gen *cfr1*⁺ y los genes que codifican las enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa

5.1.1 Análisis de la existencia de interacción génica entre *cfr1*⁺ y *bgs1*⁺

Debido a que el gen *bgs1*⁺ es esencial hemos utilizado la mutación *cps1-191* (Ishiguro *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2007) para el análisis. Se construyó el mutante doble *cfr1* Δ *cps1-191* de tal forma que, si el gen *cfr1*⁺ produjera algún defecto en la síntesis de la pared celular, debería agravar el fenotipo del mutante *cps1-191* que es termosensible.

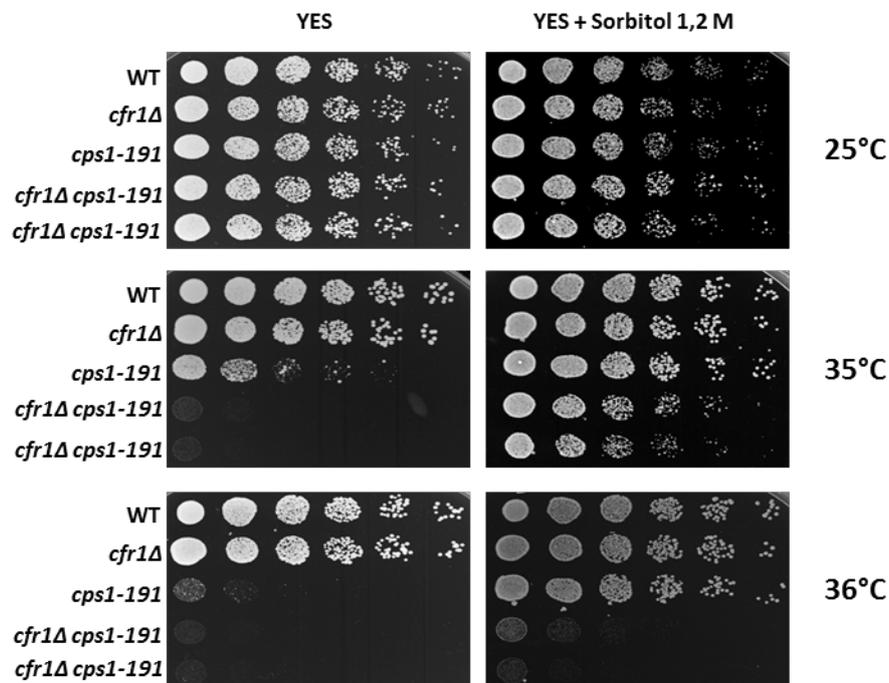


Figura 27. Los genes *cfr1*⁺ y *bgs1*⁺ interaccionan, de modo que mutaciones en los mismos tienen efectos sinérgicos.

Análisis del crecimiento de las cepas indicadas en placas de medio rico (YES) o YES con sorbitol 1,2 M incubadas a las temperaturas indicadas. Los inóculos iniciales corresponden a 3×10^4 células y los siguientes son diluciones $\frac{1}{4}$ del mismo. Las placas han sido incubadas durante 2-5 días dependiendo de la temperatura.

Para la obtención de dicha información se analizó el crecimiento de una cepa silvestre, de los mutantes simples *cfr1* Δ y *cps1-191* y del mutante doble *cfr1* Δ *cps1-191* en medio rico (YES) a distintas temperaturas. Además el ensayo se realizó también añadiendo a las placas el estabilizador osmótico sorbitol a una concentración de 1,2 M. Este compuesto protege a las células con una pared celular dañada de la lisis osmótica.

Como se puede observar en la **figura 27**, a 25°C las cuatro cepas tenían un crecimiento similar tanto en YES como en YES con sorbitol. Sin embargo, a 35°C el mutante *cps1-191* tenía un crecimiento reducido respecto a la cepa control (WT), y el mutante doble no crecía. Estos defectos en el crecimiento se solucionaron con el sorbitol, ya que al añadirlo al medio las cuatro cepas eran capaces de crecer. Por último a 36°C ni el mutante sencillo *cps1-191* ni el mutante doble *cfr1Δ cps1-191* eran capaces de crecer en YES, mientras que en el medio con sorbitol el mutante simple recuperaba el crecimiento pero el mutante doble no. Esto podría indicarnos que o bien el mutante *cfr1Δ* tiene defectos adicionales a la síntesis de pared celular o que los defectos en la pared celular eran tan drásticos que no podían corregirse con la presencia del sorbitol.

Por último, analizamos la morfología de las células de los mutantes. Para ello estas cepas se cultivaron en medio líquido YES a 25°C y a 37°C durante 5 horas y se tiñeron con calcoflúor para poder observar los posibles defectos morfológicos en las células de los distintos mutantes. A 25°C ambos mutantes simples *cfr1Δ* y *cps1-191* presentaban una morfología similar a la de la cepa WT. El mutante doble *cfr1Δ cps1-191* presentaba algunos defectos: en algunos casos las células eran más anchas en un extremo o en todo el contorno, perdiendo su forma cilíndrica; también se pudieron observar engrosamientos de la pared celular lateral en algunas células. Estos defectos morfológicos del mutante doble se corregían con la presencia de sorbitol 1,2 M en el medio de cultivo. Cuando las células se incubaron a la temperatura restrictiva de 37°C en el mutante simple *cps1-191* podíamos observar células aberrantes, engrosamientos en la pared celular lateral y además algunas células lisadas. Todos estos defectos se incrementaban en el mutante doble *cfr1Δ cps1-191*, en el que apenas podíamos observar células con una morfología cilíndrica típica de una cepa control. En este caso al añadir el sorbitol 1,2 M al medio de cultivo veíamos que se corregían parcialmente los defectos en el mutante simple *cps1-191* pero no en el mutante doble *cfr1Δ cps1-191* (**Figura 28**). En ambos mutantes apareció un fenotipo diferente, que es la presencia de células encadenadas.

Todos estos resultados nos indican que entre los genes que codifican un componente del exómero de *S. pombe* y la enzima β-glucán sintasa Bgs1 existe interacción génica, ya que mutaciones en ambos presentan efectos sinérgicos. Por

tanto, ambos podrían colaborar en la síntesis del β -glucano de la pared celular de la levadura de fisión.

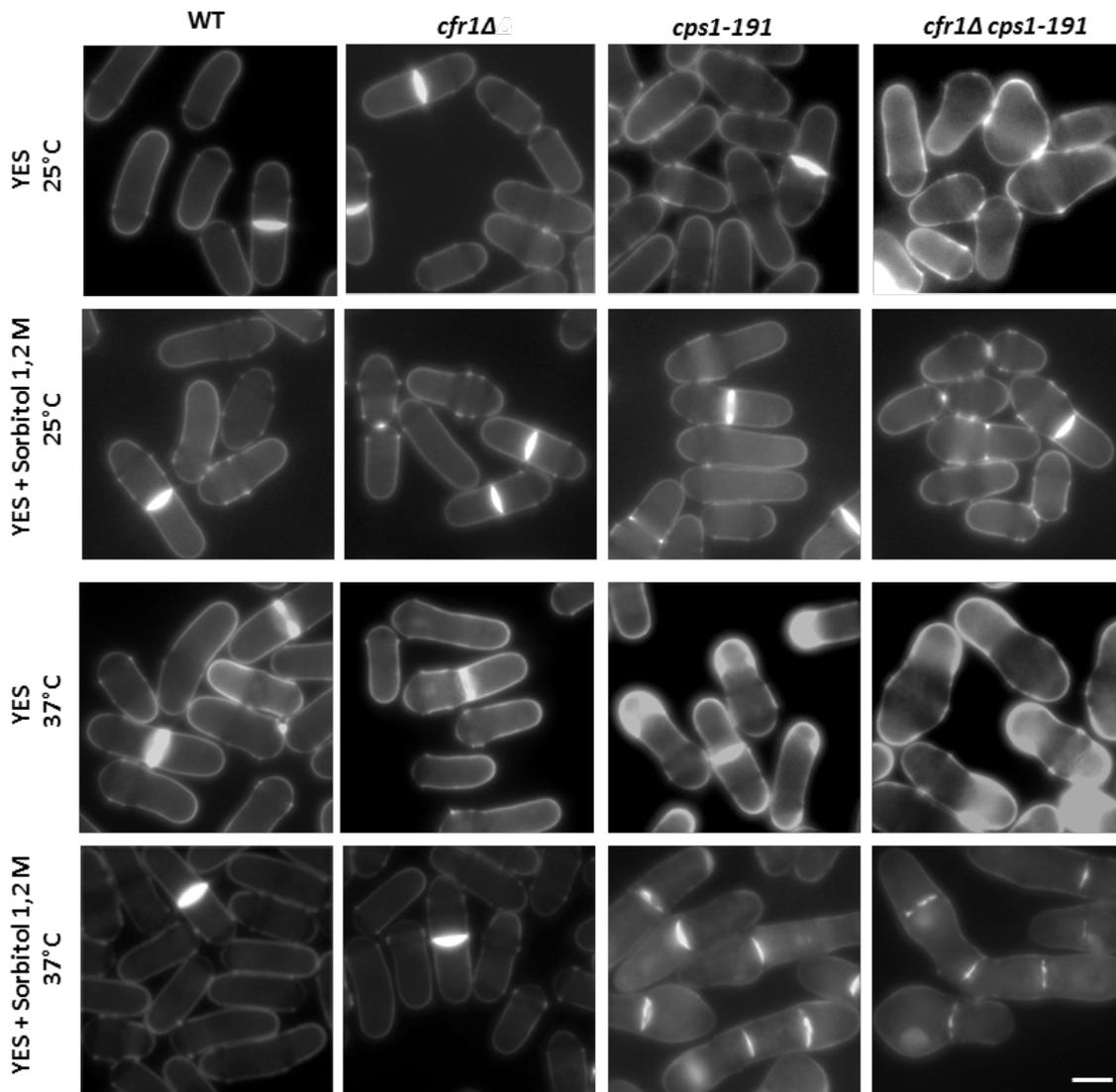


Figura 28. Morfología de los mutantes dobles *cfr1Δ cps1-191*.

Células de las cepas indicadas, procedentes de cultivos en medio líquido YES o YES con sorbitol 1,2 M incubados a 25°C o 37°C durante 5 horas, teñidas con calcoflúor (tinción específica de pared celular). Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

5.1.2 Análisis de la existencia de interacción génica entre *cfr1⁺* y *bgs4⁺*

La mutación *cwg1-1* es una mutación puntual en el gen *bgs4⁺*, otra de las enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa de *S. pombe* (Ribas *et al.*, 1991; Cortés *et al.*, 2005). Esta mutación produce termosensibilidad, que va acompañada por la lisis de un cierto número de células del mutante *cwg1-1* a 37°C. Para poder saber si el complejo

Cfr1/Bch1 de *S. pombe* estaba relacionado funcionalmente con Bgs4 se construyó el mutante doble *cfr1Δ cwg1-1*, y se analizó la existencia de interacción génica observando el crecimiento en medio rico (YES) de un WT, los mutantes simples *cfr1Δ* y *cwg1-1*, y el mutante doble a distintas temperaturas: 25°C, 28°C, 32°C, 34°C, 35°C y 36°C. A todas las temperaturas ensayadas tanto los mutantes simples *cfr1Δ* y *cwg1-1* como el mutante doble *cfr1Δ cwg1-1* crecían de manera similar a la cepa WT (Figura 29A). Sin embargo, cuando las células procedentes de las placas incubadas a 37°C se teñieron con calcoflúor se observó que células de los tres mutantes presentaban lisis y multiseptación.

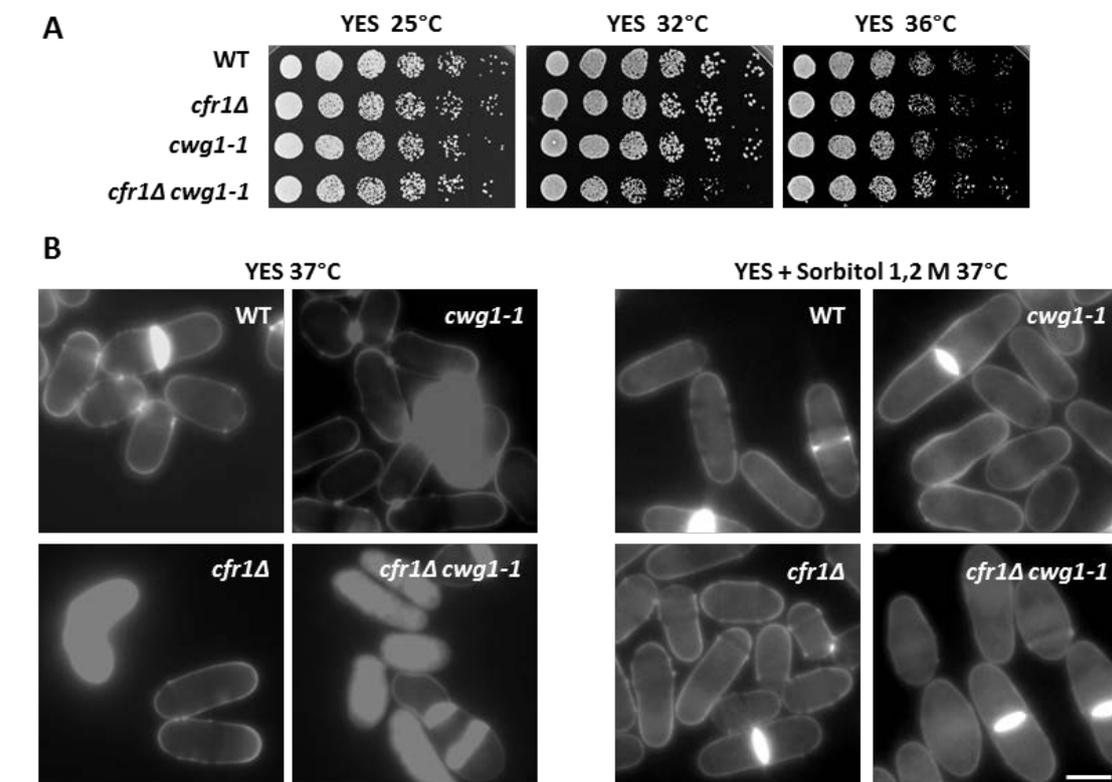
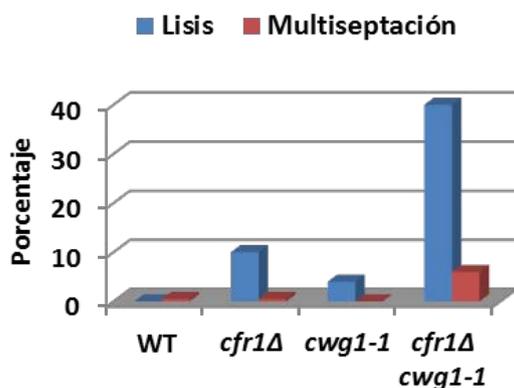


Figura 29. Los genes *cfr1*⁺ y *bgs4*⁺ interaccionan, de modo que mutaciones en los mismos tienen efectos sinérgicos.

A. Ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) de las cepas indicadas. A partir de una suspensión que contenía 3x10⁴ células se hicieron diluciones seriadas ¼. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-3 días en función de la temperatura.

B. Células de las cepas indicadas, procedentes de cultivos en medio líquido YES o YES con sorbitol 1,2 M incubados a 37°C durante 16 horas, teñidas con calcoflúor (tinción específica de pared celular). Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 µm. La gráfica de la derecha muestra la cuantificación del número de células lisadas y multiseptadas.



Con el fin de poder cuantificar mejor estos resultados se realizó el siguiente experimento: células de las cuatro cepas de interés (WT, *cfr1Δ*, *cwg1-1* y *cfr1Δ cwg1-1*) se cultivaron en medio líquido YES a 37°C durante 16 horas. Las células se tiñeron con calcoflúor y se cuantificaron por un lado las células lisadas y por el otro las células multiseptadas. Como era de esperar en la cepa silvestre el fenotipo de lisis y multiseptación era prácticamente nulo (**Figura 29B**). A continuación, nos fijamos en el mutante *cfr1Δ* donde un 10% de las células estaban lisadas y no encontramos ninguna célula multiseptada. El mutante simple *cwg1-1* presentaba un 4% de lisis y nada de multiseptación. Por último, en el mutante doble la lisis aumentaba hasta un 40% y el fenotipo de multiseptación hasta el 6%. Cuando este mismo experimento se realizó cultivando las cuatro cepas de interés en medio líquido YES suplementado con sorbitol a una concentración del 1,2 M se observó que en ninguna de las cuatro cepas aparecía fenotipo ni de lisis ni de multiseptación, aunque las células del mutante doble eran más redondeadas que las de las otras tres cepas (**Figura 29B**).

Estos resultados demostraron que existe interacción génica entre los genes *cfr1⁺* y *bgs4⁺*, debido a que mutaciones en los mismos presentan efectos sinérgicos en el crecimiento y la morfología celular. El hecho de que el mutante doble *cfr1Δ cps1-191* presente defectos más drásticos en el crecimiento que el mutante doble *cfr1Δ cwg1-1* puede deberse a una relación funcional distinta entre el complejo Cfr1/Bch1 y cada una de las enzimas βGS, o más probablemente a la naturaleza de cada mutante puntual, ya que el mutante sencillo *cps1-191* presenta más defectos en el crecimiento que el mutante sencillo *cwg1-1*. No obstante, los datos mostrados están de acuerdo con el hecho de que el exómero de *S. pombe* pueda jugar algún papel en la síntesis de la pared celular.

5.2 Análisis de la composición de la pared celular en los mutantes carentes del exómero en *S. pombe*

Para confirmar que el complejo Cfr1/Bch1 es necesario en la síntesis de la pared celular de *S. pombe* se analizó la composición de la misma, es decir el porcentaje de los distintos polisacáridos que formaban parte de la pared celular en los mutantes simples

cfr1Δ y *bch1Δ* y en el mutante doble *cfr1Δ bch1Δ* en comparación a una cepa WT. Los resultados presentados en este trabajo se corresponden con los datos obtenidos en seis experimentos independientes en los que se hicieron duplicados de cada reacción enzimática.

La **figura 30** muestra que la incorporación de glucosa marcada con ^{14}C en la pared celular, con respecto al total de ^{14}C incorporado fue bastante similar en las distintas cepas estudiadas, en torno al 42-44%. 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 en la cantidad de $\beta(1,3)$ -glucano en los tres mutantes respecto a la cepa WT que se compensa con un aumento de la cantidad de α -glucano, como está descrito para otros mutantes afectados en la cantidad de $\beta(1,3)$ -glucano (Ribas *et al.*, 1991). Por último, encontramos distintas variaciones respecto a la cantidad de manano. El mutante *cfr1Δ* presenta una mayor cantidad, mientras que el mutante *bch1Δ* y el mutante doble *cfr1Δ bch1Δ* presentan prácticamente la misma cantidad que la cepa WT.

Este resultado está confirmando que efectivamente el exómero de *S. pombe* es necesario para que la síntesis de la pared celular suceda de forma correcta.

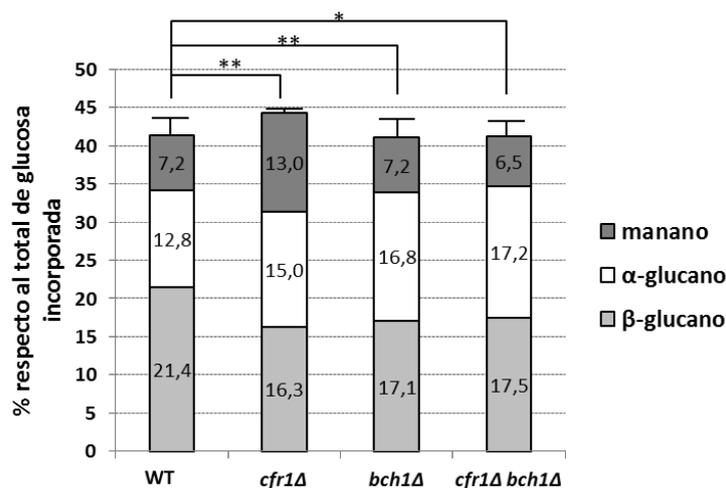


Figura 30. La síntesis de la pared celular está alterada en ausencia del exómero en *S. pombe*.

Análisis de la pared celular de una cepa silvestre (WT) y de los mutante *cfr1Δ*, *bch1Δ* y *cfr1Δ bch1Δ*. Las células fueron incubadas a 28°C en medio YES. En la gráfica se representan los niveles relativos de incorporación de ^{14}C -glucosa en cada uno de los polímeros de la pared celular. Los valores representados son la media de seis experimentos independientes con muestras duplicadas. Las barras de error representan la desviación estándar de la incorporación de ^{14}C -glucosa en la pared. Los números en las barras indican el porcentaje de cada uno de los polímeros que forman la pared celular de cada una de las cepas. La significación estadística se obtuvo mediante test ANOVA con comparación múltiple de Dunnett de la cantidad de β -glucano de cada una de las cepas respecto al WT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.3 El exómero de *S. pombe* interactúa físicamente con las enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa

El resultado anterior demostraba que el exómero de *S. pombe* es necesario para la síntesis de la pared celular de la levadura y concretamente para la síntesis del $\beta(1,3)$ -glucano, componente mayoritario de su pared celular. Una de las cuestiones que quisimos abordar fue si existía algún tipo de interacción física entre estas proteínas, lo que podía indicar que las proteínas β GS son cargos del exómero. Para comprobar esta posibilidad realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación. Para poder llevar a cabo estos experimentos se utilizó la cepa que portaba Cfr1-HA como marcador del exómero, la enzima β -glucán sintasa marcada con GFP (GFP-Bgs4) y una cepa con el doble marcaje, es decir que portaba Cfr1-HA y GFP-Bgs4. Después de realizar el ensayo de co-inmunoprecipitación, en este caso con algunas variaciones sobre el protocolo habitual por tratarse de proteínas transmembranales (ver subapartado 6.4.1 de Materiales y Métodos), observamos que la proteína Cfr1-HA aparecía en los inmunoprecipitados (IP) de una cepa que llevaba el marcaje de las dos proteínas. Aunque es cierto que en la cepa donde solo Cfr1-HA estaba marcada presentaba una banda que probablemente era inespecífica, ésta era mucho más tenue que la banda que correspondía a la co-inmunoprecipitación entre las proteínas de interés (**Figura 31**).

Este mismo experimento se realizó con Bgs3, una enzima $\beta(1,3)$ -glucán sintasa necesaria para el mantenimiento de la viabilidad celular y la polaridad durante el crecimiento vegetativo (Martín *et al.*, 2003). Como podemos observar en la **figura 31**, el resultado obtenido también mostraba que las proteínas Cfr1 y Bgs3 co-inmunoprecipitan.

Este experimento no se realizó con la enzima Bgs1, pero por los resultados obtenidos en algunos de los apartados anteriores creemos que es muy probable que también exista esta interacción.

Por tanto, parece que existe interacción física, aunque no sabemos si de forma directa, entre un componente del exómero y las enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa de *S. pombe*, o al menos con algunas de ellas (Bgs3 y Bgs4). Aun teniendo en cuenta que las

co-inmunoprecipitaciones con proteínas transmembranales son difíciles, debido a que pueden dar falsos positivos si las proteínas no se extraen bien de la membrana (ya que pueden estar adyacentes en micelas sin que haya contacto entre ellas), los resultados anteriores son una evidencia fuerte de que el exómero interacciona físicamente con las enzimas β GS.

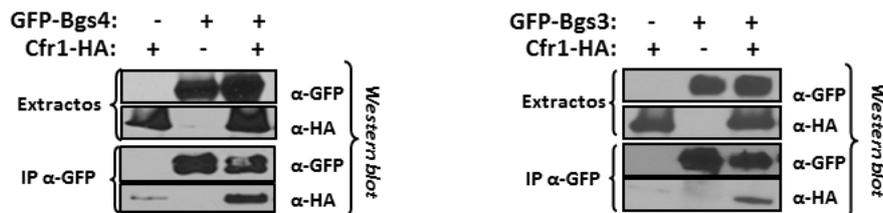


Figura 31. El exómero interacciona físicamente con las enzimas β (1,3)-glucán sintasa.

Los dos paneles superiores muestran ensayos de *Western blot* de extractos totales de las cepas que portan las proteínas marcadas que se indican, revelados con anticuerpos anti-GFP o anti-HA. Los dos paneles inferiores muestran ensayos de *Western blot* de las proteínas inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo policlonal anti-GFP y revelados con los anticuerpos monoclonales indicados.

5.4 El exómero y la enzima β -glucán sintasa Bgs4 co-localizan

Por último, y como experimento complementario al anterior, quisimos comprobar que el complejo Cfr1/Bch1 de *S. pombe* y las proteínas β (1,3)-glucán sintasa estaban presentes en los mismos compartimentos intracelulares. Para poder resolver esta cuestión se realizó el seguimiento de las proteínas en vivo mediante un experimento *time lapse* con un microscopio confocal, tomándose imágenes cada 2 segundos. Con este fin se utilizó una cepa con la proteína Cfr1 marcada con la GFP y con la proteína Bgs4 marcada la RFP. Estas dos proteínas co-localizaban, es decir, aparecían juntas (puntos amarillos en la [figura 32A](#)). Realizamos la cuantificación con el programa JaCoP (*Just another Colocalization Plugin*) del software ImageJ y los resultados ([Figura 32B](#)) mostraron que un 41% de los puntos correspondientes a la proteína de fusión Cfr1-GFP co-localizaban con la proteína Bgs4, mientras que un 80% de los puntos citoplasmáticos de la proteína de fusión RFP-Bgs4 co-localizaban con Cfr1 ([Figura 32B](#)). No obstante, como se ha descrito anteriormente la proteína Bgs4 se localiza mayoritariamente en la membrana del ecuador y de los polos celulares, y de manera minoritaria en estructuras discretas en el citoplasma. Por ello para poder realizar la cuantificación se precisa de una tinción con calcoflúor, que posteriormente nos ha

servido para poder descartar el marcaje de la proteína de fusión RFP-Bgs4 de la superficie celular, y así cuantificar solamente la co-localización de Cfr1-GFP con los puntos intracelulares de RFP-Bgs4. En las películas (Figura 32C) se observa que las dos proteínas se mueven a la vez a lo largo del tiempo, confirmando que no se trata de una co-localización casual en un momento dado.

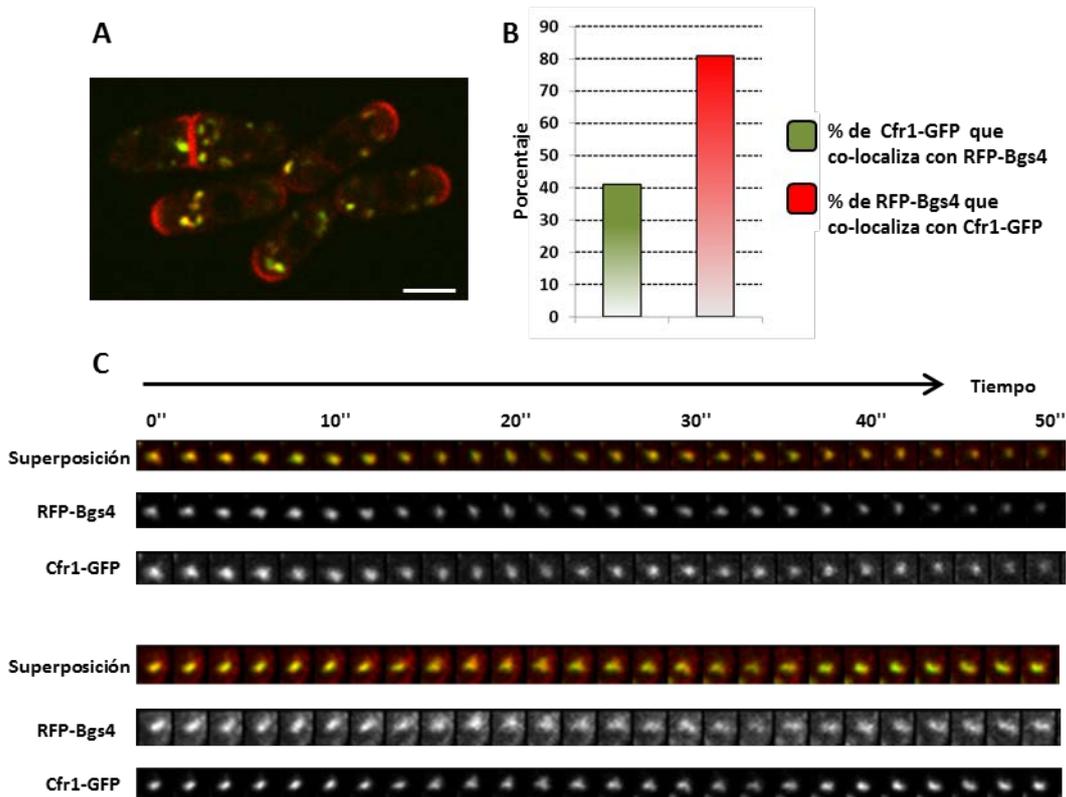


Figura 32. Co-localización del exómero y la enzima β GS Bgs4.

A. Imagen de fluorescencia de algunas de las células a partir de las cuales se obtuvieron las películas posteriores. Los puntos amarillos indican co-localización de Cfr1-GFP y RFP-Bgs4.

B. Cuantificación de % de vesículas citoplasmáticas de RFP-Bgs4 que co-localizan con Cfr1-GFP y viceversa.

C. Fotografías de fluorescencia de una cepa con las proteínas de fusión Cfr1-GFP y RFP-Bgs4 seguidas a lo largo del tiempo, así como una superposición de ambas imágenes. En la parte superior aparece el tiempo correspondiente indicado en segundos.

Las imágenes son un plano medio de las células adquiridas con un microscopio confocal Spinning-disk. Barra de escala, 5 μ m.

Todos los resultados mostrados en estos apartados (5.1 a 5.4) nos indican que entre el exómero de *S. pombe* y las enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa existe interacción génica. Además, hemos podido comprobar que ambas proteínas interactúan físicamente (co-inmunoprecipitan) y aparecen juntas en los mismos orgánulos subcelulares (co-localizan), siendo necesaria la presencia de dicho complejo y de dichas enzimas para que la pared celular de *S. pombe* se sintetice de forma adecuada.

5.5 El sorbitol corrige los defectos de crecimiento que presentan distintos mutantes relacionados con el tráfico vesicular

Ya habíamos estudiado en el apartado 4 de la sección de Resultados que el complejo Cfr1/Bch1 de *S. pombe* está relacionado funcionalmente con algunos de los adaptadores de las vesículas de clatrina implicadas en distintos aspectos del tráfico vesicular. Decidimos analizar si esta relación se debía a una cooperación entre estos adaptadores y el exómero en el proceso de síntesis de la pared celular.

Para llevar a cabo este análisis se estudió si la presencia del estabilizador osmótico sorbitol corregía los defectos de crecimiento de las cepas de interés. Como control inicial del experimento se analizó qué ocurría en el caso de cepas defectivas en clatrina ya que, aunque habíamos visto que no existía interacción génica entre *cfr1⁺* y la propia cubierta de clatrina (*clc1⁺*), se ha descrito que ésta es esencial para la síntesis del $\beta(1,3)$ -glucano (de León *et al.*, 2013). Cuando analizamos el crecimiento de una cepa control (WT), de los mutantes simples *cfr1 Δ* y *clc1-232* y del mutante doble *cfr1 Δ clc1-232* en medio YES con sorbitol 1,2 M a 34°C pudimos observar que el mutante simple *clc1-232* y el mutante doble *cfr1 Δ clc1-232* eran capaces de crecer en presencia del estabilizador osmótico, aunque no llegaban a los niveles de la cepa control (WT). Sin embargo en ausencia del sorbitol ninguno de los dos mutantes crecía a esa temperatura (Figura 33A). Este resultado nos indicó que la colaboración funcional entre el exómero y la clatrina podría estar ejerciéndose en el proceso de síntesis de la pared celular. A continuación analizamos si esta colaboración se restringía a alguno de los adaptadores de clatrina en concreto.

Al analizar la posible interacción entre el complejo Cfr1/Bch1 y el adaptador AP-1, el cual regula el tráfico bidireccional entre el TGN y los EEs, habíamos visto que a 34°C en medio rico (YES) no crecían ni el mutante simple *apm1 Δ* ni el mutante doble *apm1 Δ cfr1 Δ* , mientras que las cepas WT y *cfr1 Δ* sí que lo hacían. Decidimos realizar este mismo ensayo de crecimiento en gota pero en este caso el medio rico iba suplementado con el estabilizador osmótico sorbitol 1,2 M. Como se puede observar en la figura 33B el crecimiento de los mutantes *apm1 Δ* y *cfr1 Δ apm1 Δ* mejoró significativamente en presencia de este estabilizador osmótico.

Otros adaptadores de clatrina analizados fueron los GGAs que controlan el tráfico desde el aparato de Golgi al PVC. Hasta el momento habíamos visto que existía interacción génica entre *cfr1⁺* y los GGAs (en particular con *gga22⁺*) debido a que en un ensayo de crecimiento en gota veíamos que en YES a 36°C el mutante doble *cfr1Δ gga22Δ* presentaba un crecimiento muy reducido respecto al WT y que el mutante triple *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ* prácticamente no crecía nada. Al añadir el estabilizador osmótico sorbitol a una concentración de 1,2 M e incubar las placas a 36°C pudimos observar que ambos mutantes recuperaron el crecimiento, con un patrón similar al de la cepa WT (**Figura 33C**).

Este tipo de análisis no se realizó con mutantes del complejo AP-2 porque no habíamos detectado interacción génica respecto al crecimiento a altas temperaturas con el mutante *ap13Δ*.

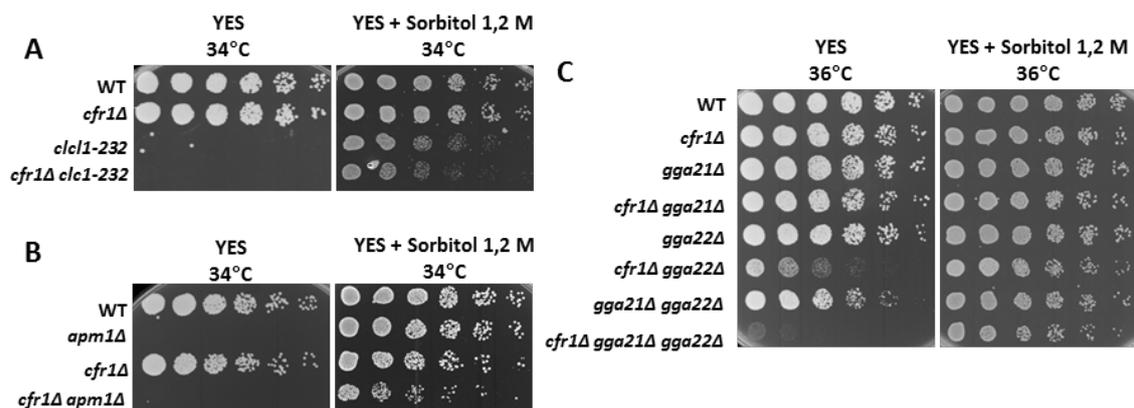


Figura 33. El exómero de *S. pombe* junto con los adaptadores de clatrina colaboran en la síntesis de la pared celular.

Ensayo de crecimiento en gota en medio rico (YES) o YES con sorbitol 1,2 M, en los que se habían inoculado diluciones seriadas de suspensiones de células de las cepas indicadas. A partir de una suspensión que contenía 3×10^4 células se hicieron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-3 días en función de la temperatura.

A. Estudio de la interacción entre el exómero y la clatrina en presencia de sorbitol 1,2 M.

B. Estudio de la interacción entre el exómero y el adaptador AP-1 en presencia de sorbitol 1,2 M.

C. Estudio de la interacción entre el exómero y los adaptadores GGA en presencia de sorbitol 1,2 M.

Otra manera de analizar la relación funcional de estos complejos en la síntesis de la pared celular es analizar el crecimiento de los mutantes dobles en placas de caspofungina, agente inhibidor de la síntesis del β -glucano. Con este fin se analizó el crecimiento del mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* en placas con diferentes cantidades de

casposfungina y como se puede observar en la **figura 34A**, el mutante doble presentaba un menor crecimiento en presencia del antifúngico.

Dado que el mutante *apl3Δ* es ligeramente sensible a casposfungina (de León *et al.*, 2016), el siguiente paso fue analizar el crecimiento de una cepa control (WT), de los mutantes simples *cfr1Δ* y *apl3Δ* y del mutante doble *cfr1Δ apl3Δ* en YES con y sin casposfungina. Como podemos observar en la **figura 34B** los tres mutantes presentaban un crecimiento reducido respecto a la cepa control en presencia de la casposfungina, siendo todavía menor en el mutante doble *cfr1Δ apl3Δ*.

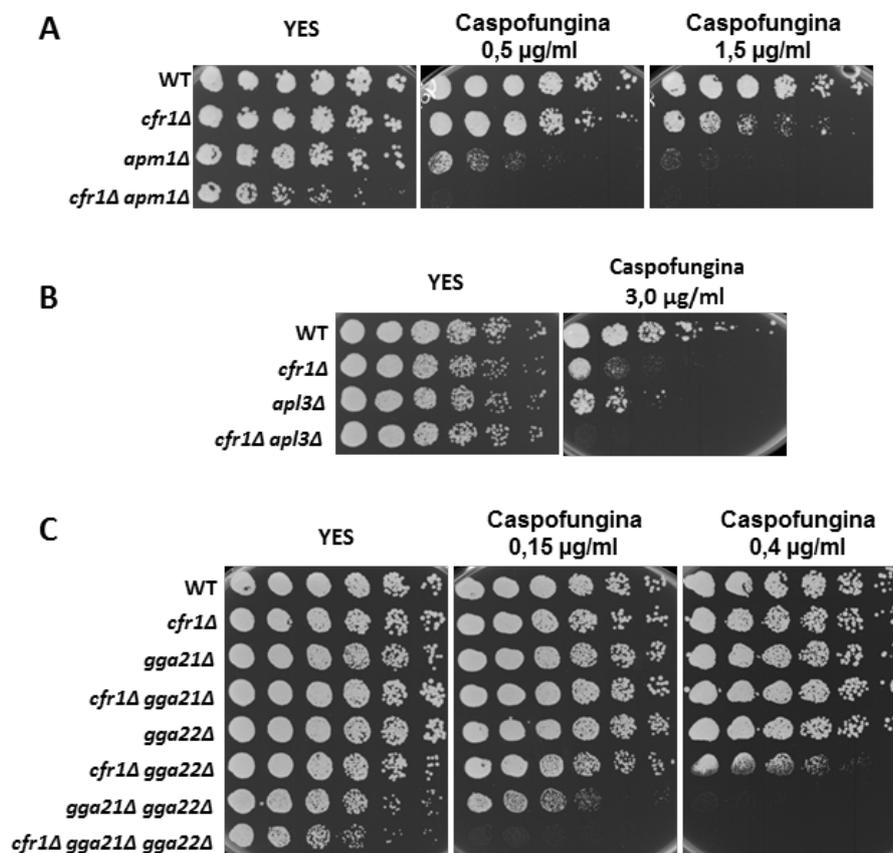


Figura 34. Los mutantes dobles del exómero de *S. pombe* y los adaptadores de clatrina son sensibles a la casposfungina.

Ensayo de crecimiento en gota en medio rico YES o YES con casposfungina en las concentraciones indicadas en los que se habían inoculado diluciones seriadas de suspensiones de células de las estirpes indicadas. El primer inóculo contenía 3×10^4 células y los sucesivos inóculos contenían diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ del mismo. Las placas se incubaron a 28°C durante 3 días.

- A.** Estudio de la interacción entre el exómero y el adaptador AP-1 con casposfungina.
B. Estudio de la interacción entre el exómero y el adaptador AP-2 con casposfungina.
C. Estudio de la interacción entre el exómero y los adaptadores GGA con casposfungina.

Por último, decidimos estudiar que sucedía en ausencia de los GGAs y del exómero. Como se puede observar en la **figura 34C** el mutante triple *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ* no es capaz de crecer a ninguna de las dos concentraciones de caspofungina ensayadas. También se observa un crecimiento reducido de los mutantes dobles *cfr1Δ gga22Δ* y *gga21Δ gga22Δ*; este defecto en el crecimiento se hace más patente al aumentar la concentración del antifúngico en el medio.

Todos los resultados mostrados indican que las deficiencias de crecimiento encontradas en mutantes carentes de distintos adaptadores de clatrina, y en los mutantes múltiples carentes además de Cfr1 se deben, al menos en parte, a que existe una colaboración del exómero de *S. pombe* con dichos adaptadores que es necesaria para que la pared celular se sintetice de forma adecuada.

5.6 Valoración de la actividad β -glucán sintasa *in vitro* en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*

Para confirmar que el complejo Cfr1/Bch1 colabora con los adaptadores de la clatrina en el proceso de síntesis de la pared celular se llevó a cabo un análisis más específico. Con este fin se analizó la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa *in vitro* en los mutantes simples *cfr1Δ* y *apm1Δ*, así como en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*. El experimento se realizó cultivando las células en presencia del estabilizador osmótico sorbitol debido a que, como hemos visto antes, en presencia de este compuesto las cuatro cepas tienen un crecimiento similar. Así los resultados no se veían enmascarados por la lisis que presentan algunos de estos mutantes (*apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ*). Este experimento se realizó seis veces con duplicados, y en todos los experimentos la tendencia de los valores obtenidos fue similar.

En la **figura 35** observamos que los mutantes simples *apm1Δ* y *cfr1Δ* presentaban un valor de la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa de un 85% y 87,5% respectivamente en relación a la cepa silvestre. En el caso del mutante doble la actividad de la enzima descendía hasta el 60% del valor obtenido en la cepa WT. Es decir, en ausencia de

componentes de ambos complejos adaptadores la actividad de la enzima $\beta(1,3)$ -glucán sintasa está bastante comprometida.

Este resultado es una evidencia que apoya la idea de que el exómero y el adaptador de la clatrina AP-1 de *S. pombe* colaboran en el transporte de las enzimas encargadas de la síntesis del β -glucano hacia la membrana plasmática.

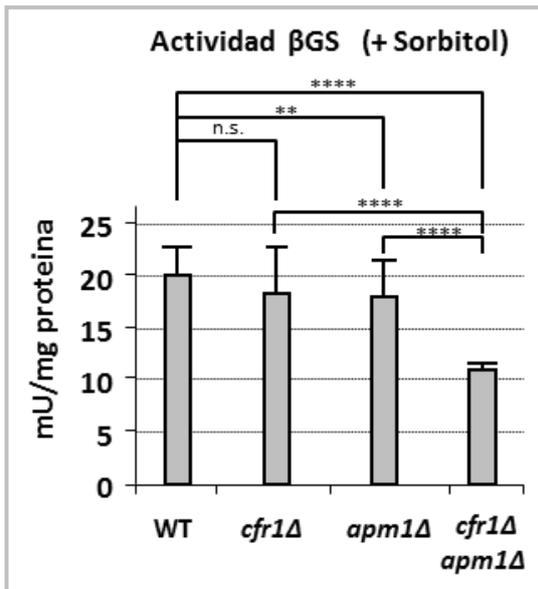


Figura 35. Valoración de la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa.

Medida de la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa *in vitro* de las cepas indicadas. Las células fueron cultivadas en YES + sorbitol 1,2 M para evitar la lisis de algunos mutantes. Los valores representados son la media de seis experimentos independientes con muestras duplicadas. Se representan los valores medios, las desviaciones estándar y la significación estadística mediante test ANOVA con comparación de Dunnett (n.s. no significativo; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

6. Análisis de la regulación de algunas enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular por el exómero en *S. pombe*

Como hemos visto en el apartado anterior, el exómero de *S. pombe* es necesario para que la pared celular de esta levadura se sintetice de forma adecuada. Entonces nos planteamos averiguar si el defecto en la síntesis de la pared celular de los mutantes del complejo (*cfr1* Δ , *bch1* Δ y *cfr1* Δ *bch1* Δ), se debía a que algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de dicha estructura no se transportaban de forma correcta hacia la superficie celular. En este apartado se detallan los experimentos realizados para intentar dar respuesta a esta cuestión.

6.1 Estudio de la localización de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular en mutantes carentes del exómero

Como ya se ha mencionado el componente mayoritario de la pared celular de la levadura de fisión es el β -glucano, cuya biosíntesis se cataliza por el complejo enzimático $\beta(1,3)$ -glucán sintasa. En *S. pombe* existen cuatro genes que codifican enzimas $\beta(1,3)$ -glucan sintasa que son esenciales en determinados momentos de su ciclo de vida. Decidimos analizar cuál era la localización de Bgs1, Bgs3 y Bgs4 en los distintos mutantes del complejo Cfr1/Bch1.

Para poder observar estas enzimas por microscopía de fluorescencia se utilizaron cepas que portaban cada una de estas enzimas fusionadas en su extremo amino terminal con el epítipo fluorescente GFP. Entre ambas proteínas hay 12 alaninas a modo de "bisagra", con el fin de evitar cambios en la conformación de la proteína que pudieran afectar su localización y/o estabilidad. Como puede observarse en la **figura 36A** en una cepa WT las tres proteínas GFP-Bgs aparecen localizadas en la zona de síntesis del septo, en los polos y en vesículas intracelulares. Sorprendentemente cuando analizamos qué sucedía en los distintos mutantes del complejo (*cfr1 Δ* , *bch1 Δ* y *cfr1 Δ bch1 Δ*) pudimos observar que la localización de las tres enzimas era aparentemente la misma en los tres mutantes y en una cepa silvestre.

Por tanto, el transporte polarizado de las enzimas β GS a la superficie celular no parece estar alterado en ausencia de los componentes del exómero de *S. pombe*.

Otro de los polímeros que forman parte de la pared celular de *S. pombe* es el α -glucano, 18-28% del total de la pared. Como se ha mencionado antes Ags1 es una proteína esencial que se considera la subunidad catalítica de la enzima $\alpha(1,3)$ -glucán sintasa (α GS), encargada de la síntesis de este polímero estructural (Hochstenbach *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999). En este caso se utilizó una forma de la proteína fusionada a la GFP en el interior de la proteína (GFP-Ags1) (Cortés *et al.*, 2012). Tras la toma de fotografías de fluorescencia pudimos observar que la localización era la misma en una cepa control (WT) y en los distintos mutantes (*cfr1 Δ* , *bch1 Δ* y *cfr1 Δ bch1 Δ*), apareciendo siempre localizada en la zona del ecuador, en los polos celulares y en puntos discretos intracelulares (**Figura 36B**).

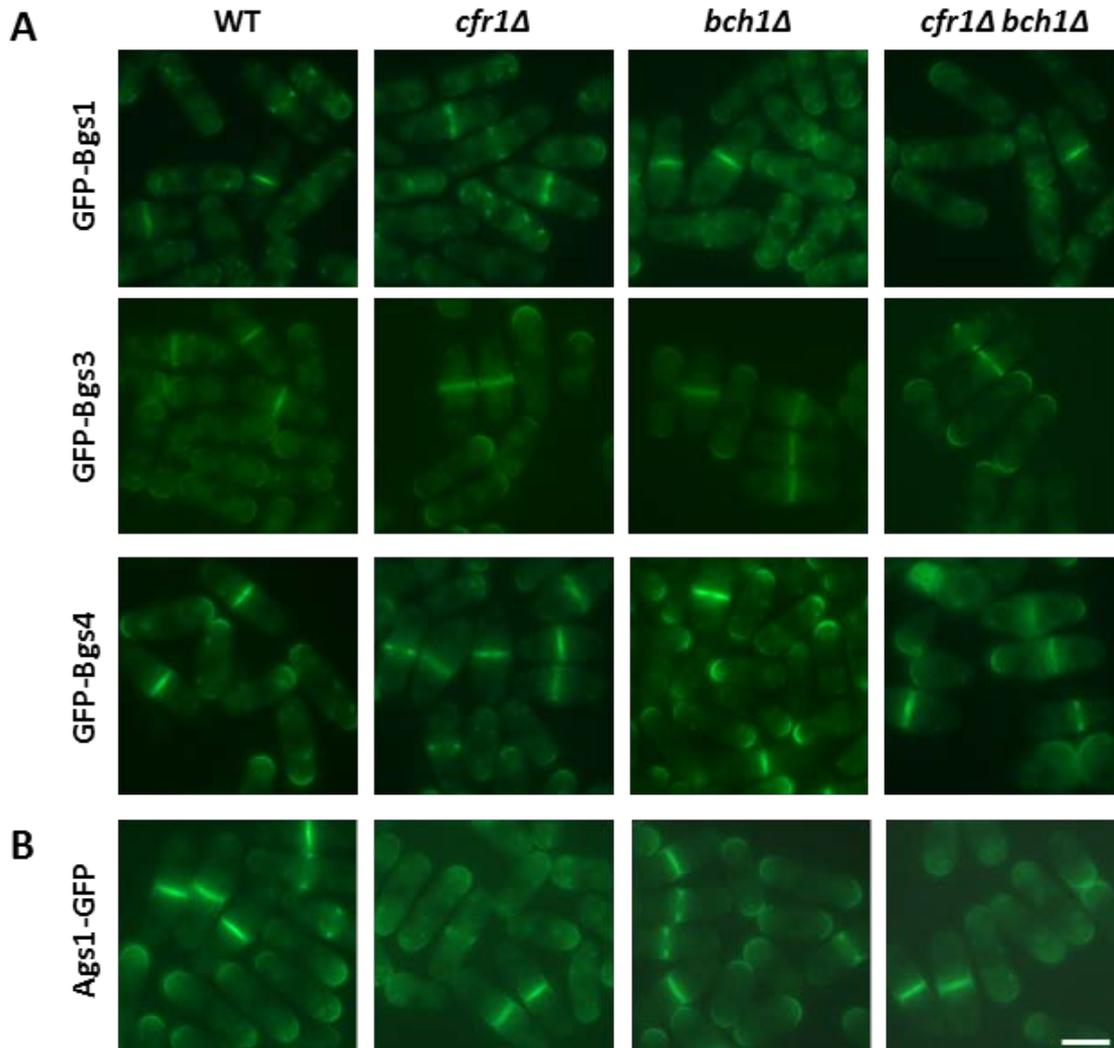


Figura 36. La localización de las enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa y α -glucán sintasa no se altera en ausencia del exómero de *S. pombe*.

Fotografías de fluorescencia donde se muestran la localización de las proteínas de fusión GFP-Bgs1, GFP-Bgs3, GFP-Bgs4 (A) y Ags1-GFP (B) en células de las cepas indicadas.

Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

Ante lo inesperado del resultado anterior, también analizamos la localización de otras proteínas relacionadas con la síntesis pared celular para averiguar si el defecto en la síntesis de esta estructura se debía a una alteración en su localización. Las proteínas analizadas fueron:

- GFP-Rho1, hasta la fecha es el único regulador conocido de la síntesis del β -glucano (García *et al.*, 2006b; Pérez & Rincón, 2010).
- Gas1-GFP, es una glucanosil transferasa de la pared celular. Proteína con GPI (Ragni *et al.*, 2007; de Medina-Redondo *et al.*, 2010).

- Gas2-GFP, es otra glucanosil transferasa de la pared celular. Proteína sin GPI (Ragni *et al.*, 2007; de Medina-Redondo *et al.*, 2010).

En ninguno de los casos se observó un cambio en la localización de las proteínas cuando se eliminaba uno o los dos componentes del complejo Cfr1/Bch1 (Figura 37) respecto a una cepa control (WT). Es decir, que *a priori* el exómero no parece ser necesario para que las proteínas analizadas se transporten a la superficie celular donde deben llevar a cabo su función.

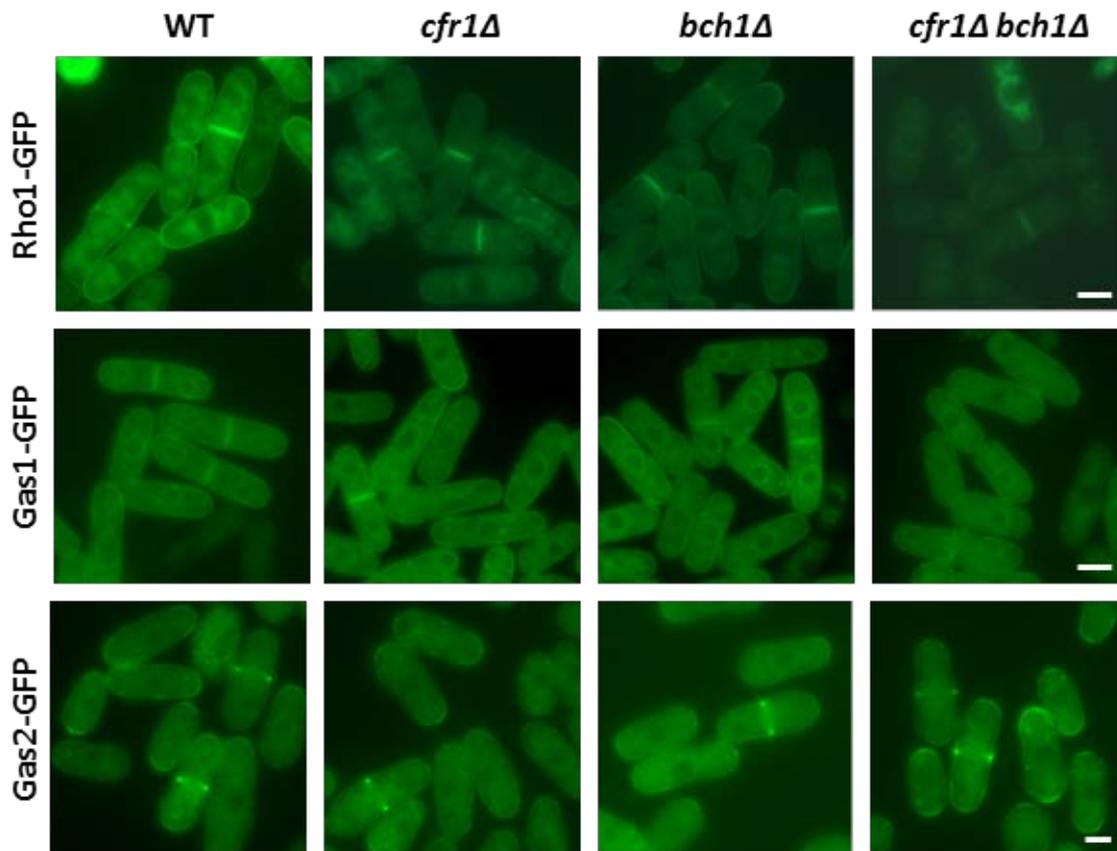


Figura 37. La localización de algunas proteínas implicadas en la síntesis de la pared celular no se altera en ausencia del exómero.

Localización de las proteínas Rho1-GFP, Gas1-GFP y Gas2-GFP en células de las cepas indicadas. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

Por último, decidimos analizar la localización de otras proteínas con el fin de obtener algún tipo de información sobre la función de este complejo:

- Chs2-GFP, presenta similitud con las enzimas QS de la Familia 1 aunque carece de actividad catalítica. Es necesaria para garantizar la estabilidad del anillo contráctil de actomiosina durante la citocinesis, una función que comparte con la proteína Chs2 de

S. cerevisiae (Martín-García *et al.*, 2003; VerPlank & Li, 2005; Martín-García & Valdivieso, 2006).

- Cfh3-GFP, necesaria para la estabilidad de la enzima β GS Bgs1 en el sitio de división celular (Sharifmoghadam & Valdivieso, 2009; Sharifmoghadam *et al.*, 2012).

- Gma12-GFP, α (1,2)-galactosiltransferasa utilizada como marcador del aparato de Golgi (Chappell *et al.*, 1994).

- Psy1-GFP, t-SNARE localizada en la MP del compartimento aceptor (Nakamura *et al.*, 2009).

- Pma1-GFP, ATPasa de la MP (Serrano *et al.*, 1986).

- Clc1-GFP, subunidad de la cadena ligera de la clatrina (de León *et al.*, 2013).

Como se observa en la **figura 38** las proteínas de fusión analizadas presentaban una localización aparentemente similar en células de la cepa WT y en células del mutante *cfr1 Δ* .

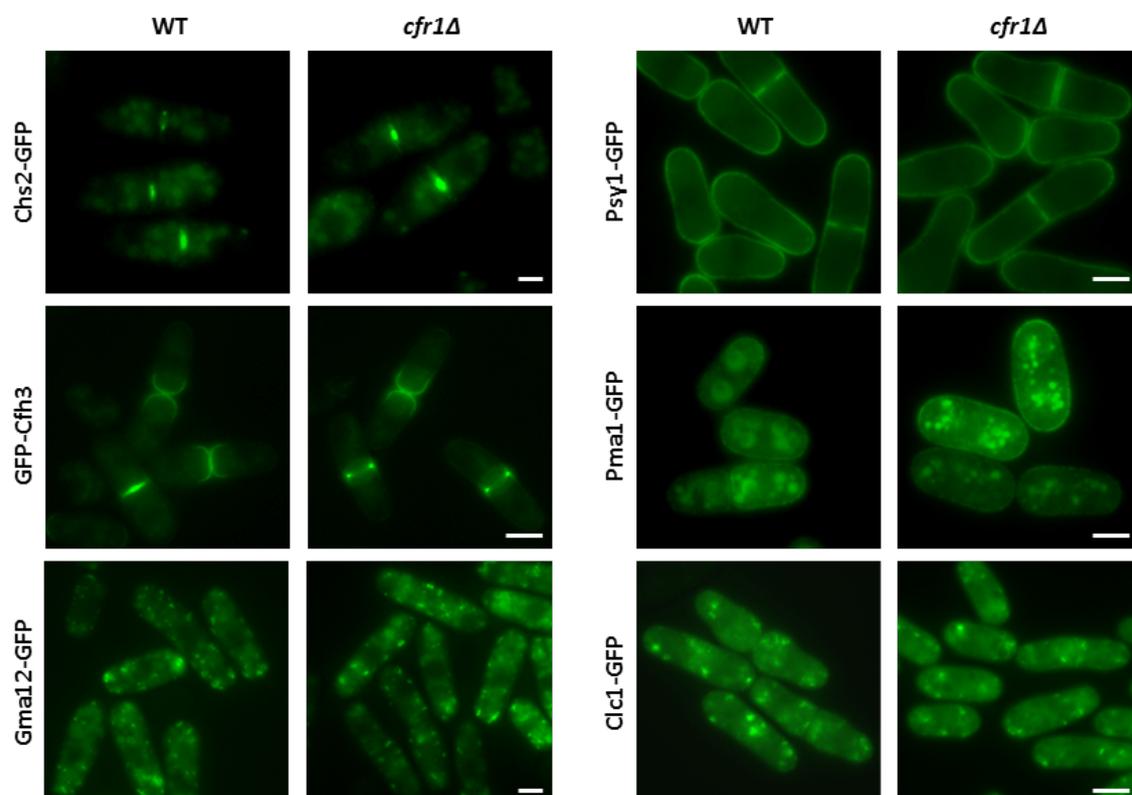


Figura 38. Localización de distintas proteínas en ausencia del exómero de *S. pombe*. Localización de las proteínas de fusión indicadas en células de una cepa WT y del mutante *cfr1 Δ* . Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

Estos resultados nos indican que el exómero de *S. pombe* no es necesario para que ninguna de las proteínas analizadas sea capaz de llegar hasta su correcta localización en la superficie celular y así llevar a cabo su función.

6.2 Análisis de la cantidad de proteína de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de pared celular

Decidimos analizar entonces si, a pesar de tener una localización similar, la cantidad de alguna de las proteínas implicadas en la síntesis de la pared celular estaba alterada en ausencia del complejo Cfr1/Bch1 de *S. pombe*. Analizamos la cantidad de proteína de las distintas enzimas en una cepa WT, en los mutantes simples *cfr1Δ* y *bch1Δ* y en el mutante doble *cfr1Δ bch1Δ* mediante ensayos de tipo *Western Blot*.

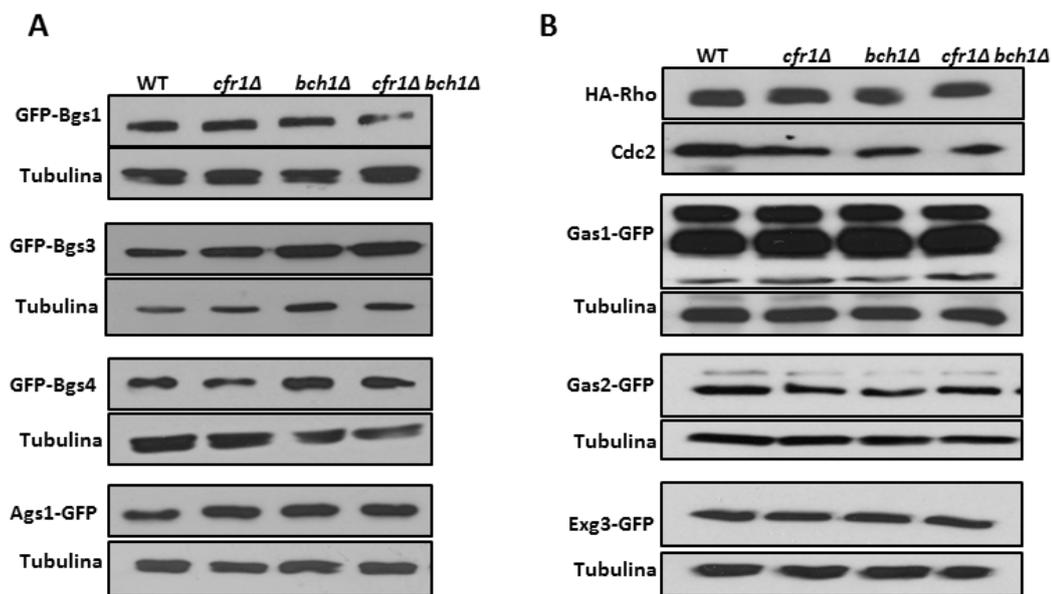


Figura 39. La ausencia del exómero no afecta a la cantidad de proteína de muchas de las enzimas implicadas en la síntesis y/o remodelación de la pared celular.

A. *Western blot* de la cantidad de las enzimas β 1,3)-glucán sintasa (GFP-Bgs1, GFP-Bgs3 y GFP-Bgs4) y de la enzima α -glucán sintasa (Ags1-GFP) presente en extractos celulares de las cepas indicadas.

B. *Western blot* de la cantidad de algunas proteína relacionadas con la síntesis y/o remodelación de la pared celular (HA-Rho1, Gas1-GFP, Gas2-GFP y Exg3-GFP) presentes en extractos celulares de las cepas indicadas.

Como se puede observar en la [figura 39A](#) el análisis con las enzimas β GS determinó que no existían diferencias significativas de la cantidad de GFP-Bgs1, GFP-Bgs3 y GFP-Bgs4 en una cepa silvestre y en los tres mutantes antes mencionados. Los experimentos se realizaron varias veces de manera independiente y además se

cuantificó la cantidad de proteína para confirmar estos resultados. Las pequeñas variaciones que pueden ser observadas en [la figura 39A](#) se deben simplemente a variaciones experimentales. Al analizar la enzima α GS tampoco se observaron diferencias significativas en la cantidad de GFP-Ags1 en ausencia de uno o de los dos componentes del complejo Cfr1/Bch1 respecto a la cepa WT (panel inferior de [la figura 39A](#)). Por último, decidimos comprobar qué sucedía con el resto de proteínas analizadas en el apartado anterior como son HA-Rho1 (la proteína marcada con GFP es muy poco funcional), Gas1-GFP y Gas2-GFP. Además se incluyó en el análisis a Exg3-GFP; Exg3 es una proteína citoplasmática necesaria para la síntesis de la pared celular ([Dueñas-Santero *et al.*, 2010](#)). Como en los casos anteriores no hubo diferencias en la cantidad de estas proteínas entre los mutantes simples o doble del exómero y la cepa control (WT) ([Figura 39B](#)).

6.3 Análisis de la distribución subcelular de la enzima β -glucán sintasa Bgs4 en el mutante *cfr1* Δ

El siguiente paso fue analizar en detalle la localización subcelular de una de las enzimas β GS, para obtener información más detallada de cómo ocurría el tráfico de esta proteína hacia la superficie celular en ausencia del exómero. La enzima elegida fue Bgs4. Para responder a esta cuestión se realizaron fraccionamientos subcelulares utilizando gradientes de sacarosa. Como se describió antes (apartado 3.3 de Resultados) utilizamos marcadores de los distintos compartimentos celulares que se querían estudiar. Los marcadores elegidos fueron los siguientes ([Sánchez-Mir *et al.*, 2012](#)):

- Sec72-GFP (GEF de la GTPasa Arf1), se utilizó como marcador del TGN/EEs.
- Pep12 (t-SNARE necesaria para el transporte de proteínas vacuolares), se utilizó como marcador del PVC.
- Vma2 (subunidad de la ATPasa vacuolar), se utilizó como marcador de las vacuolas.
- Pma1 (subunidad de la ATPasa H⁺ de la MP), se utilizó como marcador de la MP.

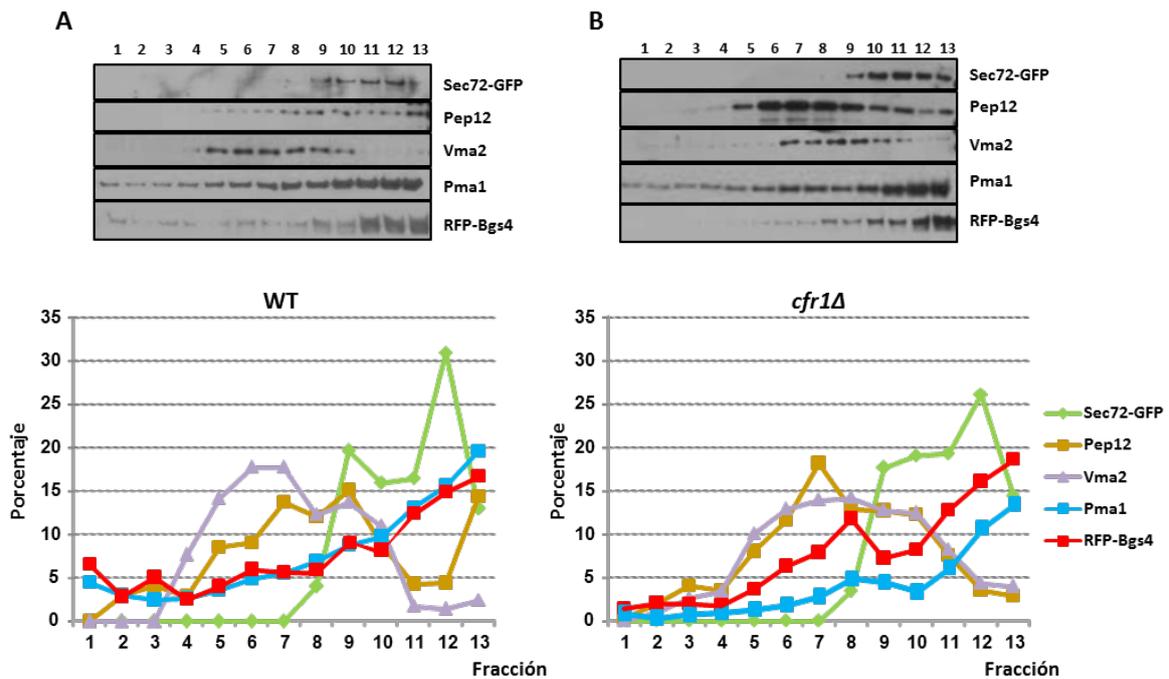


Figura 40. Localización subcelular de la proteína Bgs4 en ausencia del exomero.

Fracccionamientos subcelulares utilizando gradientes de sacarosa. Los extractos celulares preparados a partir de una cepa WT (A) y de un mutante *cfr1Δ* (B) que portaba tanto RFP-Bgs4 como Sec72-GFP se cargaron en gradientes 30-55% de sacarosa y se centrifugaron durante 20 horas. Las fracciones se recogieron desde la parte superior del gradiente y se analizaron por ensayos de *Western blot* revelados con anti-GFP, anti-Pep12, anti-Vma2, anti-RFP y anti-Pma1. Los paneles superiores muestran los ensayos de *Western blot* revelados con los anticuerpos indicados donde se observan las distintas fracciones y los paneles inferiores muestran una representación gráfica de las distintas fracciones de los compartimentos subcelulares.

Se utilizó RFP-Bgs4 como proteína de estudio en una cepa que además portaba la proteína de fusión Sec72-GFP. En la **figura 40** se puede observar el resultado obtenido en uno de los experimentos realizados. Se obtuvieron datos prácticamente similares en seis experimentos diferentes. En la cepa control (WT) (**Figura 40A**) podemos observar que los marcadores correspondientes al PVC y las vacuolas, Pep12 y Vma2 respectivamente, aparecen más a la izquierda del gel (fracciones ligeras del gradiente); mientras que el marcador del TGN/EEs Sec72-GFP, aparece representado a la derecha del gel (fracciones pesadas del gradiente). El marcador de la MP, Pma1, así como la proteína de estudio, RFP-Bgs4, prácticamente presentaban la misma distribución a lo largo de todas las fracciones, con una mayor distribución en la zona del TGN/EEs que en el resto de las fracciones, aunque se distribuía a través de todos los compartimentos estudiados. En el mutante *cfr1Δ* (**Figura 40B**) la distribución de la proteína Bgs4 también presentaba una acumulación progresiva desde las fracciones del PVC/vacuolas hasta las fracciones del TGN de tendencia similar a la del marcador

de la membrana plasmática. Sin duda, lo más llamativo en la distribución de la proteína Bgs4 en el mutante *cfr1Δ* fue la aparición de un pico que alcanzaba el máximo de concentración en la fracción 8 que no se observaba en el WT, indicando una alteración en el transporte de Bgs4. Aunque menos evidente, esta alteración también se observaba en el caso de Pma1.

Estos datos sugieren que el exómero de *S. pombe* sí que tiene algún papel en el tráfico vesicular de algunas proteínas de membrana, en particular de Bgs4. El hecho de que estas proteínas sí que lleguen a la membrana plasmática sugiere que este papel es minoritario. Esto está de acuerdo con el hecho de que los mutantes *cfr1Δ*, *bch1Δ* y *cfr1Δ bch1Δ* no presenten fenotipos aparentes en condiciones normales de cultivo.

7. Regulación de las enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular por el exómero de *S. pombe* en cepas carentes de adaptadores de clatrina

Dado que habíamos determinado que entre el exómero y los adaptadores de clatrina hay una relación funcional, y que esta relación es relevante para la síntesis de la pared celular, analizamos si dicha relación se ejercía a nivel de la regulación del transporte de las enzimas necesarias para la síntesis de dicha estructura.

7.1 Análisis por microscopía de fluorescencia

Está descrito que el complejo AP-1, adaptador de las vesículas de clatrina que regula el tráfico bidireccional entre el TGN y los EEs, es necesario para que la β GS Bgs1 llegue a la membrana plasmática de forma eficiente; en ausencia de este adaptador la proteína Bgs1 queda retenida en endosomas tempranos, generando un defecto en la síntesis de la pared celular (Yu *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta este dato de sumo interés en nuestra investigación, nos planteamos analizar si las enzimas β GS Bgs3 y Bgs4 también se transportaban mediante el adaptador AP-1. Para averiguar si esto era así comprobamos la localización de GFP-Bgs3 y GFP-Bgs4 en el mutante *apm1Δ*.

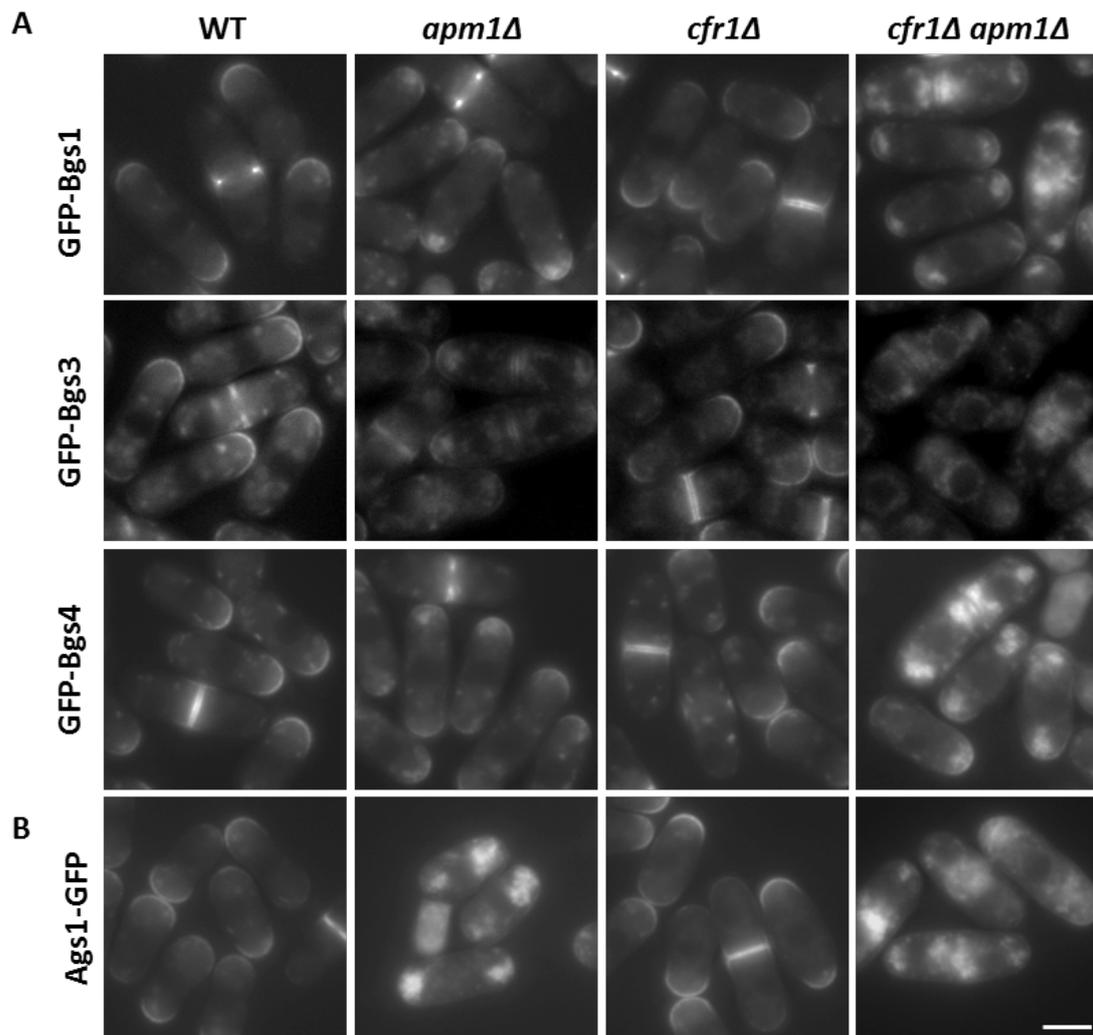


Figura 41. La localización de las enzimas $\beta(1,3)$ -glucán sintasa y α -glucán sintasa está alterada en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*.

Distribución de las proteínas de fusión GFP-Bgs1, GFP-Bgs3 y GFP-Bgs4 (A) y Ags1-GFP (B) en células de las cepas WT, *apm1Δ*, *cfr1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ*.

Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

Como se puede observar en la **figura 41A** ambas proteínas presentaban una localización similar a la descrita para Bgs1 en este mutante, es decir las proteínas se deslocalizaban parcialmente apareciendo en unos cúmulos intracelulares cercanos a los polos y al ecuador celular que no se observaban en la cepa silvestre. En el caso de Bgs1 se había comprobado que estos cúmulos eran endosomas tempranos mediante tinción con FM4-64 (Yu *et al.*, 2012). En el mutante *apm1Δ* podía observarse que las proteínas Bgs también se localizaban en la membrana plasmática del ecuador y de los polos de las células, aunque la intensidad de esta fluorescencia era menor a la observada en un WT. Este dato podría estar indicando que en el mutante *apm1Δ* una

parte de las enzimas β GS se transportaba a la MP desde el Golgi a través de los endosomas por un mecanismo independiente de AP-1, o bien que se transportaban por una ruta alternativa en la que no participan los endosomas. Decidimos analizar si el exómero era necesario para este mecanismo independiente de AP-1 y/o de los endosomas. Para hacerlo se estudió la localización de GFP-Bgs1, GFP-Bgs3 y GFP-Bgs4 en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*. En las fotografías de la **figura 41A** se puede observar que la retención intracelular de estas proteínas era mucho mayor en ausencia de ambos componentes. Este resultado estaba indicando que efectivamente, o bien ambos complejos cooperan en el transporte de estas proteínas hacia la MP a través de la ruta endosomal, o bien el exómero podría formar parte de una ruta alternativa para el transporte de las proteínas Bgs hacia la membrana plasmática. Aun así en ausencia de AP-1 y del exómero una parte de las enzimas β GS ha de estar llegando a la MP aunque sea por otra vía, ya que de lo contrario las células no serían capaces de sobrevivir, al ser las tres β GS esenciales. Un resultado similar se obtuvo al analizar la localización de la proteína de fusión GFP-Ags1 que, como se observa en la **figura 41B**, se localizaba en cúmulos citoplasmáticos en el mutante *apm1Δ*. Esta deslocalización de la proteína se hacía más evidente en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*.

Al igual que en la mayoría de los experimentos mostrados en apartados anteriores, decidimos estudiar más en profundidad lo que sucedía con la enzima β GS Bgs4. Como ya se ha mencionado Bgs4 se localiza fundamentalmente en los lugares de crecimiento activo (ecuador celular y polos celulares) y en "vesículas" intracelulares, tanto en la cepa WT como en el mutante *cfr1Δ*; sin embargo esta localización se pierde parcialmente en el mutante *apm1Δ*, y la deslocalización se hace más patente en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*. Caracterizar la naturaleza de la retención intracelular de Bgs4 en los mutantes *apm1Δ* y *apm1Δ cfr1Δ* podría ayudarnos a entender el papel del exómero. Por similitud al resultado descrito por Yu y colaboradores para Bgs1 (Yu *et al.*, 2012), podía asumirse que estos compartimentos eran endosomas. Como los endosomas pueden tener un origen endocítico decidimos tratar estas células con la Latrunculina A (LatA; una droga que inhibe el proceso de endocitosis) para averiguar si la acumulación anormal de Bgs4 se resolvía a lo largo del tiempo, lo que indicaría que los cúmulos correspondían a endosomas tempranos procedentes de la endocitosis.

Para la realización de este experimento, los cultivos se incubaron en medio líquido YES a 25°C, y después se transfirieron a 32°C y se incubaron durante dos horas. Se añadió LatA a una concentración de 100 µM o el solvente DMSO y se recogieron muestras cada 20 minutos durante un período de una hora. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia, ya que la proteína Bgs4 estaba fusionada a la GFP (GFP-Bgs4). Tanto en las células de la cepa WT como del mutante *cfr1Δ* se observaba que a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento con LatA, Bgs4 se extendía más a lo largo de la MP tanto en los polos como en el ecuador celular (**Figura 42**). Este dato indica que la endocitosis contribuye a la localización polarizada de Bgs4. En el mutante *apm1Δ* en los 20 primeros minutos de tratamiento con la droga ya se observaba una menor presencia de los cúmulos de Bgs4, que iban disminuyendo a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento con dicha droga (40-60 minutos), aunque no llegan a desaparecer completamente.

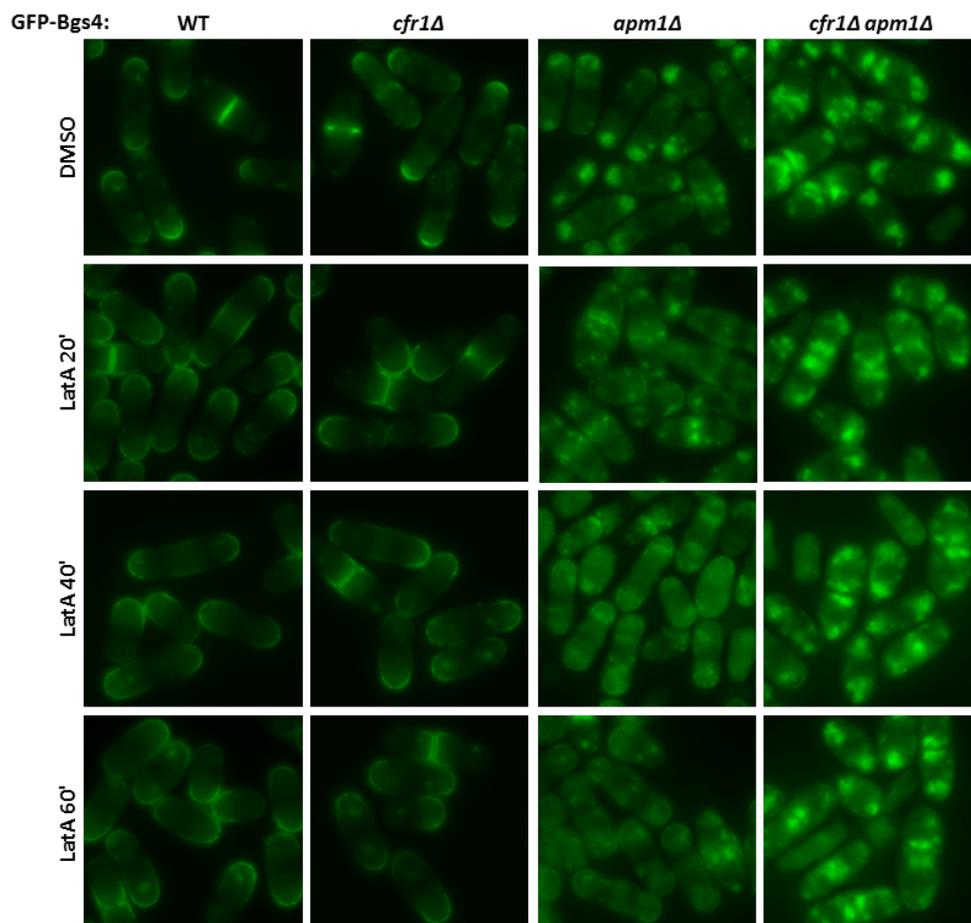


Figura 42. El tratamiento con LatA no corrige el defecto en la proteína de fusión GFP-Bgs4 en el mutante *cfr1Δ apm1Δ*.

Las fotografías de fluorescencia muestran la localización de la proteína de fusión GFP-Bgs4 en las cepas indicadas tratadas con DMSO (solvente) o con LatA (100 µM) durante los tiempos indicados (minutos). Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 µm.

Este resultado parece indicar que en el mutante *apm1Δ* los cúmulos de Bgs4 son, al menos en parte, de origen endocítico y que el transporte de Bgs4 desde la membrana plasmática (seguramente hacia la vacuola) es más lento en este mutante, de manera que la proteína podría quedar retenida durante un cierto tiempo en los endosomas.

A continuación decidimos realizar este mismo tratamiento con LatA en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*, en el que la acumulación intracelular de la proteína Bgs4 era aún mayor que en el mutante sencillo *apm1Δ*. En este caso incluso después de tratamientos muy largos con la droga (60 minutos) las células presentaban la misma distribución de la proteína GFP-Bgs4 que antes del tratamiento (**Figura 42**). En base a estos resultados nos planteamos si las células podían estar muertas. Para averiguar si esto era así se midió la D.O.₆₀₀ a lo largo del experimento comprobándose que las células continuaban creciendo aunque de forma más lenta que una cepa WT.

Por último, decidimos realizar este mismo tratamiento con LatA en un mutante doble *apm1Δ vps27Δ*. La proteína Vps27 es un componente del ESCRT, y en *S. cerevisiae* es necesaria para el reconocimiento de proteínas que se degradan vía vacuola, de tal forma que en el mutante *vps27Δ* esta ruta hacia la vacuola está completamente bloqueada. En *S. pombe* este mutante no tiene un fenotipo muy drástico (Iwaki *et al.*, 2007). Como podemos observar en la **figura 43A** la acumulación de la proteína Bgs4 en este mutante doble se resolvía a lo largo del tiempo después del tratamiento con LatA, aunque parecía hacerlo más lentamente que en la cepa silvestre, de acuerdo con el hecho de que cuando se produce un daño en la ruta endosomal a distintos niveles el transporte de las proteínas hacia su destino final es más lento.

El *dot blot* es un ensayo sencillo para saber si existe daño en el tráfico a nivel de los endosomas debido a que cuando existe, la proteína Cpy1 en vez de llegar hasta las vacuolas, se desvía por la ruta secretora hasta la superficie celular. Sabíamos que el mutante *cfr1Δ* presenta defecto en el transporte de esta proteína y quisimos ver que sucedía en el mutante doble *cfr1Δ vps27Δ*. En la **figura 43B** se observa el resultado obtenido; por un lado podemos ver que el mutante *vps27Δ*, de acuerdo con lo que se ha descrito, presenta un defecto muy leve en la ruta hacia la vacuola y por otro lado

que el defecto del mutante doble *cfr1Δ vps27Δ* es incluso más drástico que el del mutante simple *cfr1Δ*. De modo que, parece que el defecto en ambos mutantes es aditivo. Es decir que la función del exómero en el tráfico hacia la vacuola sería distinta de la mediada por el ESCRT. Además este resultado sugiere que la retención de Bgs4 en los endosomas es más drástica en el mutante *cfr1Δ apm1Δ* que en el mutante *apm1Δ vps27Δ*. Esto podría deberse a que o bien los endosomas están más dañados en el primer caso que en el segundo (de manera que el tráfico a este nivel está más bloqueado) o bien GFP-Bgs4 está retenida en distintos compartimentos en ambos mutantes, de modo que en el caso de *cfr1Δ apm1Δ* la proteína Bgs4 no puede llegar a la vacuola.

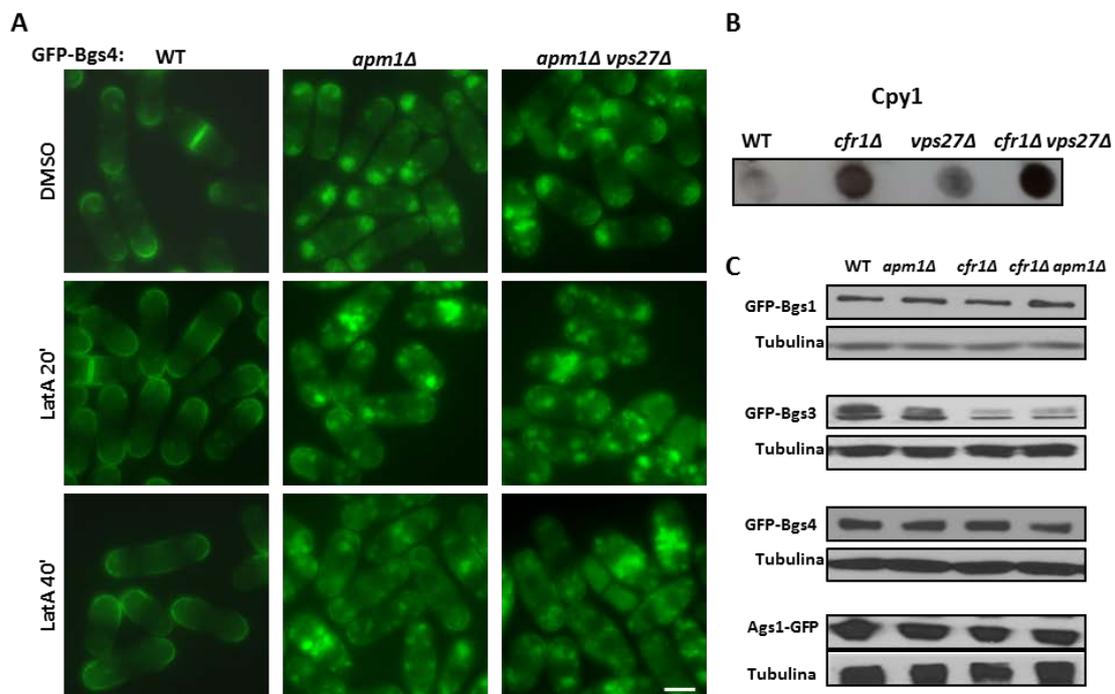


Figura 43. Análisis del tráfico entre el TGN y las vacuolas.

A. Las fotografías de fluorescencia muestran la localización de la proteína de fusión GFP-Bgs4 en las cepas indicadas tratadas con DMSO (solvente) o con LatA (100 μ M) durante los tiempos indicados (minutos). Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

B. Análisis de los niveles de Cpy1 mediante ensayo *dot blot* de colonias de células silvestres (WT), *cfr1Δ*, *vps27Δ* y *cfr1Δ vps27Δ* incubadas en medio mínimo a 28°C durante 5 días.

C. *Western blot* de la cantidad de las enzimas β (1,3)-glucán sintasa (GFP-Bgs1, GFP-Bgs3 y GFP-Bgs4) y α -glucán sintasa (Ags1-GFP) presente en extractos celulares de las cepas indicadas.

Con el fin de obtener más información sobre la naturaleza de la retención de las enzimas β GS en compartimentos intracelulares en el mutante simple *apm1Δ* y en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* decidimos analizar la cantidad de estas proteínas en dichos mutantes. Así, se realizaron ensayos de *Western blot* y se valoró la cantidad de

las enzimas β GS en los mutantes simples *apm1Δ* y *cfr1Δ* y en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*. Como se puede observar en la **figura 43C** no hay cambios significativos en la cantidad de ninguna de las enzimas al eliminar el adaptador AP-1, el exómero o ambos de forma conjunta. Se obtuvo un resultado similar para GFP-Ags1 (**Figura 43C**). Para la realización de este tipo de ensayos las cepas se cultivaron en medio con el estabilizador osmótico sorbitol 1,2 M, ya que como hemos visto antes algunos mutantes (*apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ*) presentan un alto porcentaje de lisis en ausencia del mismo.

Estos datos nos indican que en las cepas analizadas la cantidad de las enzimas glucán sintasa es independiente de la localización en la que se encuentren. Este resultado *a priori* descarta la posibilidad de que en la cepa *cfr1Δ apm1Δ* dichas proteínas estén retenidas en algún tipo de compartimento desde el que no puedan llegar a las vacuolas, ya que de ser así la cantidad de estas proteínas sería mayor en el mutante doble que la cantidad detectada en el silvestre y los mutantes sencillos.

7.2 Análisis por fraccionamiento subcelular

En el apartado anterior de esta misma sección habíamos realizado fraccionamientos subcelulares utilizando gradientes de sacarosa para poder saber la distribución de Bgs4 en una cepa silvestre y en el mutante *cfr1Δ*. Habíamos visto que en el mutante existía una pequeña alteración en dicha distribución. Nos planteamos estudiar la distribución de la proteína Bgs4 en los mutantes *apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ* para así poder determinar en qué compartimentos quedaba retenida esta proteína en dichos mutantes, que por microscopía presentaban una gran alteración en la distribución de la misma. Utilizamos los mismos marcadores que en el caso anterior ([Sánchez-Mir et al., 2012](#)):

- Sec72-GFP (GEF de la GTPasa Arf1), se utilizó como marcador del TGN/EEs.
- Pep12 (t-SNARE necesaria para el transporte de proteínas vacuolares), se utilizó como marcador del PVC.
- Vma2 (subunidad de la ATPasa vacuolar), se utilizó como marcador de las vacuolas.

- Pma1 (subunidad de la ATPasa H⁺ de la MP), se utilizó como marcador de la MP.

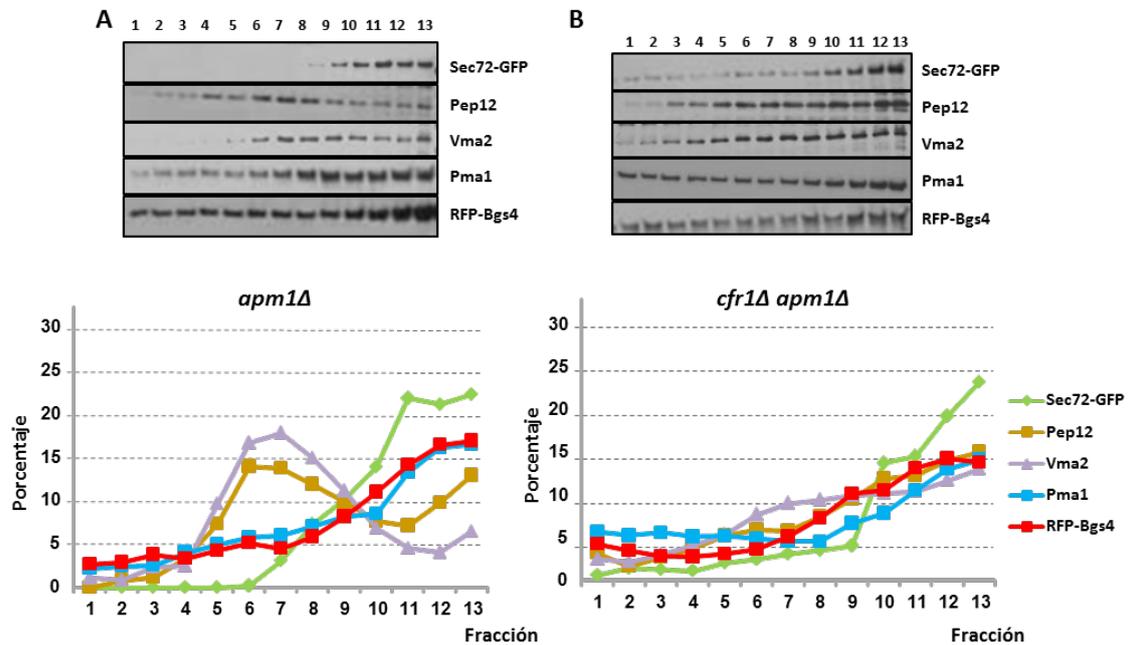


Figura 44. Localización subcelular de la proteína Bgs4 en ausencia del adaptador AP-1 y del exómero.

Faccionamientos subcelulares utilizando gradientes de sacarosa. Los extractos celulares preparados a partir de un mutante *apm1Δ* (A) y de un mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* (B) que portaba tanto RFP-Bgs4 como Sec72-GFP se cargaron en gradientes 30-55% de sacarosa y se centrifugaron durante 20 horas. Las fracciones se recogieron desde la parte superior del gradiente y se analizaron por ensayos de *Western blot* revelados con anti-GFP, anti-Pep12, anti-Vma2, anti-RFP y anti-Pma1. Los paneles superiores muestran los ensayos de *Western blot* revelados con los anticuerpos indicados donde se observan las distintas fracciones y los paneles inferiores muestran una representación gráfica de las distintas fracciones de los compartimentos subcelulares.

Como en el caso anterior utilizamos RFP-Bgs4 como proteína de estudio en una cepa que además portaba la proteína de fusión Sec72-GFP. Estos experimentos se realizaron un total de seis veces de manera independiente, obteniendo resultados similares. Como podemos observar en la **figura 44** y al igual que en los casos anteriores, WT y *cfr1Δ*, los marcadores del PVC y vacuolas (Pep12 y Vma2, respectivamente) aparecen representados a la izquierda del gel (fracciones ligeras del gradiente), mientras que el marcador del TGN/EEs (Sec72-GFP) aparece en la zona de la derecha del gel (fracciones pesadas del gradiente). En el caso de *apm1Δ* (**Figura 44A**) los picos del PVC/vacuolas y TGN/EEs aparecen más definidos y separados entre sí que en la cepa silvestre, lo que es posible que se deba a que, como ya se ha mencionado, el Golgi está alterado en el mutante *apm1Δ* (Kita *et al.*, 2004). La distribución de la proteína Pma1, marcador de la MP y de RFP-Bgs4, proteína de estudio, es prácticamente la misma, con una acumulación parcial en las fracciones ligeras

(PVC/vacuolas) y un aumento considerable en las fracciones pesadas (TGN/EEs), lo que estaría de acuerdo con la alteración del TGN/EEs descrita en este mutante que haría que al menos una parte de los cargos, quedasen retenidos parcialmente durante más tiempo a nivel del TGN/EEs.

En el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* lo que pudimos observar fue que la distribución de los distintos compartimentos está muy alterada (**Figura 44B**), no detectándose prácticamente picos nítidos, salvo un incremento de Sec72-GFP en las fracciones más pesadas. Este cambio tan drástico en la distribución de los marcadores sugiere que en este mutante el sistema de TGN/endosomas, a través del cual deberían transportarse las proteínas de la membrana plasmática, puede sufrir un daño generalizado, lo que alteraría el transporte de las mismas.

8. Distribución de marcadores de orgánulos en mutantes carentes de distintos adaptadores de clatrina y/o del exómero en *S. pombe*

Para comprobar a qué nivel estaba alterado el sistema de endosomas en el mutante *cfr1Δ apm1Δ* se analizó por microscopía convencional de fluorescencia la distribución de tres marcadores diferentes:

Sec72, que es uno de los GEFs de la GTPasa Arf1, y se localiza en la zona del TGN.

Syb1, una proteína similar a la v-SNARE sinaptobrevina, que se localiza en la membrana de las vesículas y es necesaria para la fusión de éstas con el compartimento receptor (Edmatsu & Toyoshima, 2003). La proteína de fusión Syb1-GFP se usó como marcador de endosomas tempranos.

El otro marcador utilizado fue el dominio FYVE del gen EEA1 (*Early Endosomal Antigen 1*), que interacciona con el lípido PI3P (Burd & Emr, 1998; Misra & Hurley, 1999; Sankaran *et al.*, 2001; Stahelin *et al.*, 2002), que está presente en endosomas. Cuando se observó al microscopio de fluorescencia este dominio FYVE fusionado a la proteína RFP (mCherry-FYVE), éste aparecía localizado en puntos citoplasmáticos, que se corresponderían con los endosomas tardíos, y en la membrana de la vacuola, con un patrón similar al de Pep12 (de León *et al.*, 2016). Sin embargo cuando se observó la

localización de este marcador en una cepa WT en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, el marcador se observaba sobre todo en los endosomas tardíos, por lo que esta sonda se consideró un marcador del PVC.

8.1 Localización de algunos marcadores del TGN y del sistema endosomal en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*

Lo primero que hicimos fue analizar la distribución de Sec72-GFP en una cepa silvestre y en los mutantes *cfr1Δ*, *apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ*. Como se puede observar en la [figura 45A](#), Sec72-GFP presentaba la misma distribución en el WT y en el mutante *cfr1Δ*, observándose como puntos dispersos en el citoplasma. Sin embargo en el mutante *apm1Δ* la distribución de este marcador era diferente, observándose un mayor número de puntos citoplasmáticos que en la cepa silvestre; además estos puntos eran de menor tamaño a los del silvestre. En el mutante doble la distribución de Sec72-GFP era similar a la observada en el mutante sencillo *apm1Δ*. Este dato nos indicó que en ausencia del adaptador AP-1 el TGN presenta daños morfológicos, y que estos daños no se agravan significativamente en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ*.

En una cepa control (WT) Syb1-GFP se localizaba en puntos dispersos por el citoplasma y en la MP de los polos (indicado con flechas en la [figura 45B](#)) y del ecuador celular. Para este experimento se utilizó un mutante *bch1Δ* como mutante del exómero porque no fuimos capaces de obtener un mutante *cfr1Δ* con Syb1 marcado con GFP. En el mutante *bch1Δ* observamos que Syb1-GFP no es capaz de localizarse en la superficie celular, o al menos no lo hace tanto como en la cepa control (WT). Al cuantificar estos resultados comprobamos que en un 82% de las células de la cepa WT la proteína es capaz de llegar hasta la superficie, mientras que esta localización solo se observa en un 36% de las células del mutante *bch1Δ* ([gráfica](#) de la [figura 45B](#)).

Está descrito que la pérdida del adaptador AP-1 perturba la distribución de Syb1-GFP, de manera que esta proteína prácticamente no se observa en la superficie celular en el mutante *apm1Δ* (Kita *et al.*, 2004). De hecho la localización intracelular de esta proteína recuerda a la de Bgs4 en este mismo mutante. En el mutante doble *bch1Δ apm1Δ* Syb1-GFP tampoco era capaz de llegar a la membrana plasmática, y además

presentaba una acumulación en el interior celular considerablemente mayor que en el mutante sencillo *apm1Δ* (Figura 45B), una vez más con un patrón similar al observado para las enzimas β GS y α GS.

Se sabe que en una cepa silvestre muchos de los puntos citoplasmáticos de Syb1-GFP co-localizan con el colorante lipofílico FM4-64 (marcador del sistema de endocitosis), indicando que la localización de esta proteína es endosomal, al menos en parte (Kita *et al.*, 2004). Además se sabe que AP-1 actúa a nivel del TGN/EEs. Por tanto, nuestros resultados indican que al eliminar de forma conjunta el adaptador AP-1 y el exómero se produce un fallo severo en el propio sistema de transporte a nivel del TGN/EEs. En estas circunstancias las distintas proteínas cargo quedarían retenidas a dicho nivel, de tal forma que éstas o no podrían ser transportadas hacia la MP ni hacia las vacuolas, o el transporte de las mismas sería más lento.

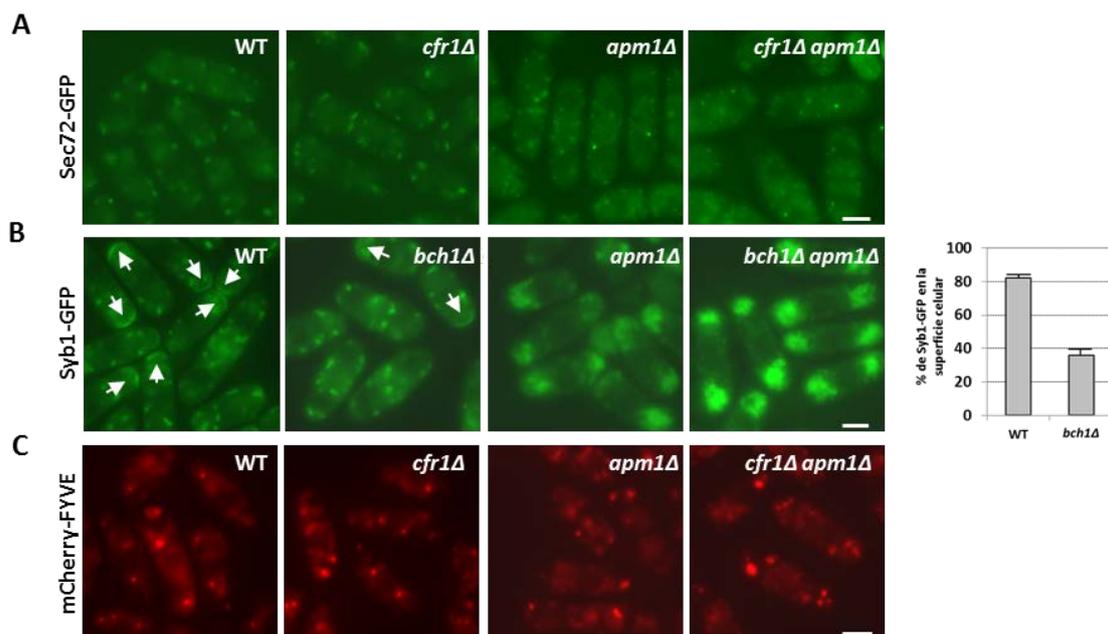


Figura 45. Localización de algunas proteínas del sistema endosomal en mutantes de tráfico intracelular.

A. Localización de la proteína de fusión Sec72-GFP en las cepas indicadas.

B. Localización de la proteína de fusión Syb1-GFP en las cepas indicadas. Las flechas blancas marcan la localización de la proteína Syb1-GFP en la superficie celular. La gráfica de la derecha muestra la cuantificación del % de Syb1-GFP en la superficie celular en la cepa silvestre (WT) y en el mutante *bch1Δ*.

C. Localización de la sonda mCherry-FYVE en las cepas indicadas.

Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μm.

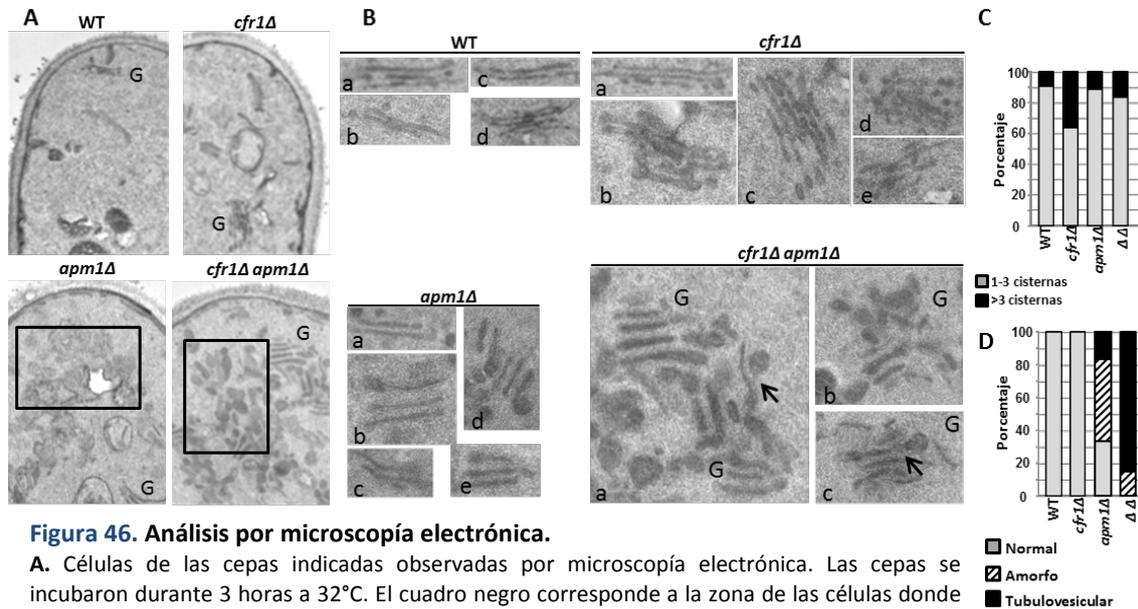
La sonda mCherry-FYVE se observó en el PVC en la estirpe silvestre (**Figura 45C**). En los mutantes *cfr1Δ*, *apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ* la localización es prácticamente similar, no existiendo diferencias aparentes de localización entre la cepa control, los mutantes sencillos y el mutante doble.

Los resultados obtenidos con los marcadores fluorescentes sugerían que al eliminar de forma conjunta el exómero y el complejo AP-1 se agravaba la morfología de los endosomas tempranos, pero no la de los endosomas tardíos.

Para poder tener más información de la alteración en los orgánulos intracelulares en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* se decidió observar esta cepa por microscopía electrónica en cultivos que habían crecido durante 3 horas a 32°C, temperatura semi-restrictiva para el mutante *apm1Δ* y restrictiva para el mutante doble. En estas condiciones el silvestre y el mutante *cfr1Δ* presentan una apariencia similar (**Figura 46A**). Sin embargo, al observar en más detalle células de este mutante comprobamos que presenta aparatos de Golgi con numerosas cisternas (fotografías **b-e** en el panel *cfr1Δ* de la **figura 46B**), algo poco común en la cepa control (WT) (**Figura 46C**). Además, en este mutante también se observaron cisternas engrosadas (fotografía **b** en el panel *cfr1Δ* de la **figura 46B**) o desorganizadas (fotografías **c** y **d** en el panel *cfr1Δ* de la **figura 46B**). Este resultado demuestra que la ausencia del exómero causa una alteración en la morfología del Golgi.

En el caso del mutante *apm1Δ* se observó una gran acumulación de estructuras membranosas sin forma definida en el interior celular (**Figura 46A**). En este mutante se observó que el aparato de Golgi estaba formado generalmente por 1-3 cisternas (**Figuras 46B** y **46C**), que algunas veces presentan los extremos engrosados (fotografías **b** y **d** en el panel *apm1Δ* de la **figura 46B**); además en algunas ocasiones la distancia entre estas cisternas es mayor de lo habitual (**b** y **e**). Por último, en el mutante doble aparecían aparatos de Golgi que generalmente tenían 1-3 cisternas, normalmente desorganizadas y engrosadas (**Figuras 46B** y **46C**). En general se puede decir que al eliminar el exómero en el mutantes *apm1Δ* la morfología del Golgi no se altera más allá de lo que ya estaba en dicho mutante. Lo que sí que se apreció en el mutante doble mutante fue la acumulación de una gran cantidad de estructuras

tubulovesiculares, densas a los electrones, asociadas con las cisternas del aparato de Golgi (flechas en las fotografías **a** y **c** en el panel ***cfr1Δ apm1Δ*** de la **figura 46B**) que podrían corresponderse con TGN/EEs.



La cuantificación mostró que no se produce acumulación de endomembranas ni en el WT ni en el mutante *cfr1Δ*. En el mutante *apm1Δ* un 33% de las células son semejantes al WT, un 50% presentan una acumulación de endomembranas sin forma definida, y un 17% de las células presentan estructuras tubulovesiculares densas a los electrones. En el mutante *cfr1Δ apm1Δ*, un 15% de las células presentan un sistema de endomembranas anómalo y el 85% restante presentan estructuras tubulovesiculares (**Figura 46D**). Estas estructuras, que son frecuentes en el mutante doble y no tanto en el mutante simple *apm1Δ* (**Figuras 46B** y **46D**) incubados a 32°C durante 3 horas, se habían descrito previamente al cultivar el mutante sencillo *apm1Δ* durante 8 horas a 36°C (Kita *et al.*, 2004). Por lo tanto, y como ya habíamos observado en algunos de los experimentos anteriores, el análisis de microscopía electrónica demuestra que la

ausencia del exómero empeora el fenotipo del mutante *apm1Δ*. En particular se agravan los defectos observados en la organización del TGN/EEs.

8.2 Localización de algunos marcadores del TGN y del sistema endosomal en mutantes carentes del exómero y/o de adaptadores GGA

Los resultados anteriores indicaban que en ausencia del adaptador AP-1 y del exómero existe una desorganización del sistema a nivel de los EEs. Por otro lado habíamos visto interacción funcional entre el exómero y los GGAs. Dado que en otros organismos hay evidencias de que los GGAs puedan jugar algún papel en el tráfico entre el TGN y los EEs, nos preguntamos si la relación funcional que habíamos detectado entre ellos y el exómero se debía a que en ausencia de ambos tipos de complejos la alteración del tráfico también se producía a nivel de TGN/EEs. Con el fin de aclarar esta cuestión se realizaron varios experimentos. Inicialmente se analizó si en *S. pombe* existía co-localización entre las proteínas Syb1-GFP, como marcador de EEs, y Gga22-RFP. Como se puede observar en la **figura 47A** ambas proteínas co-localizaban (puntos amarillos en la imagen superpuesta). La cuantificación correspondiente con el programa JaCoP (*Just another Colocalization Plugin*) del software ImageJ demostró que un 60% de los puntos citoplasmáticos de Syb1-GFP co-localizaban con Gga22-RFP y un 64% de los puntos de Gga22-RFP co-localizaban con Syb1-GFP (**gráfica** de la **figura 47A**). Este resultado indicaría que la función de los GGAs podría ejercerse tanto a nivel del PVC como a nivel de TGN/EEs.

A continuación se analizó la localización de la proteína Syb1-GFP en los mutantes *gga22Δ*, *bch1Δ gga22Δ*, *gga21Δ gga22Δ* y *bch1Δ gga21Δ gga22Δ*, en comparación con la localización de esta proteína de fusión en una cepa silvestre y en el mutante *bch1Δ*. Como se puede observar en la **figura 47B** la localización de la v-SNARE en el mutante *gga22Δ* fue similar a la que presenta en la cepa WT, mientras que su localización en el mutante doble *bch1Δ gga22Δ* fue similar a la que presenta en el mutante simple *bch1Δ*. En el mutante doble *gga21Δ gga22Δ* Syb1-GFP no se observaba ni en el ecuador ni en los polos celulares, indicando que en ausencia de los GGAs existía una alteración en el tráfico de esta proteína entre los EEs y la MP. Por último, en el triple mutante *bch1Δ gga21Δ gga22Δ* se observaba una mayor alteración en la localización

de Syb1-GFP, apareciendo unos cúmulos de la misma en el citoplasma en un 30% de las células (señalados por puntas de flecha en el panel correspondiente de la **figura 47B**). No obstante esta acumulación intracelular de Syb1-GFP es diferente a la que se observa en el mutante *bch1Δ apm1Δ*; este hecho sugiere que el daño en los EEs, y por lo tanto la relación funcional, entre el exómero y los GGAs son distintos a los observados entre el exómero y el adaptador AP-1, donde el defecto a nivel de TGN/EEs es mucho mayor.

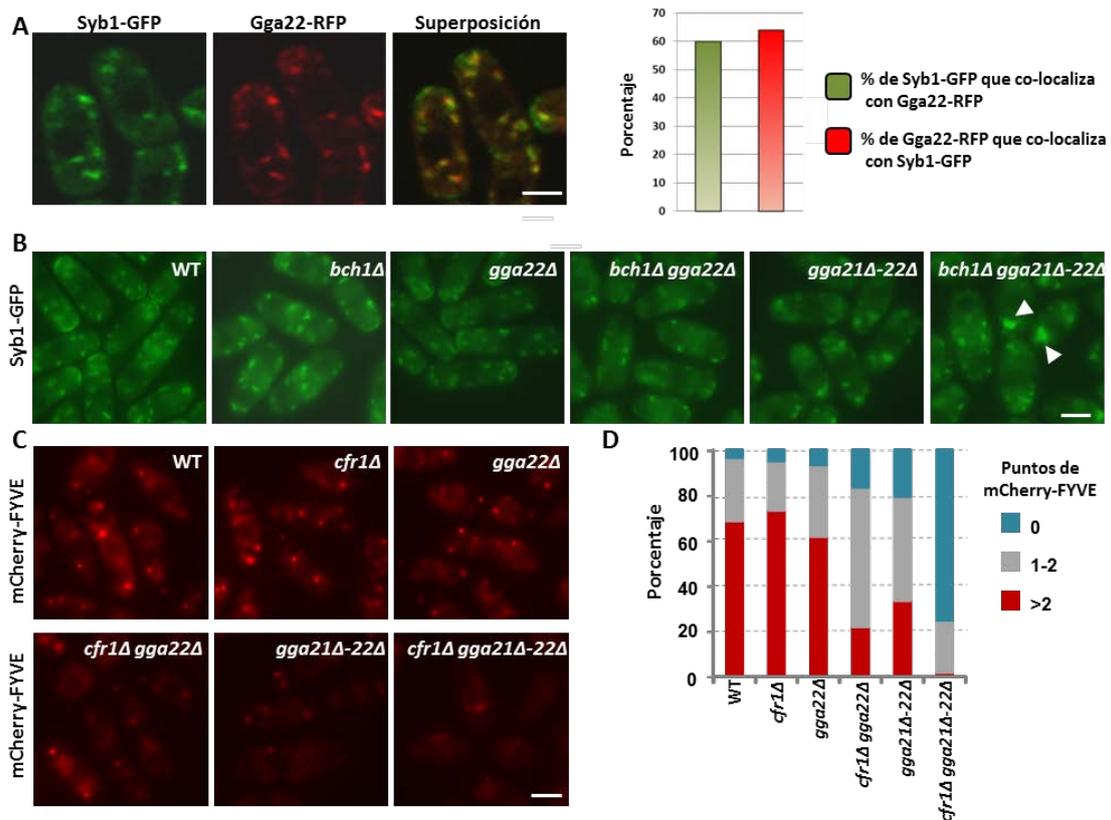


Figura 47. Localización de algunas proteínas del sistema endosomal en mutantes carentes del exómero y/o de adaptadores GGA.

A. Co-localización de las proteínas Syb1-GFP y Gga22-RFP. La gráfica de la derecha muestra el % de puntos citoplasmáticos de Syb1-GFP que co-localizan con Gga22-RFP y viceversa.

Las fotografías muestran un plano medio de las células adquiridas con un microscopio confocal Spinning-Disk. Barra de escala, 5 μ m.

B. Localización de la proteína de fusión Syb1-GFP en las cepas indicadas. Las puntas de flechas blancas marcan la localización de la proteína Syb1-GFP en cúmulos citoplasmáticos en el mutante triple.

C. Localización de la sonda mCherry-FYVE en las cepas indicadas.

Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

D. Cuantificación del número de puntos de mCherry-FYVE que aparecen en las cepas indicadas.

Finalmente se estudió la localización del dominio mCherry-FYVE en los mutantes carentes de los GGAs y del exómero, para conocer si existía algún daño en la zona del

sistema endosomal tardío en ausencia de ambos tipos de complejo. Como ya se ha mencionado la sonda mCherry-FYVE se localiza en puntos citoplasmáticos que se corresponderían con el PVC en una cepa WT y en el mutante *cfr1Δ* (Figura 47C); esta localización se mantiene en el mutante *gga22Δ*, aunque la señal fluorescente es algo más débil que en las cepas anteriores de manera que el tamaño de los puntos fluorescentes es menor al de la cepa control. En el caso del mutante doble *cfr1Δ gga22Δ* la señal fluorescente era menor a la de los mutantes sencillos correspondientes. Una cuantificación demostró que la ausencia del exómero reduce considerablemente el número de puntos fluorescentes por célula (Figura 47D). Finalmente en ausencia de ambos GGAs se observaba una menor presencia de puntos en el citoplasma, en comparación con la cepa WT, presencia que disminuía drásticamente en el mutante triple *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ*. Estos datos nos estaban indicando que en ausencia de los GGAs y del exómero existe un defecto a nivel del PVC que no se detecta en los mutantes *apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ*.

Teniendo en cuenta los distintos resultados que se han descrito hasta aquí, parece que el exómero de *S. pombe* presenta distintos tipos de interacciones con los adaptadores que interaccionan físicamente con la cubierta de clatrina, es decir, AP-1, AP-2 y GGAs. Pero además de la interacción con la clatrina todos estos adaptadores tienen en común que su función está relacionada con el sistema endosomal. El conjunto de datos obtenidos parece indicar que en ausencia de uno o de varios de estos complejos el propio sistema endosomal está dañado. En particular, la ausencia del exómero y de AP-1 altera el sistema del TGN/EEs mientras que la ausencia del exómero y los GGAs altera el sistema endosomal tardío.

9. Otros aspectos relacionados con tráfico vesicular en los mutantes del exómero en *S. pombe*

Como ya se ha contado en la introducción el tráfico vesicular es un proceso muy complejo en el que intervienen multitud de proteínas que forman parte de adaptadores, cubiertas, receptores u otros tipos de complejo (amarra, anclaje, etc)

necesario para que todo el proceso funcione de forma adecuada. Habíamos visto que el exómero está relacionado funcionalmente con AP-2, y que la localización del exómero de *S. pombe* es mayoritaria en el TGN/EEs, aunque también parece tener una función en el tráfico a nivel del PVC. Con el fin de completar la caracterización de la función del complejo Cfr1/Bch1, analizamos si éste podía estar implicado en otros aspectos del tráfico vesicular.

9.1 Proceso de endocitosis

En apartados anteriores se ha descrito que hay interacción entre componentes del exómero y de AP-2. Para poder conocer si la ausencia del complejo Cfr1/Bch1 afectaba al proceso de endocitosis se analizó la toma del colorante lipofílico FM4-64. Como ya se ha mencionado antes, se trata de un compuesto orgánico que permite observar el proceso endocítico *in vivo* desde su incorporación a la MP hasta la llegada a la membrana de la vacuola, pasando por toda la ruta endosomal (Betz *et al.*, 1992; Vida & Emr, 1995; Betz *et al.*, 1996). La tinción se realizó en cultivos mixtos de células de la cepa silvestre, la cual tenía una proteína del cuerpo polar del huso fusionada a la proteína verde fluorescente (Sad1-GFP) para poderla diferenciar, y del mutante *cfr1Δ*. El colorante se añadió al cultivo mixto y se tomaron muestras a los 0, 1, 2, 30 y 60 minutos de incubación a 32°C. Como podemos observar en las fotografías de fluorescencia (Figura 48A) en ambas cepas a tiempo 0 el colorante se observaba en la superficie celular, a los 2 minutos marcaba los endosomas internos y a los 30 minutos marcaba la membrana de la vacuola. Estos resultados muestran que no existían diferencias aparentes entre las células que presentaban señal de GFP (WT) o las células que no estaban marcadas (*cfr1Δ*) e indican que el proceso de endocitosis ocurre de manera normal en las células en las que está ausente el exómero.

9.2 Morfología y propiedades de las vacuolas

Otro de los aspectos relacionados con el tráfico vesicular que se decidió valorar fue la morfología y las propiedades de las vacuolas en ausencia del complejo Cfr1/Bch1. Con este fin se utilizó el colorante CDCFDA que permite teñir específicamente estos orgánulos. Como se observa en la figura 48B ni el tamaño ni la morfología de las

mismas parece verse afectado en los mutantes *cfr1Δ*, *bch1Δ* y *cfr1Δ bch1Δ* en relación a una cepa control (WT).

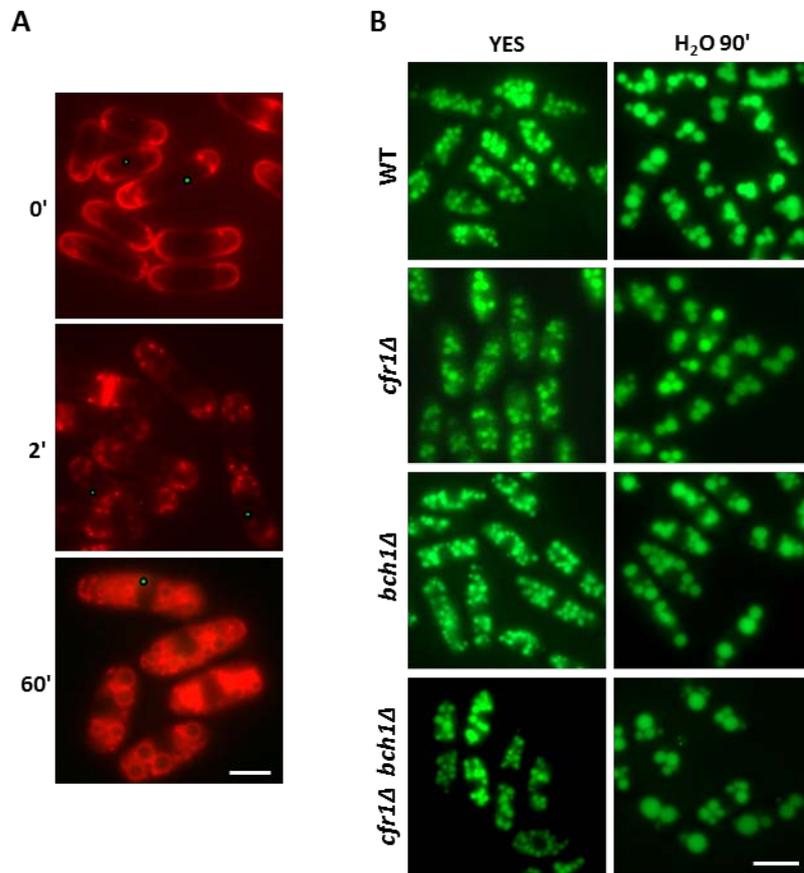


Figura 48. Los procesos de endocitosis y de fusión de las vacuolas no están alterados en ausencia del exómero.

A. Incorporación del colorante FM4-64 en cultivos mixtos de células silvestres que poseen la proteína Sad1-GFP y células del mutante *cfr1Δ*. Las células se tiñeron con el colorante y se fotografiaron tras el tiempo indicado (en minutos) de incubación a 32°C.

B. Fotografías de fluorescencia de las cepas indicadas teñidas con el colorante CDCFDA. Las células fueron cultivadas en medio rico (YES) (paneles de la izquierda) y después se transfirieron a agua y se incubaron durante 90 minutos (paneles de la derecha) para poder observar el proceso de fusión homotípica de las vacuolas. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μm.

También se analizó la capacidad de fusión de las vacuolas y para ello se sometió a las células a un choque hipo-osmótico, transfiriendo las células desde medio líquido YES a agua e incubándolas durante 90 minutos. Al cuantificar el porcentaje de las vacuolas que se habían fusionado, es decir presentan un tamaño mayor del que presentan en medio YES, se pudo observar que los valores eran muy similares en todas las cepas.

Estos resultados nos indican que no existen deficiencias de morfología, tamaño o capacidad de fusión homotípica de las vacuolas en ausencia del exómero.

9.3 Transporte desde o hacia el retículo endoplasmático

9.3.1 Relación entre el exómero de *S. pombe* y las vesículas COPII

Las vesículas COPII son las responsables del transporte de proteínas desde el RE al aparato de Golgi. Estas vesículas se concentran en dominios especializados denominados ERES (Spang, 2009a; Okamoto *et al.*, 2012). La cubierta de estas vesículas está formada por las proteínas Sec23 y Sec24 que reconocen los cargos, además de por otras dos proteínas denominadas Sec13 y Sec31. Además, es necesaria la actividad de la GTPasa Sar1 para que se produzca el reclutamiento de los distintos componentes que forman esta cubierta vesicular (Jensen & Schekman, 2011).

Lo primero que hicimos fue analizar si existían diferencias en la localización de algunas de los componentes necesarios para la formación de las vesículas COPII. Así, utilizamos la proteína Sec24 marcada con la proteína verde fluorescente (Sec24-GFP) y observamos su localización en una cepa silvestre y en el mutante *cfr1Δ*. Como se puede observar en la **figura 49A** la proteína Sec24 aparecía de forma discontinua en todo el contorno celular y nuclear y en membranas internas, siguiendo un patrón de localización similar al de las proteínas que se localizan en el RE. De hecho, al utilizar la proteína Sur4-mCherry (Sur4 está implicada en la síntesis de esfingolípidos y se localiza en el RE) como marcador del RE se observaba que la señal de Sec24 coincidía con la de este orgánulo. La localización discontinua de Sec24-GFP seguramente se debía a la concentración de esta proteína en los ERES. Como se observa en la figura no hay diferencias aparentes en la localización de la proteína Sec24 entre la cepa control (WT) y el mutante *cfr1Δ*.

También estudiamos la localización de Sar1, la GTPasa necesaria para el reclutamiento de la cubierta COPII al RE, utilizando la proteína de fusión Sar1-GFP. Como en el caso anterior utilizamos la proteína Sur4-mCherry como marcador del RE. Como se puede observar en la **figura 49B** Sar1 aparecía de manera débil en el RE, destacando la señal en el RE perinuclear y cortical, y observándose también en cúmulos en el citoplasma. En este caso la co-localización era parcial con la proteína Sur4 cuya localización era en todo el contorno celular, alrededor del núcleo y en

membranas internas. En cualquier caso, no se encontraron diferencias entre la localización de la proteína Sar1 en la cepa control (WT) y en el mutante *cfr1Δ*.

Por último, nos planteamos la posibilidad de que existiera algún tipo de interacción física entre la cubierta COPII y el complejo Cfr1/Bch1. Analizamos esta posibilidad mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1-HA y Sec24-GFP. Los extractos celulares procedentes de las cepas que portaban una de las proteínas de fusión (Cfr1-HA y Sec24-GFP) o la cepa que portaba las dos proteínas de fusión se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal anti-GFP. Se realizó un ensayo de *Western blot* utilizando anticuerpos anti-HA o anti-GFP para la detección de las proteínas marcadas en los inmunoprecipitados (IP) y en los extractos celulares. El resultado mostró que entre ambas proteínas no existía interacción alguna (**Figura 49C**).

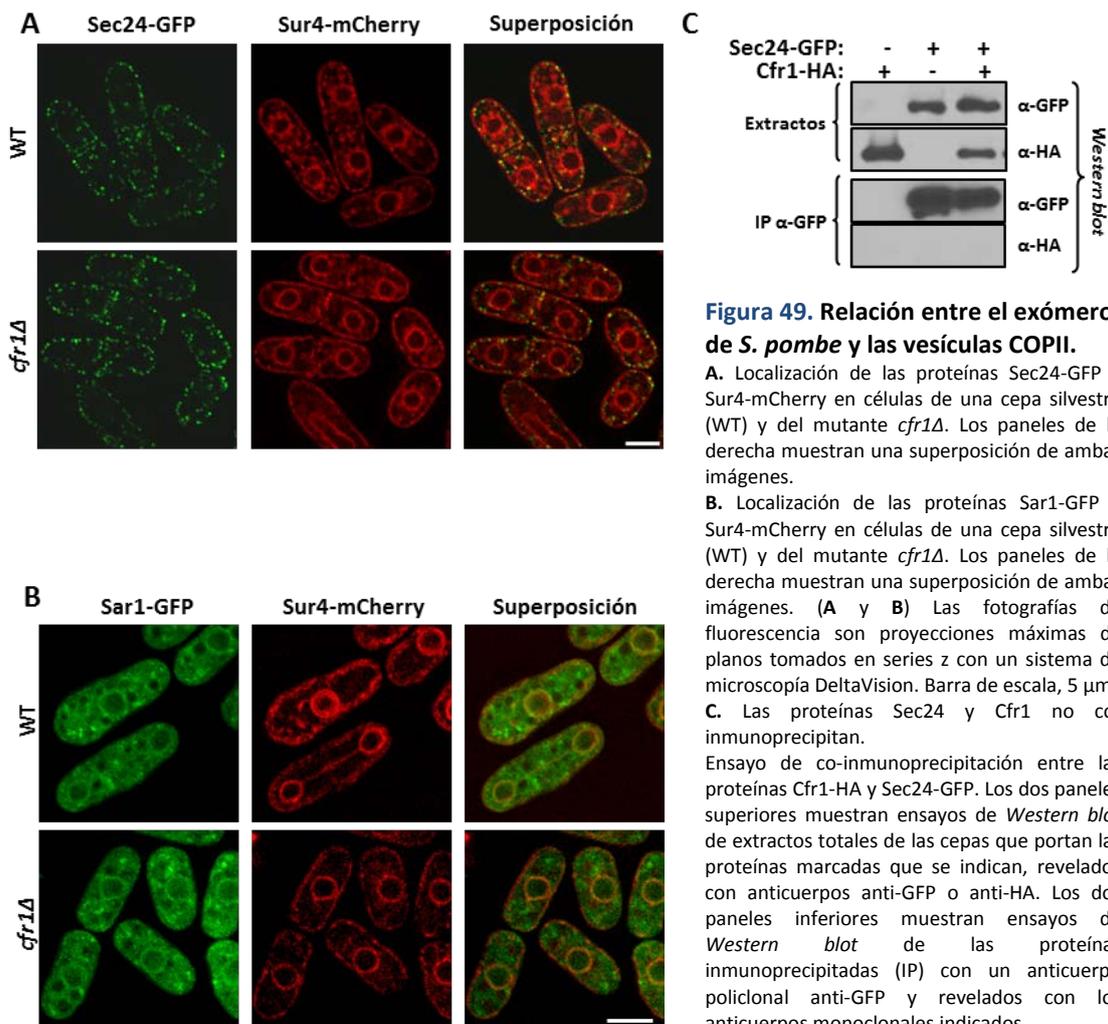


Figura 49. Relación entre el exómero de *S. pombe* y las vesículas COPII.

A. Localización de las proteínas Sec24-GFP y Sur4-mCherry en células de una cepa silvestre (WT) y del mutante *cfr1Δ*. Los paneles de la derecha muestran una superposición de ambas imágenes.

B. Localización de las proteínas Sar1-GFP y Sur4-mCherry en células de una cepa silvestre (WT) y del mutante *cfr1Δ*. Los paneles de la derecha muestran una superposición de ambas imágenes. (**A** y **B**) Las fotografías de fluorescencia son proyecciones máximas de planos tomados en series z con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μm.

C. Las proteínas Sec24 y Cfr1 no co-inmunoprecipitan.

Ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1-HA y Sec24-GFP. Los dos paneles superiores muestran ensayos de *Western blot* de extractos totales de las cepas que portan las proteínas marcadas que se indican, revelados con anticuerpos anti-GFP o anti-HA. Los dos paneles inferiores muestran ensayos de *Western blot* de las proteínas inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo policlonal anti-GFP y revelados con los anticuerpos monoclonales indicados.

Los resultados descritos en este apartado indican que el exómero de *S. pombe* no actúa colaborando con las vesículas COPII en el transporte de las distintas proteínas desde el RE hasta el aparato de Golgi.

9.3.2 Relación entre el exómero de *S. pombe* y las vesículas COPI

El transporte retrógrado dentro del aparato de Golgi hacia el RE se lleva a cabo por las vesículas COPI. Este transporte es importante para la recuperación de proteínas que actúan ayudando a otras en su transporte desde el RE al aparato de Golgi, de manera que ciclan de forma continua entre estos orgánulos (Hsu & Yang, 2009). Las vesículas COPI y COPII son estructuralmente diferentes. La cubierta de las vesículas COPI está formada por siete proteínas diferentes: Ret1, Ret2, Ret3, Sec21, Sec26, Sec27 y Sec28; la GTPasa necesaria para el reclutamiento de esta cubierta vesicular es Arf1. El GEF Sec72 es uno de los reguladores que activan a Arf1 para llevar a cabo su función en el Golgi (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003). Esta GTPasa junto con el propio GEF también es necesaria para el reclutamiento de las vesículas de clatrina y del exómero.

Como en el caso anterior decidimos mirar la localización de alguna de estas proteínas en ausencia del complejo Cfr1/Bch1. En este caso se utilizó Sec72-GFP, a pesar de no ser un GEF específico de estas vesículas ni ser el único GEF de Arf1, por ser el marcador del que disponíamos. Como podemos observar en la **figura 50A** aparecía localizada en puntos dispersos por el citoplasma, no coincidiendo con el patrón de localización del RE (Sur4-mCherry). Además pudimos observar que no existían diferencias en la localización de Sec72 entre la cepa control (WT) y el mutante *cfr1Δ*.

Decidimos comprobar si existía interacción física entre la proteína Sec72 y la proteína Cfr1, para lo que realizamos una co-inmunoprecipitación utilizando las proteínas Sec72-GFP y Cfr1-HA. El resultado de este ensayo fue que no existía interacción alguna entre ambas proteínas (resultado no mostrado). Por ello, decidimos utilizar una proteína específica del complejo COPI para analizar la existencia o no de interacción física entre COPI y el exómero.

La interacción entre la cubierta COPI y el complejo Cfr1/Bch1 se analizó con un ensayo de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Cfr1-GFP y Sec28-HA. De tal forma que los extractos celulares procedentes de las cepas que portaban una de las proteínas de fusión (Cfr1-GFP o Sec28-HA) o de la cepa que portaba las dos proteínas de fusión se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal anti-GFP. Se realizó un ensayo tipo *Western blot* utilizando anticuerpos anti-HA o anti-GFP para la detección de las proteínas marcadas en los inmunoprecipitados (IP) y en los extractos celulares (**Figura 50B**). El resultado mostró que entre ambas proteínas no existía interacción alguna física.

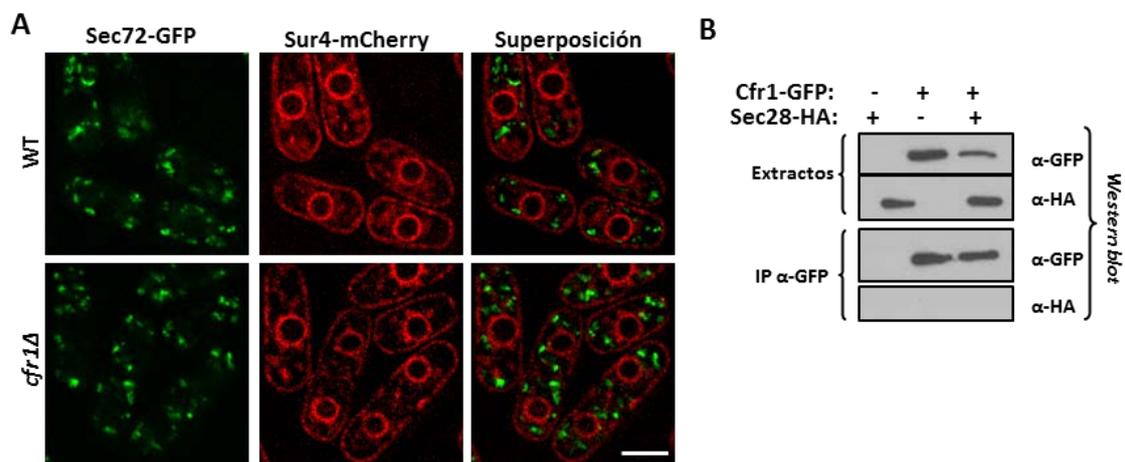


Figura 50. Relación entre el exómero de *S. pombe* y las vesículas COPI.

A. Localización de las proteínas Sec72-GFP y Sur4-mCherry en células de la cepa silvestre (WT) y del mutante *cfr1Δ*. Los paneles de la derecha muestran una superposición de ambas imágenes.

Las fotografías de fluorescencia son proyecciones máximas de planos tomados en series z con un sistema de microscopía DeltaVision. Barra de escala, 5 μ m.

B. Extractos celulares de las cepas que expresan las proteínas de fusión Cfr1-GFP y/o Sec28-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 (IP) y se analizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-GFP y anti-HA.

En resumen, los experimentos descritos en este apartado, aunque no son concluyentes, sugieren que no existe relación física ni funcional entre el exómero y las cubiertas vesiculares COPI. A su vez, ya habíamos comprobado que tampoco existe interacción entre el exómero y las cubiertas COPII. Además habíamos visto que no hay interacción física entre el exómero y la clatrina. Es decir, a falta de analizar interacción con el retrómero, el exómero no interacciona físicamente con las cubiertas vesiculares que participan en el tráfico vesicular de *S. pombe*.

9.3.3 Relación entre el exómero de *S. pombe* y el receptor Rer1

La proteína Rer1 es un receptor que reconoce aminoácidos polares en los dominios transmembranales de algunas proteínas del RE que ciclan entre RE y el aparato de Golgi y facilita su inclusión en vesículas COPI para su vuelta al RE (Sato & Nakano 2003; Kaether *et al.*, 2007; Spasic *et al.*, 2007). Decidimos analizar si existía interacción entre este receptor y el exómero de *S. pombe*.

Lo primero que hicimos fue analizar la localización de la proteína Rer1 unida a GFP (Rer1-GFP) en una cepa silvestre y en los mutantes simples o el mutante doble del complejo. Como podemos observar en la [figura 51A](#), en una cepa WT la proteína Rer1-GFP se localizaba como puntos discretos en el citoplasma, con un patrón de localización similar al del aparato de Golgi. En los mutantes *cfr1Δ*, *bch1Δ*, y *cfr1Δ bch1Δ* la localización era similar.

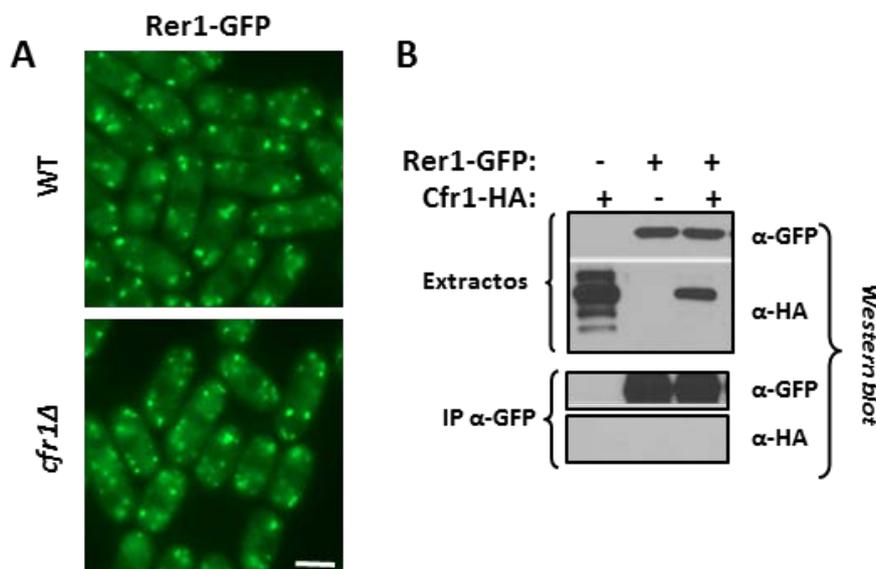


Figura 51. Relación entre el exómero de *S. pombe* y el receptor Rer1.

A. Localización de la proteína Rer1-GFP en células de una cepa silvestre (WT) y del mutante *cfr1Δ*. Imágenes adquiridas con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala, 5 μ m.

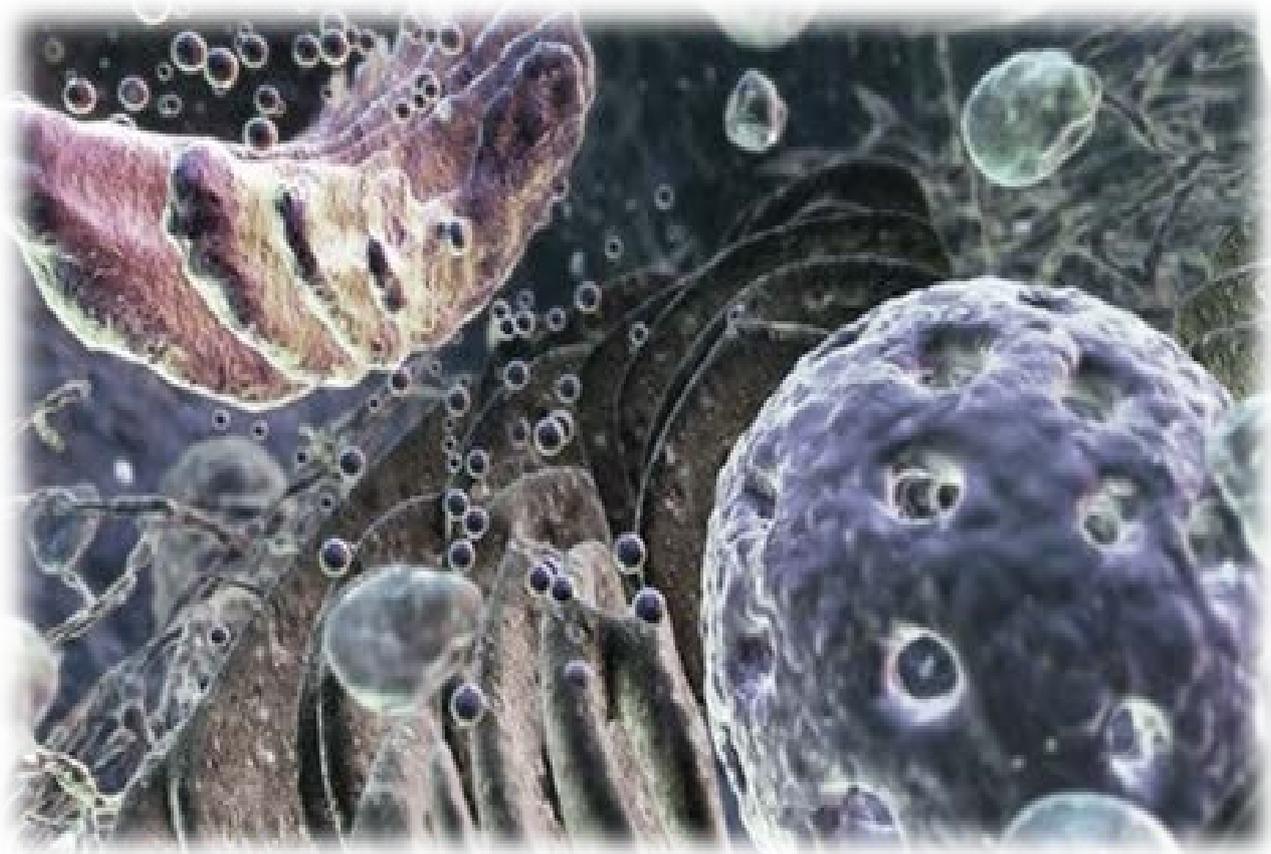
B. Los dos paneles superiores muestran ensayos de *Western blot* de extractos totales de las cepas que portan las proteínas marcadas que se indican, revelados con anticuerpos anti-GFP o anti-HA. Los dos paneles inferiores muestran ensayos de *Western blot* de las proteínas inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo policlonal anti-GFP y revelados con los anticuerpos monoclonales indicados.

También analizamos si existía interacción física entre este receptor y al complejo mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación. En este caso pudimos observar que la proteína Cfr1-HA no aparecía en los inmunoprecipitados (IP) de una cepa que portaba

Cfr1-HA y Rer1-GFP. Por tanto, podemos concluir que, en principio, no existía interacción física entre ellas (**Figura 51B**).

En resumen, de todos los aspectos estudiados y relacionados con el tráfico vesicular hemos comprobado que el exómero de *S. pombe* no interviene en el proceso de endocitosis ni en la dinámica de vacuolas. A su vez, parece que no interacciona con cubiertas vesiculares ni con otros receptores implicados en el tráfico de proteínas entre el RE y el Golgi. Por lo tanto, sólo existe relación funcional con adaptadores de clatrina relacionados con el tráfico a nivel del TGN/endosomas.

Discusión



La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* ha sido y sigue siendo un modelo indiscutible a la hora de abordar el estudio de procesos biológicos de células eucariotas. La facilidad de su manejo en el laboratorio, junto con el rápido desarrollo de técnicas genéticas y moleculares para su manipulación, ha hecho que este organismo haya estado siempre en la cresta de la ola de la investigación en biología celular. Sin embargo no hay que olvidar que este organismo tiene sus propias características que le distinguen de los demás, por lo que es razonable acudir a otros organismos modelo de fácil manejo para ampliar y complementar los estudios llevados a cabo con él. La levadura de fisión *S. pombe* se separó de *S. cerevisiae* hace unos 400 millones de años y es un modelo establecido para estudios sobre la regulación del ciclo celular, el establecimiento de la polaridad y la citocinesis. Esta levadura también se está estableciendo como un modelo útil a la hora de estudiar algunos procesos de transporte vesicular porque hay aspectos de los mismos que son más similares entre *S. pombe* y metazoos que entre *S. pombe* y *S. cerevisiae* (de León & Valdivieso, 2016).

El descubrimiento del exómero en la levadura de gemación fue un hallazgo importante porque supuso la identificación de un complejo de proteínas que podría ser una cubierta implicada en el tráfico entre el TGN y la membrana plasmática. Esta ruta de transporte, siendo de gran relevancia biológica, está menos caracterizada que el tráfico entre el RE y el Golgi o que la endocitosis (Spang, 2015). Seguramente esto se debe a que ésta es una ruta de tráfico vesicular que requiere la participación de multitud de elementos. Se sabe que hay una gran variedad de los llamados "carriers" (compartimentos membranosos), incluyendo los CARTS (*CARriers of the TGN to the cell Surface*) descritos recientemente (Wakana *et al.*, 2012), que median el transporte de proteínas desde el aparato de Golgi hasta dominios especializados de la membrana plasmática (De Matteis & Luini, 2008). Mientras que el empaquetamiento de algunos cargos en los carriers se lleva a cabo por AP-1, otras cubiertas y adaptadores que participan en la selección de cargos (Bonifacino, 2014). Además en muchos casos no se ha podido determinar si los carriers tienen adaptadores, receptores o cubiertas específicas (De Matteis & Luini, 2008; Wakana *et al.*, 2012; Spang, 2015). Una complicación adicional a la hora de estudiar el tráfico entre el Golgi y la superficie celular es el hecho de que no hay una delimitación clara entre el Golgi, el TGN y los

endosomas tempranos. Esto es así porque estos orgánulos celulares no son compartimentos estancos sino que van madurando, de manera que unos van dando lugar a otros; además entre ellos hay continuos procesos de fusión y de fisión, lo que complica enormemente su estudio (Lemmon & Traub, 2000; Huotari & Helenius, 2011; Scott *et al.*, 2014).

La función más caracterizada del exómero es la regulación de la enzima quitín sintasa Chs3. El interés de estudiar una posible función conservada del exómero en *S. pombe* radica en el hecho de que esta levadura posee una pared celular compuesta por glucanos y mananos, pero no de quitina. Por lo tanto estos estudios pueden poner de manifiesto una función más general del exómero, que *S. cerevisiae* habría adaptado a su necesidad de sintetizar quitina. Además se podría obtener información acerca de la regulación de la síntesis de glucano evitando la interferencia de los mecanismos compensatorios que se producen en otros hongos cuando la síntesis de glucano es defectuosa (García-Rodríguez *et al.*, 2000; Valdivieso *et al.*, 2000). Por lo tanto la caracterización del exómero en *S. pombe* podría complementar la información que se ha obtenido en la levadura de gemación. Pero además al participar el exómero en el transporte entre el aparato de Golgi, los endosomas y la membrana plasmática, su estudio en otro organismo podría aportar información acerca del funcionamiento del tráfico entre estos orgánulos, tráfico que ocurre en todos los eucariotas.

***S. pombe* posee la forma más sencilla posible de un exómero**

El exómero de *S. cerevisiae* está formado por Chs5 y por cuatro proteínas ChAP (Santos *et al.*, 1997; Sanchatjate & Scheckman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). En la levadura de fisión Cfr1 comparte con Chs5 cierta identidad y la presencia del módulo FBE en su extremo amino terminal (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006; Martín-García *et al.*, 2011) y Bch1 comparte con las ChAPs de *S. cerevisiae* algo de identidad y la presencia de varios dominios TRP, necesarios para la funcionalidad de esta familia de proteínas (Rockenbauch *et al.*, 2012). Dado que la presencia de los dominios TPR en la proteína Bch1 de *S. pombe* está basada en predicciones informáticas y no se ha comprobado su relevancia biológica, la existencia de proteínas

similares a Chs5 y a las ChAPs no era garantía de la existencia de un complejo funcional similar al exómero en la levadura de fisión.

En este trabajo se ha demostrado que en *S. pombe* Cfr1 y Bch1 forman un complejo que tiene las características básicas del exómero: se localiza a nivel del TGN/endosomas tempranos de una manera dependiente de la actividad de la GTPasa Arf1 y del módulo FBE de Cfr1. Nos planteamos la posibilidad de que este complejo estuviera formado, además, por otras proteínas aunque éstas no presentaran similitud de secuencia con las ChAP. Para abordar esta cuestión se realizaron varios rastreos de dos híbridos sin éxito alguno, de tal manera que asumimos que el exómero de *S. pombe* está formado únicamente por dos proteínas, representando este complejo la forma más sencilla de un exómero. En otros organismos el exómero habría evolucionado a formas más complejas por sucesivos procesos de duplicación génica de manera que la diversidad de ChAPs habría permitido una especialización de sus funciones (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Rocero *et al.*, 2016).

Además de ser más sencillo, o quizás por esta razón, el exómero de *S. pombe* tiene una característica diferencial. En *S. cerevisiae* Chs5 se considera una proteína andamio porque en su ausencia las ChAPs se deslocalizan del TGN. En ausencia de las ChAPs, aunque lo hace más débilmente, Chs5 sigue estando localizada en el TGN (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Sin embargo en *S. pombe* la localización de los dos componentes del exómero es interdependiente. Trabajos recientes han demostrado que en *S. cerevisiae* la función de todas las ChAPs no es equivalente, de manera que Bch1 es la ChAP que contribuye más a la estabilidad de Chs5 en la membrana del TGN (Paczkowski & Fromme, 2014; Huranova *et al.*, 2016). Es posible que en *S. pombe*, donde no hay otras ChAPs, Bch1 sea totalmente necesaria para esta estabilidad de Cfr1 en la membrana, explicando la interdependencia de los dos componentes del exómero para su localización en las membranas del TGN/EEs.

En cuanto a la localización de este complejo, en *S. cerevisiae* se demostró que Chs5 reside en los mismos compartimentos que Kex2 (Santos & Snyder, 1997), es decir TGN y EEs (Holthuis *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2000). Nuestros datos amplían la localización del exómero al compartimento pre-vacuolar. Habrá que determinar si ésta es una

característica del exómero de *S. pombe* o un patrón general, ya que aunque se ha publicado que en ausencia de Chs6 la ruta de maduración de la carboxipeptidasa Y no está "significativamente alterada" (mencionado como resultado no mostrado por Ziman y colaboradores (Ziman *et al.*, 1998)), esta posibilidad no se ha descartado completamente.

El exómero de *S. pombe* participa en el tráfico intracelular desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática

Dado que el papel más conocido del exómero es la regulación de la síntesis de la pared celular, realizamos un análisis de esta estructura en los mutantes del exómero de *S. pombe*. Encontramos que en los mutantes había un defecto en la síntesis del β -glucano que, aunque no era muy drástico, era reproducible. Sorprendentemente cuando se analizó por microscopía la distribución de las enzimas β GS en dichos mutantes se observó que ninguna de ellas parecía quedar retenida, ni total ni parcialmente, en compartimentos intracelulares. El mismo resultado se obtuvo cuando se analizó la localización de algunos de sus reguladores o de otras proteínas implicadas en la síntesis de la pared celular. Así, aunque algunas de las enzimas β GS co-localizaban y co-inmunoprecipitaban con Cfr1, no parecía que fueran cargos del exómero. Curiosamente en *S. cerevisiae* la enzima β GS *FKS1*, que *a priori* sería un buen cargo para el exómero por ser una proteína transmembranal que se localiza de forma polarizada, no ve alterado su patrón de localización en los mutantes del exómero (resultados de nuestro laboratorio). Estos resultados indican que las enzimas β GS no son cargos del exómero.

La observación al microscopio electrónico de mutantes *cfr1* Δ demostró que estos mutantes tienen una alteración en la morfología del aparato de Golgi, de manera que este orgánulo tiene más cisternas que el de la cepa silvestre; además en el mutante las cisternas están desorganizadas. Se han descrito alteraciones en la morfología del aparato de Golgi en mutantes que tienen alterado el tráfico entre el RE y el Golgi o el transporte retrógrado dentro del Golgi (mutantes defectivos en la actividad de Arf1 o carentes de COPI). Esto es así porque en esos mutantes hay una alteración en la

homeostasis de este orgánulo, al no haber un balance entre las proteínas y lípidos que salen del aparato de Golgi y los que llegan a este orgánulo (Ward *et al.*, 2001; Sengupta & Linstedt, 2011; Bhave *et al.*, 2014; Papanikou *et al.*, 2015). Este resultado indica que en los mutantes del exómero hay una alteración del tráfico a través/desde el aparato de Golgi. Curiosamente en los mutantes de COPI la secreción casi no se afecta aunque el Golgi sea aberrante (Papanikou *et al.*, 2015). Algo similar podría estar pasando en el mutante *cfr1Δ*, en el que la alteración del Golgi no impediría ni la secreción de fosfatasa ácida ni el transporte de las enzimas βGS hasta la membrana plasmática. Sin embargo en algunos casos el transporte que tiene lugar en ausencia del exómero no sería totalmente eficiente ya que, según los fraccionamientos subcelulares, el patrón de distribución de Bgs4 no es el mismo que en una cepa silvestre. No sabemos si la presencia de Bgs4 en fracciones adicionales en los gradientes del mutante *cfr1Δ* son consecuencia de que una fracción de Bgs4 se desvía al PVC, de que el paso de esta proteína a través de los distintos estadios del aparato de Golgi está alterado, o de que lo que se altera es su transporte desde el Golgi/TGN, a través de los endosomas, hacia la membrana plasmática. El hecho de que la v-SNARE Syb1 no se localice eficientemente en la superficie celular en mutantes del exómero sugiere que ésta última posibilidad es la más plausible, ya que indica que en ausencia del exómero el tráfico por los endosomas no es eficiente. Además una alteración en la función y/o en la composición de la membrana de los endosomas tempranos podría explicar que agregados de una subunidad del complejo AP-2 se acumulen en el citoplasma. Hay vesículas que se desnudan una vez que se han escindido de la membrana donadora, mientras que otras necesitan el contacto con un complejo amarra en la membrana receptora para iniciar la desorganización de la cubierta (Barlowe & Miller, 2013). No hemos encontrado información acerca de si el complejo AP-2 llega a entrar en contacto con las membranas de los endosomas tempranos. Si este contacto fuera necesario para un desensamblaje organizado de la cubierta AP-2/clatrina, y en la membrana de los endosomas de los mutantes del exómero faltara un elemento necesario para dicho proceso, es posible que la cubierta no se disgregara completamente y agregados de la misma se acumularan en el citoplasma. Los hechos de que haya interacción génica entre *cfr1⁺* y *ap13⁺* (Figura 23A) y entre *cfr1⁺* y *end4⁺* (resultados no mostrados) e interacción física entre Cfr1 y Apm4 (Figura 23B)

demuestran que el exómero participa en algún aspecto del tráfico endocítico. Sin embargo la toma de FM4-64 no está alterada cuando falta el exómero, lo que está de acuerdo con la idea de que la relación entre el exómero y la endocitosis ocurre después de la internalización de la vesícula endocítica.

Es frecuente leer en la literatura que el exómero es necesario para el tráfico directo desde el Golgi a la membrana plasmática de *Chs3*. Sin embargo se sabe que en ausencia del exómero esta enzima queda retenida en unos compartimentos intracelulares (que a veces se han denominado quitosomas) que tienen características de TGN y EEs, ya que diferentes experimentos mostraron que los quitosomas no eran iguales a las membranas del aparato de Golgi (Ziman *et al.*, 1996). Además los quitosomas co-localizan con Kex2, su producción está bloqueada en un mutante *end4Δ* (lo que indica que la endocitosis es necesaria para el mantenimiento y producción de estos orgánulos), y son accesibles a FM4-64 (Santos *et al.*, 1997; Santos & Snyder, 1997; Ziman *et al.*, 1998; Valdivia *et al.*, 2002). Finalmente el hecho de que la llegada de *Chs3* a los quitosomas pueda ser independiente del proceso de endocitosis (en el mutante doble *chs6Δ end4Δ* *Chs3* se sigue acumulando en los quitosomas (Ziman *et al.*, 1998)) sugiere que la proteína también llega hasta estos orgánulos desde el aparato de Golgi. En definitiva todos estos datos muestran que los quitosomas son semejantes a los endosomas tempranos, y que *Chs3* podía llegar a ellos desde la membrana plasmática y desde el Golgi. La mayor parte de esta enzima QS se mantiene en un reservorio intracelular que cicla entre el TGN y los endosomas tempranos. El tráfico de *Chs3* desde este reservorio hacia la superficie celular requiere la presencia del exómero (Santos & Snyder, 1997; Ziman *et al.*, 1998), mientras que AP-1 es necesario para el transporte retrógrado desde los EEs al TGN (Valdivia *et al.*, 2002). En base a todos estos datos no está rigurosamente establecido si el exómero de *S. cerevisiae* promueve el tráfico directo desde el Golgi a la membrana plasmática, lo hace desde el TGN, o incluso desde los endosomas tempranos. Teniendo en cuenta estos datos y los que hemos obtenido en este trabajo, parece razonable concluir que en ambas levaduras el exómero media el transporte entre el TGN y la superficie celular a través de los endosomas.

En cualquier caso lo que demuestran nuestros resultados es que en ausencia del exómero de *S. pombe* el tráfico desde el aparato de Golgi hasta la superficie celular está ligeramente alterado, y que esta alteración se correlaciona con un leve defecto en la síntesis de la pared celular. Además sugieren que el defecto del tráfico ocurre a nivel del TGN, o más probablemente desde los EEs. Según los gradientes subcelulares también hay una alteración en la distribución de Pma1, lo que sugiere que en ausencia del exómero el transporte de otras proteínas de membrana también estaría alterado. Si éste fuera un defecto general (y eso es lo que podría deducirse de la morfología aberrante del aparato de Golgi) el mutante *cfr1Δ* tendría fenotipos pleiotrópicos, y eso es lo que hemos observado en el laboratorio ya que además de tener un ligero defecto en conjugación (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006) y ser sensible a compuestos que inhiben la síntesis de glucano, los mutantes del exómero son sensibles a una gran diversidad de compuestos (KCl, MgCl₂, NaCl, KAc, CaCl₂, EGTA, DTT y tunicamicina), y crecen despacio en medio mínimo (Figura 12 y resultados de nuestro laboratorio). Así, el exómero de *S. pombe* y *S. cerevisiae* comparten un papel en el tráfico entre el Golgi y la superficie celular, aunque la naturaleza específica de las funciones de ambos complejos podría no ser la misma.

El exómero de *S. pombe* colabora con el complejo AP-1 en el tráfico intracelular entre el TGN y los endosomas tempranos

El exómero de *S. pombe* co-localiza y co-fracciona con Sec72 y con FM4-64, por lo que se puede concluir que se localiza en el TGN y en los EEs. Dado que el complejo adaptador de clatrina AP-1 ejerce su función en el tráfico entre estos compartimentos, que en *S. cerevisiae* AP-1 participa en la regulación de Chs3 (Valdivia *et al.*, 2002), y que en *S. pombe* AP-1 es necesario para un tráfico eficiente de Bgs1 desde el TGN/EEs hasta la membrana plasmática (Kita *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2012), analizamos la relación funcional entre el exómero y AP-1 en la levadura de fisión. Nuestros resultados han demostrado que AP-1 es necesario para que varias de las enzimas que participan en la síntesis de la pared celular se transporten eficientemente a la superficie celular, ya que en su ausencia quedan parcialmente retenidas en endosomas ((Yu *et al.*, 2012) y este trabajo). En los mutantes dobles carentes del exómero y de AP-1 las enzimas αGS y

β GS quedan más retenidas intracelularmente. El hecho de que en el mutante *cfr1Δ* *apm1Δ* la retención de las enzimas en los compartimentos intracelulares sea mayor que en el mutante simple *apm1Δ* se correlaciona con un crecimiento más sensible a la temperatura, una morfología más aberrante, y un defecto en la glucán sintasa más grave en el mutante doble que el mutante simple. Estos resultados sugieren que ambos adaptadores actúan de manera paralela en la misma ruta de transporte.

La observación al microscopio electrónico ha permitido ver que, mientras que el mutante *cfr1Δ* presenta aparatos de Golgi con múltiples cisternas, en el caso del mutante *apm1Δ* el aparato de Golgi está normalmente compuesto por 1-3 cisternas de apariencia aberrante. En el mutante doble no aumenta el número de cisternas del Golgi, que son aberrantes como en el mutante simple *apm1Δ*. En *apm1Δ* se observan una serie de estructuras membranosas de apariencia amorfa, mientras que en el mutante doble se acumulan una serie de túbulos y vesículas densas a los electrones conectados a las cisternas del Golgi, y que seguramente corresponden al TGN/EEs. Lo más probable es que estas estructuras sean las mismas que se observan por microscopía de fluorescencia como los lugares de acumulación de las enzimas α GS y β GS fusionadas a la GFP. Dado que estas estructuras tubulovesiculares densas a los electrones que se acumulan en el mutante doble *cfr1Δ apm1Δ* son semejantes a las que se observan en el mutante simple *apm1Δ* a 36°C, este dato confirma que en ausencia del exómero se agrava el fenotipo del mutante *apm1Δ*, y que ambos complejos colaboran en la misma ruta de transporte vesicular entre el TGN y los EEs. En ausencia de ambos complejos el daño que se produce sería tan grave que las proteínas no serían capaces de llegar hasta su destino final eficientemente. Además el reciclaje de los componentes de las membranas del TGN/EEs estaría alterado de tal forma que todo el sistema de tráfico desde y hacia los EEs estaría dañado. Este agravamiento en la organización de las estructuras intracelulares explicaría el agravamiento del resto de los fenotipos analizados en el mutante doble con respecto al mutante simple *apm1Δ*. Además el grave defecto en la organización de los compartimentos membranosos intracelulares explicaría la alteración que hemos observado en su distribución en los gradientes de sacarosa.

Los análisis de distintos marcadores llevados a cabo en este trabajo y por otros autores (Kita *et al.*, 2004) han demostrado que en el mutante *apm1Δ* hay una alteración tanto en la distribución/morfología del TGN (Sec72) como en la de los EEs (Syb1). En el mutante *cfr1Δ apm1Δ* se agrava fundamentalmente el defecto en los EEs, presentando Syb1 un nivel de retención intracelular muy alto, que presenta un patrón similar al de las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular. Por el contrario en los mutantes *apm1Δ* el patrón de distribución del PVC (mCherry-FYVE) es similar a la del WT, y solo presenta una ligera alteración en el mutante *cfr1Δ apm1Δ*. Esta alteración podría ser una consecuencia indirecta del defecto en el tráfico en el entorno de los EEs, que son el origen del PVC.

De todos estos datos podría concluirse que la ausencia conjunta del exómero y de AP-1 altera gravemente el tráfico a través de los endosomas tempranos. Si la situación fuera la misma en *S. cerevisiae* (que sepamos no se han hecho análisis de los mutantes equivalentes por microscopía electrónica en *S. cerevisiae*) esta alteración en el tráfico de los endosomas forzaría la apertura/utilización de una ruta alternativa para la llegada de ciertas proteínas a la superficie celular (Chs3 entre ellas (Valdivia *et al.*, 2002)), cosa que no ocurre en *S. pombe* al menos para las enzimas α GS y β GS. Esto está en la línea de que, aunque en ambos organismos los dos complejos participen en la misma ruta de transporte, el papel específico de cada uno de ellos, o la relación entre ambos adaptadores, tiene características propias de cada organismo. Así en el caso de *S. cerevisiae* la ausencia del complejo AP-1 apenas presenta fenotipos, a no ser que mutaciones en sus componentes se combinen con mutaciones en otros sistemas de transporte como la clatrina (Boehm & Bonifacino, 2001; Yeung *et al.*, 1999). En este organismo el complejo AP-1 es necesario para el reciclaje de la proteína Chs3 entre el TGN y los EEs en células carentes del exómero, lo que indica que en este organismo AP-1 juega un papel importante a nivel del tráfico retrógrado desde los EEs hacia el TGN (Valdivia *et al.*, 2002), mientras que el exómero parece más importante en el tráfico anterógrado (al menos para algunos cargos concretos). En el caso de *S. pombe* el papel del complejo AP-1 en el transporte anterógrado parece ser mucho más relevante que el del exómero. Prueba de ello es que en ausencia de AP-1 se produce un defecto en la secreción de la fosfatasa ácida (Kita *et al.*, 2011) que no se ha

observado en ausencia de los componentes del exómero. Además en la levadura de fisión AP-1 también está implicado en otros procesos como es la fusión de las vacuolas (Yu *et al.*, 2012), proceso en el que tampoco está implicado el exómero. Estos datos sugieren que AP-1 y el exómero colaboran en aspectos muy concretos del tráfico desde el TGN/EEs hacia la membrana plasmática. Dado que los resultados de este trabajo indican que en *S. pombe* AP-1 y el exómero actúan en rutas paralelas a nivel del tráfico entre el TGN, los EEs y la membrana plasmática, parece que esta colaboración ocurre a nivel del tráfico anterógrado.

El exómero de *S. pombe* colabora con los adaptadores GGA en el tráfico entre el TGN y los endosomas tardíos

En *S. cerevisiae* no hay datos que sugieran que el exómero tenga un papel en el tráfico vesicular a nivel de PVC/vacuolas (Valdivia *et al.*, 2002). En este trabajo hemos encontrado que, aunque el exómero de *S. pombe* se localiza mayoritariamente en la zona del TGN/EEs, también se detecta en el entorno tardío, es decir, a nivel del PVC/vacuolas. El dato inicial que indicó esta localización fue el resultado de los gradientes subcelulares, donde Cfr1 co-fraccionó parcialmente con la v-SNARE Pep12. También hemos encontrado que el exómero de *S. pombe* presenta tanto interacción génica como interacción física con los adaptadores GGA, que tanto en *S. cerevisiae* como en mamíferos se han descrito como reguladores del tráfico entre el TGN y el PVC. No obstante cada uno de estos dos resultados por sí mismo no era suficiente para considerar que Cfr1 estuviera en el sistema endosomal tardío por los siguientes datos: 1) Aunque en *S. cerevisiae* la localización mayoritaria de Pep12 es en el PVC y en la membrana de las vacuolas, algunos autores consideran que esta SNARE también aparece en el entorno de los endosomas tempranos en algunas circunstancias (Reggiori & Pelham, 2002); por lo tanto el dato de los gradientes de sacarosa no puede considerarse concluyente. 2) Aunque está admitido que los adaptadores GGA son necesarios para el tráfico de algunos cargos desde el TGN hacia los endosomas tardíos y las vacuolas, algunos de los datos publicados podrían indicar que estos adaptadores también funcionan a otro nivel. Así, estos adaptadores co-localizan e interaccionan

física y genéticamente con proteínas que actúan en la ruta de tráfico entre el TGN y los EEs, son necesarios para la retención de algunas proteínas transmembranales (incluyendo Chs3) en el entorno del TGN/EEs, y colaboran con AP-1 en el reclutamiento de cargos para su transporte anterógrado hasta su destino final. Además en *S. cerevisiae* la sinaptobrevina Snc1 (Syb1 en *S. pombe*), que en un silvestre se mantiene ciclando entre el TGN/EEs y la membrana plasmática, no se observa en la superficie celular en ausencia de los GGAs, indicando un papel de estos adaptadores en el reciclaje de esta proteína entre la membrana plasmática y los EEs. Finalmente en mamíferos se ha descrito que GGAs y AP-1 llevan a cabo funciones en el mismo entorno y que existe colaboración entre ellos (Black & Pelham, 2000; Boman *et al.*, 2000; Costaguta *et al.*, 2001; Boman *et al.*, 2002; Doray *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005; Costaguta *et al.*, 2006; Copic *et al.*, 2007; Daboussi *et al.*, 2012; Hirst *et al.*, 2012). Dado que en *S. pombe* también hemos observado co-localización de Syb1 con Gga22 y que la localización de GFP-Syb1 en la superficie celular se pierde en ausencia de los GGAs, no se podía descartar que la interacción entre el exómero y los adaptadores GGA estuviera ocurriendo en el entorno TGN/EEs, de manera que exómero, AP-1 y los GGAs estuvieran coordinándose entre ellos en el entorno del TGN/endosomas tempranos.

Aunque sería necesario un mejor conocimiento de la naturaleza del sistema endosomal y de la función de los propios adaptadores para distinguir de manera inequívoca entre las posibilidades de que el exómero esté relacionado con los GGAs a nivel del TGN/EEs o lo esté a nivel del TGN/PVC, los siguientes datos sí que sugieren que (al menos en parte) el exómero también está funcionando en el sistema endosomal tardío, de manera que la localización y la función de este complejo son más amplias de lo que se sospechaba en base a los resultados obtenidos con *S. cerevisiae*: 1) En los mutantes del exómero hay una desviación de Cpy1 a la superficie celular. 2) El análisis de marcadores demostró que, mientras que en ausencia de AP-1 y del exómero sólo había una pequeña alteración en el patrón de distribución mCherry-FYVE (marcador del PVC), la distribución de esta sonda estaba significativamente alterada en el mutante doble *cfr1Δ gga22Δ* y prácticamente estaba ausente en las células del mutante *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ*. Dado que éste es un marcador indirecto, no podemos

asegurar si en esos mutantes hay una disminución en tamaño/número de PVCs o lo que ocurre es que la membrana de este compartimento tiene alterada su composición, de manera que haya menos PI3P al que pueda unirse la sonda. En estos momentos se están construyendo cepas para analizar la distribución de Pep12 en los mutantes de interés, y se han enviado células de los mismos para su análisis por microscopía electrónica. 3) Mientras que en los mutantes *apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ* la morfología del TGN (Sec72) y de los EEs (Syb1) se alteraba de manera muy evidente, en los mutantes carentes del exómero y/o de ambos GGAs se perdía la localización de Syb1 en la superficie celular, pero esta v-SNARE no se acumulaba intracelularmente de manera significativa. En el mutante *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ* sí que se observó cierta acumulación intracelular de Syb1, pero tanto el número de células en las que ocurría esto como el tamaño de los cúmulos era menor que en caso de los mutantes *apm1Δ* y *cfr1Δ apm1Δ*. Esta retención parcial de Syb1 podría indicar una colaboración del exómero y los GGAs a nivel de EEs, pero también podría ser una consecuencia indirecta de un defecto en la funcionalidad del compartimento pre-vacuolar, que afectara a los EEs.

Teniendo en cuenta toda la información mencionada nuestra opinión es que, en conjunto, los datos obtenidos sí que indican que la función del exómero es más amplia de los que se sospechaba hasta el momento, estando implicado también en funciones de tráfico vesicular en la zona tardía del sistema endosomal donde colabora con los adaptadores GGA.

¿Cuál es la función conservada del exómero?

Cuando se habla de la función del exómero lo primero que ha sido objeto de discusión, desde que se describió este complejo de proteínas es si se trata de una cubierta vesicular o de un adaptador. Las primeras hipótesis mantenían la idea de que este complejo tenía todas las características para ser una cubierta vesicular debido a su dependencia de la GTPasa Arf1 para su reclutamiento en el TGN, y a su capacidad para interactuar con esta GTPasa y con los cargos (Trautwein *et al.*, 2006). Aunque quedaba por demostrar la característica más importante para poder afirmar que se trataba de una auténtica cubierta vesicular, si poseía o no la capacidad de deformar las

membranas. A pesar de que se demostró su capacidad para interactuar con membranas sintéticas *in vitro*, el exómero no era capaz de deformarlas como sucede en el caso de las cubiertas vesiculares COPII y COPI (Wang *et al.*, 2006). Posteriormente se demostró por análisis cristalográfico que el módulo FBE de Chs5 tenía una estructura similar al apéndice/oreja de los adaptadores tipo AP y GGA, por lo que pasó a considerarse un adaptador. Sin embargo trabajos más recientes sugieren que las ChAPs no sólo tendrían capacidad de reconocer los cargos, sino que son capaces de estabilizar el complejo en las membranas y de deformar las mismas haciendo que formen vesículas, mientras que Chs5 tendría la capacidad de unión a Arf1 (Paczkowski *et al.*, 2012; Richardson & Fromme 2013; Paczkowski & Fromme, 2014; Huranova *et al.*, 2016). Así pues según los estudios llevados a cabo en *S. cerevisiae* el exómero podría tener características de cubierta y de adaptador, como ocurre en el caso de COPII y del retrómero.

Los resultados obtenidos en *S. pombe* demuestran la presencia de un complejo con características de exómero en la levadura de fisión. Mientras que en el caso de la levadura de gemación el exómero tendría un papel mayoritario en el transporte de cargos específicos desde el TGN/EEs hacia la superficie celular, en el caso de la levadura de fisión su papel en este tráfico sería más general. En *S. pombe* la función del exómero en el transporte anterógrado sería minoritaria (como lo es la de AP-1 en *S. cerevisiae*) mientras que sería importante en ausencia de AP-1. Además hemos visto que el exómero de *S. pombe* puede ejercer una función en el tráfico a través del sistema endosomal tardío. Los resultados del análisis de la relación del exómero de *S. pombe* con adaptadores y cubiertas que actúan en distintos pasos del tráfico vesicular nos indicaron que la relación se ceñía a AP-1, AP-2 y los GGAs. Estos complejos tienen en común ser adaptadores de clatrina, pero además comparten su lugar de actuación, estando implicados en rutas del tráfico intracelular que implican el paso de las proteínas a través de los endosomas. Por lo tanto los datos obtenidos en este trabajo hacen pensar que el exómero de ambas levaduras comparte no solo una similitud estructural de sus componentes, sino también una función en el tráfico vesicular a través de los endosomas.

En el caso de la levadura de fisión en ausencia del exómero se altera la morfología del aparato de Golgi. En la levadura de gemación en ausencia del complejo hay ciertos cargos que quedan retenidos en el TGN/EEs. Este resultado, que se ha interpretado como una acumulación de dichos cargos en ese entorno celular como consecuencia de la ausencia de un adaptador específico, no es incompatible con otra interpretación: en ausencia del exómero hay un defecto en un proceso general que dificulta el tráfico a través del TGN/EEs, de manera que algunas proteínas con ciertas características estructurales no puedan salir de este entorno, mientras que la mayoría de las proteínas sí que pueden hacerlo. Como se ha mencionado antes, Fks1 es una proteína que *a priori* tiene las características ideales para ser cargo del exómero, y sin embargo llega a la superficie celular de manera polarizada en el mutante *chs5Δ*. Igualmente la proteína Skg6, que se aisló en un rastreo dirigido a buscar cargos del exómero, es capaz de llegar a la superficie celular en ausencia del complejo (Ritz *et al.*, 2014). De este modo sí que podría haber una función básica conservada del exómero que en *S. cerevisiae* habría quedado enmascarada por el efecto tan fuerte que tiene la falta de este complejo en el transporte de Chs3.

¿Cuál podría ser esa función general del exómero? En principio podría haber varias posibilidades no excluyentes:

- Modular la unión de los cargos a los adaptadores: El exómero y los complejos AP son solubles, comparten alguna similitud estructural, y se unen a los cargos en la cara citoplásmica de las membranas. Ambos complejos podrían competir por la unión a los cargos y desplazarse mutuamente. Por otro lado el exómero podía actuar como un andamio que estabiliza o da especificidad a la unión entre el cargo y el adaptador de clatrina.
- Actuar como una chaperona que en función del entorno (pH, lípidos...) oculta/deja expuestos ciertos dominios específicos en los cargos o promueva la adquisición de una conformación adecuada, contribuyendo al reconocimiento de los cargos por los adaptadores.

- Modular la unión de los adaptadores a las membranas del TGN/endosomas. Hemos detectado unión física entre el exómero y los adaptadores pero no entre el exómero y la clatrina. El exómero podría facilitar o impedir el reclutamiento de los adaptadores para que éstos actúen sólo en el momento y lugar adecuado.
- Presentar los cargos a los adaptadores, como se ha sugerido para la proteína de humanos PACS-1 (*Phosphofurin Acidic Cluster–Sorting protein 1*), que presenta al receptor de la manosa 6-fosfato (MPR) y la furina a AP-1 para su inclusión en vesículas cubiertas por clatrina en los endosomas (Wan *et al.*, 1998).
- Ayudar a formar los subdominios de la membrana que tengan una composición específica de fosfoinosítidos necesaria para que se unan los adaptadores de clatrina, facilitándose así que el cargo pueda incluirse en las vesículas adecuadas, o que el cargo se concentre en esos sitios. Esta sería una función similar a la descrita para los FAPPs (*Four-Phosphate-Adaptors*) (Shin & Nakayama, 2004).
- La zona de los adaptadores tipo AP y GGA cercana al apéndice/oreja es el sitio de unión de proteínas accesorias que participan en el proceso de formación/escisión de las vesículas. El exómero podría participar en el reclutamiento de alguna proteína accesoria a los lugares de formación de las vesículas.
- Facilitar la llegada de las primeras moléculas de Arf1 a las membranas/promover la activación de esta GTPasa para facilitar el reclutamiento de los adaptadores de clatrina a las membranas.

Relación evolutiva entre el exómero y otros adaptadores implicados en el tráfico vesicular

Aunque las secuencias similares a las de los componentes del exómero están más representadas en los hongos que poseen quitina en su pared celular, el descubrimiento de un exómero funcional en *S. pombe* pone de manifiesto que este complejo de proteínas se ha conservado en los hongos a lo largo de la evolución, incluso en ausencia de las enzimas quitín sintasa de la Familia 2. También se han identificado secuencias similares a *BCH1* en mycetozoos, algas rojas y ciliados

(Trautwein *et al.*, 2006; Roncero *et al.*, 2016), confirmando que el exómero no es un complejo de proteínas exclusivamente fúngico. Además es posible que en otros organismos haya otros complejos proteicos que, aunque no compartan similitud de secuencia primaria con los componentes del exómero, sí que compartan las características de su arquitectura general, y que dichos complejos tengan una función similar a la del exómero en el tráfico a través del TGN y/o de los endosomas. De acuerdo con esta idea, se ha descubierto un complejo ancestral de proteínas que está lejanamente relacionado con COPI y con los adaptadores tipo AP (el complejo TSET); miembros de TSET se han identificado en muchos organismos usando una herramienta bioinformática basada en hacer búsquedas de arquitectura de las proteínas. Al igual que ocurre en el caso del exómero, la gravedad de los defectos asociados a la eliminación de los componentes de TSET es distinta en distintos organismos (Hirst *et al.*, 2014). Otro ejemplo en este sentido es el del complejo adaptador AP-5 cuyas subunidades solo presentan un 10% de identidad con las de los otros complejos AP, mientras la arquitectura general del complejo completo sí que es similar a la de los otros adaptadores de la familia AP (Hirst *et al.*, 2013). Se ha propuesto que ha habido una co-evolución de los adaptadores tipo AP con el sistema de endomembranas celulares, de modo que los complejos AP-4 y AP-5 habrían surgido a partir de un ancestro común después de la aparición del aparato de Golgi (Hirst *et al.*, 2011). Los complejos AP-4 y AP-5 no se unen a clatrina, participan en el tráfico entre el TGN y la membrana plasmática, y son necesarios para la integridad del sistema endosomal (Hirst *et al.*, 2011; Hirst *et al.*, 2013). Todas estas características son similares a las que hemos encontrado para el exómero de *S. pombe* y algunas de ellas también se habían descrito en *S. cerevisiae* ((Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein *et al.*, 2006) y este trabajo). Curiosamente ni AP-4 ni AP-5 están presentes en hongos por lo que es tentador especular que, en algún momento de la evolución entre la aparición del Golgi y su especialización en el TGN, en estos organismos un complejo de proteínas diferente (el exómero) se habría hecho cargo de las mismas funciones que adquirieron AP-4 y AP-5 en metazoos.

Visión general y perspectivas de futuro

Con este trabajo hemos demostrado que el exómero es un complejo conservado en las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*. El exómero de la levadura de fisión sería más simple y menos específico en cuanto a la regulación de los distintos cargos que el de *S. cerevisiae*. El complejo de la levadura de fisión tendría un papel en el tráfico intracelular a nivel de la ruta endosomal que sería minoritario por sí mismo pero importante en colaboración con otros adaptadores. Entre las proteínas cuyo transporte está afectado en ausencia del exómero en ambas levaduras destacarían las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular.

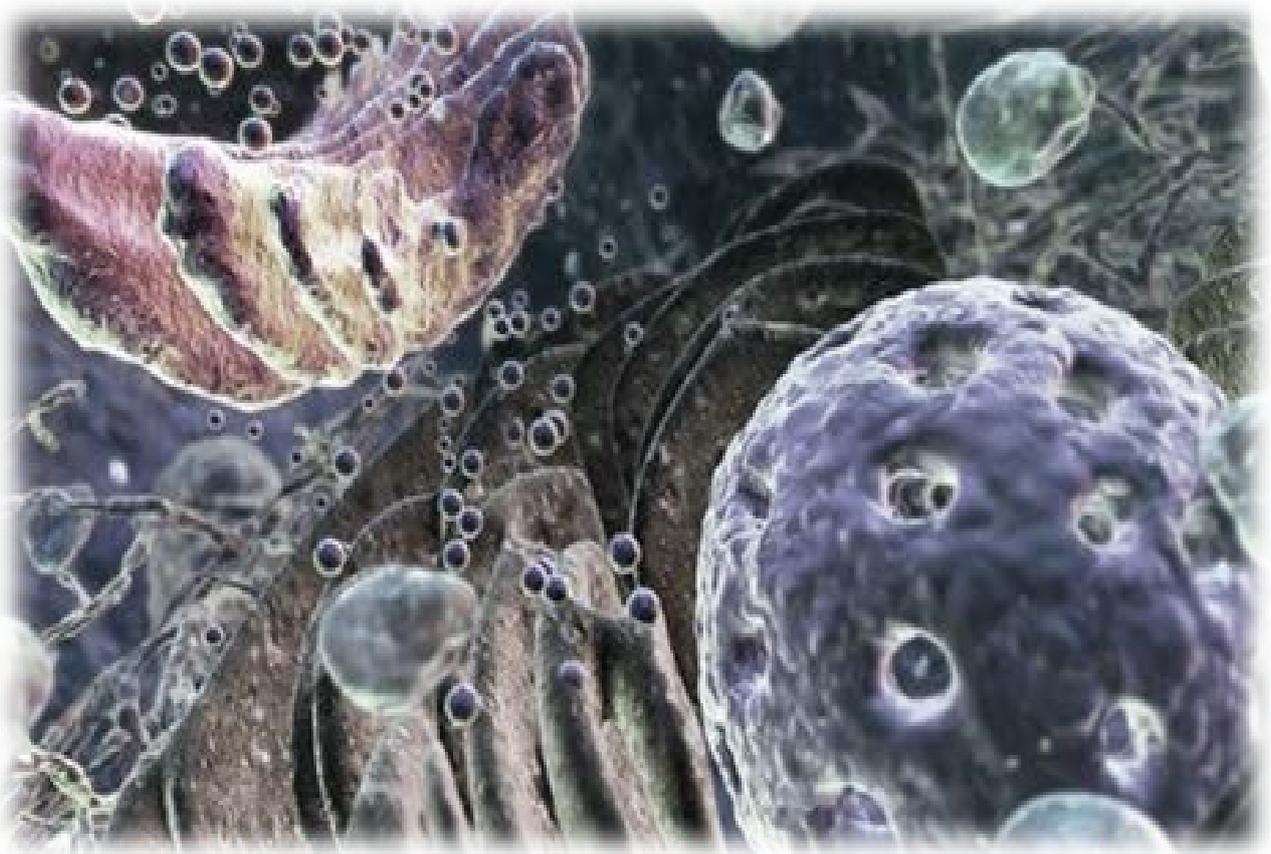
Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información acerca de uno de los pasos menos conocidos del tráfico intracelular (el que ocurre entre el Golgi y la membrana plasmática), al confirmar la relación funcional entre el exómero y el adaptador AP-1 y desvelar nuevos aspectos de la misma. Además este trabajo supone un pequeño paso hacia el mejor entendimiento del funcionamiento de la ruta endosomal y de la relación existente entre los distintos compartimentos que la componen, ya que ha puesto de manifiesto la existencia de una relación funcional entre el exómero y los adaptadores GGA a nivel del compartimento pre-vacuolar. Además nuestros resultados han demostrado que algunos de los adaptadores conocidos pueden colaborar en rutas de transporte y ejercer su función en entornos distintos a los descritos hasta la fecha.

En cuanto a las perspectivas de futuro, en el laboratorio se está caracterizando la respuesta a estrés de los mutantes del exómero. También se está procediendo a analizar la dinámica de entrada y salida de las membranas del aparato de Golgi de proteínas implicadas en el transporte a nivel del TGN/EEs (Apm1, Ggas, Sec72, Pik1) en una cepa control y en un mutante carente del exómero con el fin obtener información acerca de la posible función general del exómero. En este sentido también se intentará averiguar si la interacción física entre Cfr1 y los complejos AP ocurre en ausencia de *bch1⁺* o es necesario que el complejo esté ensamblado para que ocurra esta interacción, y si la interacción entre AP-1 y la clatrina se afecta cuando las células carecen del exómero. También se analizará si existe relación entre el exómero y las

epsinas. Las epsinas son adaptadores monoméricos de clatrina que tienen la capacidad de unirse a dominios específicos de las membranas enriquecidos en ciertos fosfolipídicos, de unirse a algunos cargos destinados a la membrana plasmática (como a la QS Chs3), de unirse a la v-SNARE Pep12 destinada al PVC, y de unirse a otros adaptadores (AP-1 y GGAs (Copic *et al.*, 2007)). Es decir, participan en los mismos pasos del tráfico vesicular que el exómero de *S. pombe*. En *S. pombe* hay dos epsinas: *ent1⁺* implicada en endocitosis y *ent3⁺*, que se localiza en el aparato de Golgi y cuya función está sin caracterizar. Si en la levadura de fisión esta epsina tuviera las funciones de *ENT3* y *ENT5* de *S. cerevisiae* su regulación por el exómero explicaría muchas de las funciones adscritas al exómero.

Además será de gran interés analizar si algunos de los nuevos aspectos de la función del exómero desvelados en *S. pombe* se dan también en *S. cerevisiae* y en otros hongos y levaduras.

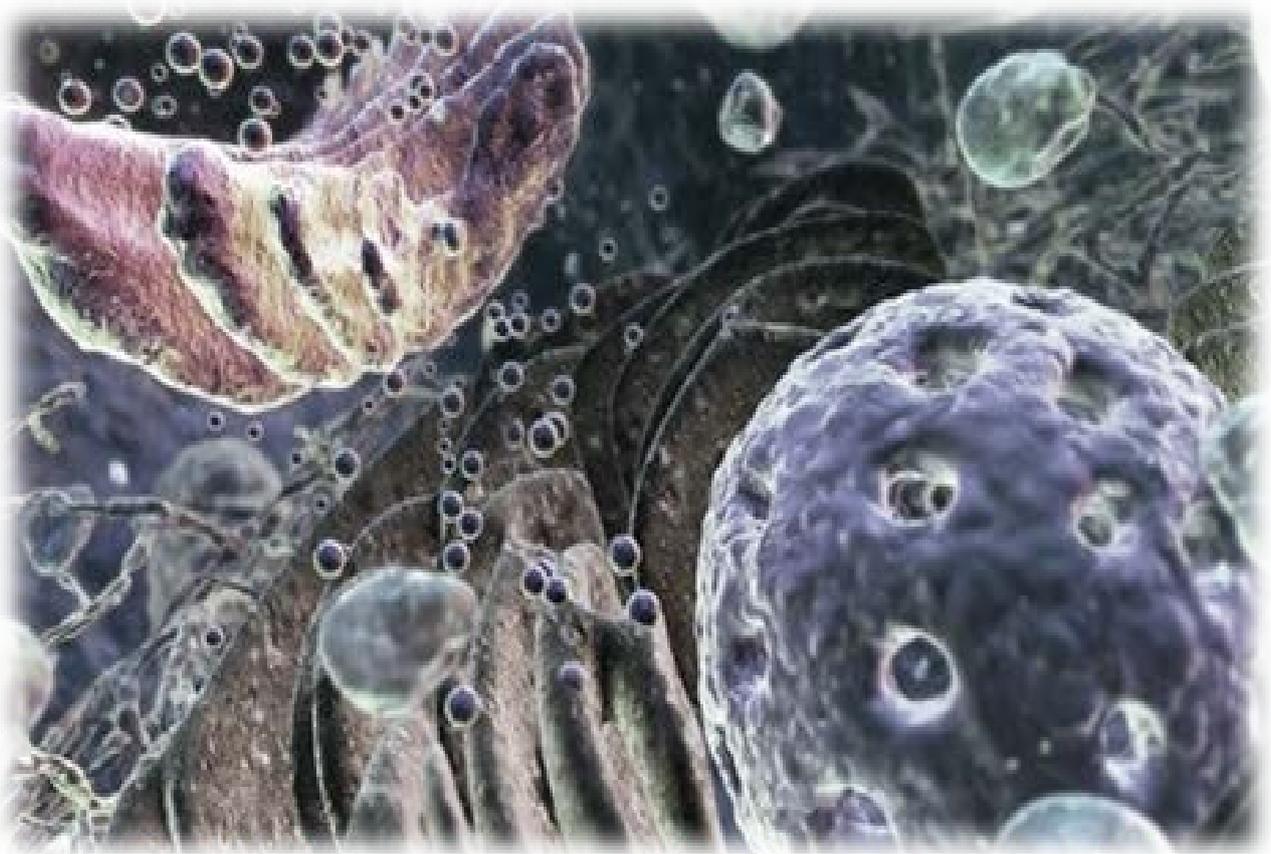
Conclusiones



Las conclusiones obtenidas en este trabajo han sido las siguientes:

1. La levadura de fisión *S. pombe* posee la forma más sencilla posible de un exómero, estando este complejo formado por dos proteínas: Cfr1 y Bch1.
2. En ausencia del exómero de *S. pombe* el aparato de Golgi presenta daños morfológicos, lo que indica que puede existir una alteración en el tráfico vesicular a través/desde el Golgi. A su vez este defecto en la organización del aparato de Golgi produciría una alteración en el tráfico a nivel de este orgánulo.
3. En ausencia del exómero existe defecto en la síntesis de glucano de la pared celular en la levadura de fisión.
4. El exómero de *S. pombe*, al igual que el exómero de *S. cerevisiae*, se encarga del transporte de proteínas entre el TGN y la membrana plasmática. Este transporte se produce a través de los endosomas tempranos.
5. Cfr1 presenta distintos tipos de interacción con componentes de los complejos adaptadores de clatrina AP-1, AP-2, y GGAs cuya función está relacionada con los endosomas.
6. El exómero de *S. pombe* y el complejo AP-1 colaboran en el transporte vesicular entre el TGN y los endosomas tempranos. En ausencia de ambos complejos se produce un defecto drástico en la organización de dichos endosomas, de modo que las distintas proteínas no pueden ser transportadas eficientemente.
7. El exómero de *S. pombe* y los adaptadores GGA colaboran en el tráfico vesicular a nivel del compartimento pre-vacuolar, lo que demuestra que el exómero está implicado en el transporte de proteínas en la ruta endosomal tardía.

Materiales y Métodos



1. Microorganismos utilizados

El presente trabajo se ha realizado utilizando distintas cepas de *Escherichia coli* y de *Schizosaccharomyces pombe*.

La mayor parte de este trabajo se ha llevado a cabo empleando la levadura de fisión *S. pombe* como modelo de estudio. Las características genéticas de las cepas empleadas, así como su procedencia se presentan en la **tabla II**.

La bacteria *E. coli* se ha empleado en los trabajos rutinarios de clonación molecular. La estirpe DH5 α sirvió como hospedador habitual de los plásmidos utilizados y la cepa CJ236 se utilizó en los experimentos de mutagénesis dirigida *in vitro*. En la **tabla II** se recoge el genotipo de las estirpes utilizadas.

La conservación de estas cepas se realizó en viales con glicerol al 30% en el caso de las levaduras y al 50% cuando se trataba de bacterias, que se guardaron a una temperatura de -80°C.

Tabla II. Cepas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Procedencia
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
HVP30	<i>leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP117	<i>leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	Colección HVM
HVP124	<i>leu1-32/leu1-32 ura4-Δ18/ura-Δ18 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP241	<i>cfr1::his3⁺ ade6 h⁺</i>	Colección HVM
HVP264	<i>cfr1::his3⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP281	<i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP336	<i>cfr1-GFP:leu1⁺ ura4-Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP442	<i>cfr1::his3⁺ cfr1[*]:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP542	<i>chs2-GFP:leu1⁺ leu1-32 h⁻</i>	Colección HVM
HVP630	<i>cfh3::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP641	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP644	<i>cfr1-GFP:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP1044	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-RFP:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP1153	<i>cps1-191 leu1-32 ura4-Δ18 h⁻</i>	P. Pérez
HVP1202	<i>clc1-232 leu1-32 his3-Δ1 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP1251	<i>GFP-cfh3:leu1⁺ his3-Δ1 ade6 h[?]</i>	Colección HVM
HVP1259	<i>cfr1::his3⁺ cfr1ΔCT:ura4⁺ leu1-32 ade h⁻</i>	Colección HVM
HVP1278	<i>cfr1::his3⁺ cfr1[*]:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP1776	<i>HA-rho1 leu1-32 ade6 h[?]</i>	P. Pérez
HVP1798	<i>cwg1-1 leu1-32 his3-Δ1 ura-Δ18 ade6 h⁻</i>	J. C. Ribas
HVP2286	<i>apl3-GFP:leu1⁺ ura4-Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP2328	<i>cfr1::his3⁺ cwg1-1 h[?]</i>	Este trabajo
HVP2340	<i>bch1::KAN cfr1-GFP:leu1⁺ ura4-Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2352	<i>cfr1::his3⁺ cps1-191 h[?]</i>	Este trabajo

HVP2356	<i>bch1::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2357	<i>bch1::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2370	<i>cfr1::his3⁺ clc1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2371	<i>cfr1::his3⁺ apl3-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2407	<i>cfr1::his3⁺ GFP-cfh3:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2476	<i>bch1-GFP:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2477	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ bch1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2543	<i>cfr1::his3⁺ chs2-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP2570	<i>sec24-GFP:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁺</i>	S. Oliferenko
HVP2571	<i>sec72-GFP:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁺</i>	S. Oliferenko
HVP2614	<i>clc1-GFP:ura4⁺ h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP2635	<i>cfr1-HA:leu1⁺ sec72-GFP:ura4⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP2668	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ clc1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP2675	<i>pma1-GFP:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2676	<i>cfr1::his3⁺ pma1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2687	<i>cfr1::his3⁺ sar1-GFP:leu1⁺ sur4-mCherry:NAT leu1-32 ura4-Δ18 h?</i>	Este trabajo
HVP2688	<i>sar1-GFP:leu1⁺ sur4-mCherry:NAT h?</i>	Este trabajo
HVP2690	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ apm1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2748	<i>/pAL+gma12-GFP/ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2749	<i>cfr1::his3⁺/pAL+gma12-GFP/ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2754	<i>sec72-GFP:leu1⁺ sur4-mCherry:NAT h?</i>	Este trabajo
HVP2757	<i>cfr1::his3⁺ sec72-GFP:leu1⁺ sur4-mCherry:NAT h?</i>	Este trabajo
HVP2759	<i>sec24-GFP:leu1⁺ sur4-mCherry:NAT h?</i>	Este trabajo
HVP2761	<i>cfr1::his3⁺ sec24-GFP:leu1⁺ sur4-mCherry:NAT h?</i>	Este trabajo
HVP2835	<i>rho3::ura4⁺ leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	M.Balasubramanian
HVP2938	<i>psy1-GFP:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP2939	<i>cfr1::his3⁺ psy1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2968	<i>rho1-GFP:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	P. Pérez
HVP2969	<i>cfr1::his3⁺ rho1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2970	<i>bch1::KAN rho1-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP2971	<i>bch1::NAT syb1-GFP:KAN h⁻</i>	Este trabajo
HVP2980	<i>cfr1::his3⁺ apm1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP2995	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN rho1-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3013	<i>ags1-GFP:leu1⁺ his3-Δ1 ura4-Δ18 h⁺</i>	J.C. Ribas
HVP3034	<i>cfr1::his3⁺ ags1-GFP:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3055	<i>bgs1::ura4⁺ Pbgs1:GFP12A-bgs1:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3056	<i>bgs4::ura4⁺ Pbgs4:GFP12A-bgs4:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3058	<i>cfr1::his3⁺ bgs4::ura4⁺ Pbgs4:GFP12A-bgs4:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3057	<i>cfr1::his3⁺ bgs1::ura4⁺ Pbgs1:GFP12A-bgs1:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3066	<i>bch1::KAN bgs1::ura4⁺ Pbgs1:GFP12A-bgs1:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3067	<i>bch1::KAN bgs4::ura4⁺ Pbgs4:GFP12A-bgs4:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3068	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN bgs1::ura4⁺ Pbgs1:GFP12A-bgs1:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3069	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN bgs4::ura4⁺ Pbgs4:GFP12A-bgs4:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3081	<i>bch1::KAN rho1-HA h?</i>	Este trabajo
HVP3082	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN rho1-HA h?</i>	Este trabajo
HVP3090	<i>bgs3::ura4⁺ Pbgs3:GFP12A-bgs3:leu1⁺ his3-Δ1 h⁻</i>	J.C. Ribas
HVP3108	<i>cfr1::his3⁺ bgs3::ura4⁺ Pbgs3:GFP12A-bgs3:leu1⁺ h⁺</i>	Este trabajo
HVP3110	<i>bch1::KAN bgs3::ura4⁺ Pbgs3:GFP12A-bgs3:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3112	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN bgs3::ura4⁺ Pbgs3:GFP12A-bgs3:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3132	<i>cfr1::his3⁺ HA-rho1 h?</i>	Este trabajo
HVP3229	<i>gas2-GFP:KAN leu1-32 h⁻</i>	C.R. Vázquez
HVP3237	<i>cfr1::his3⁺ gas2-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP3251	<i>rer1-GFP:ura4⁺ his3Δ1 h?</i>	Este trabajo

HVP3252	<i>cfr1::his3⁺ rer1-GFP:ura4⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3270	<i>bch1::KAN gas2-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP3271	<i>bch1::KAN ags1-GFP:leu1⁺ h⁺</i>	Este trabajo
HVP3272	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN ags1-GFP:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3306	<i>GFP-bch1:leu1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3307	<i>cfr1::his3⁺ GFP-bch1:leu1⁺ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3309	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN h⁺</i>	Este trabajo
HVP3316	<i>/pAL+gas1-YFP/leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3317	<i>cfr1::his3⁺/pAL+gas1-YFP/ leu1-32 ura3-52 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3318	<i>bch1::KAN /pAL+gas1-YFP/ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3319	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN /pAL+gas1-YFP/ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3325	<i>cfr1::his3⁺ bch1::KAN GFP-bch1:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3352	<i>cfr1::his3⁺ bch1::NAT gas2-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP3362	<i>exg3-GFP:KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	C.R. Vázquez
HVP3388	<i>apm1::ura4⁺ cfr1-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3426	<i>bch1::NAT exg3-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP3428	<i>cfr1::his3⁺ exg3-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP3429	<i>cfr1::his3⁺ bch1::NAT exg3-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP3490	<i>apm1::ura4⁺ his3-Δ1 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3507	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ sec24-GFP:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3514	<i>spm1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
HVP3614	<i>cfr1::his3⁺ apm1::ura4⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3664	<i>vps27::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
HVP3673	<i>cfr1-HA:leu1⁺ rer1-GFP h?</i>	Este trabajo
HVP3701	<i>apm3::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
HVP3702	<i>sec28-HA:KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3715	<i>sec28-HA:KAN cfr1-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3727	<i>apm1::ura4⁺ apm1-GFP:leu1⁺ his3-Δ1 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3728	<i>apm1::ura4⁺ bgs3::ura4⁺ Pbg3::GFP12Abgs3:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3732	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-GFP:leu1⁺ bgs4::ura4⁺ Pbg4::RFP12A-bgs4:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3739	<i>anp1-mCherry:ura4⁺ leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	S. Oliferenko
HVP3755	<i>cfr1::his3⁺ cfr1_{ΔCT}:ura4⁺ bch1::KAN GFP-bch1:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3765	<i>bgs1::ura4⁺ Pbg1::GFP12A-bgs1:leu1⁺ his3-Δ1 h⁻</i>	J.C. Ribas
HVP3767	<i>bgs4::ura4⁺ Pbg4::GFP12A-bgs4:leu1⁺ his3-Δ1 h⁻</i>	J.C. Ribas
HVP3771	<i>cfr1::his3⁺ apm1::ura4⁺ bgs3::ura4⁺ Pbg3::GFP12A-bgs3:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3773	<i>apm1::ura4⁺ apm1-GFP:leu1⁺ bgs4::ura4⁺ Pbg4::RFP-bgs4:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3781	<i>cfr1::his3⁺ bgs1::ura4⁺ Pbg1::GFP12A-bgs1:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3783	<i>cfr1::his3⁺ bgs4::ura4⁺ Pbg4::GFP12A-bgs4:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3804	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:leu1⁺ bgs3::ura4⁺ Pbg3::GFP12A-bgs3:leu1⁺ h⁹⁰</i>	J.C. Ribas
HVP3806	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:leu1⁺ Pbg4::GFP12A-bgs4:leu1⁺ h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3824	<i>cfr1::his3⁺ apm1::ura4⁺ bgs1::ura4⁺ Pbg1::GFP12A-bgs1:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3826	<i>cfr1::his3⁺ apm1::ura4⁺ bgs4::ura4⁺ Pbg4::GFP12A-bgs4:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3830	<i>apm1::ura4⁺ bgs1::ura4⁺ Pbg1::GFP12A-bgs1:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3832	<i>apm1::ura4⁺ bgs4::ura4⁺ Pbg4::GFP12A-bgs4:leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3858	<i>apm3-GFP:KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP3859	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ apm3-GFP:KAN leu1-32 ura3-52 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3860	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ apm4-GFP:KAN leu1-32 ura3-52 ade6 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP3876	<i>apl3::HPH h⁺</i>	Colección HVM
HVP3878	<i>apm4-GFP:KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección HVM
HVP3879	<i>sec72-GFP:ura4⁺ bgs4::ura4⁺ RFP-bgs4:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3920	<i>apm1::ura4⁺ cfr1::his3⁺ sec72-GFP:ura4⁺ bgs4::ura4⁺ Pbg4::RFP12A-bgs4:leu1⁺ h⁺</i>	Este trabajo
HVP3925	<i>cfr1::his3⁺ sec72-GFP:ura4⁺ cfr1-RFP:ura4⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3934	<i>anp1-GFP cfr1-RFP h⁹⁰</i>	Este trabajo

HVP3937	<i>cfr1::his3⁺ apl3::HPH h?</i>	Este trabajo
HVP3954	<i>gga21::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3956	<i>gga22::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3980	<i>apm1::ura4⁺ vps27::KAN bgs4::ura4⁺ Pbgs4::GFP12A-bgs4::leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3986	<i>apm1::ura4⁺ sec72-GFP:ura4⁺ bgs4::ura4⁺Pbgs4::RFP-bgs4::leu1⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP3994	<i>gga21::KAN gga22::KAN his3-Δ1 h⁻</i>	Este trabajo
HVP4074	<i>cfr1::his3⁺ gga21::KAN h⁻</i>	Este trabajo
HVP4076	<i>cfr1::his3⁺ gga22::KAN h⁻</i>	Este trabajo
HVP4080	<i>cfr1::his3⁺ gga21::KAN gga22::KAN h⁻</i>	Este trabajo
HVP4167	<i>cfr1::his3⁺ apm3::KAN h?</i>	Este trabajo
HVP4191	<i>cfr1::his3⁺ clc1-232 leu1-32 ura4-Δ18 h⁺</i>	Este trabajo
HVP4292	<i>apm1::ura4⁺ syb1-GFP:KAN h⁻</i>	Este trabajo
HVP4317	<i>gga22::KAN gga22-GFP:ura4⁺ his3-Δ1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP4327	<i>bch1::NAT apm1::ura4⁺ syb1-GFP:KAN h⁻</i>	Este trabajo
HVP4352	<i>cfr1::his3⁺ cfr1-HA:ura4⁺ gga22::KAN gga22-GFP:ura4⁺ h?</i>	Este trabajo
HVP4373	<i>gga22::KAN syb1-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP4374	<i>gga21::KAN gga22::KAN syb1-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP4376	<i>bch1::NAT gga22::KAN syb1-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP4377	<i>bch1::NAT gga21::KAN gga22::KAN syb1-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP4387	<i>apm1::ura4⁺ syb1-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FYVE(EEA1):NAT h?</i>	Colección HVM
HVP4389	<i>bch1::NAT apm1::ura4⁺ syb1-GFP:KAN mCherry-FYVE(EEA1):NAT h⁻</i>	Este trabajo
HVP4391	<i>syb1-GFP:KAN h?</i>	Este trabajo
HVP4243	<i>Pnda2:mCherry-FYVE(EEA1):NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 h⁺</i>	Colección HVM
HVP4486	<i>syb1-GFP:KAN gga22::KAN gga2-RFP:ura4⁺ h⁻</i>	Este trabajo
HVP0001	<i>gga22::KAN Pnda2:mCherry-FYVE(EEA1):NAT h⁺</i>	Este trabajo
HVP0002	<i>cfr1::his3⁺ gga22::KAN Pnda2:mCherry-FYVE(EEA1):NAT h⁺</i>	Este trabajo
HVP0003	<i>gga21::KAN gga22::KAN Pnda2:mCherry-FYVE(EEA1):NAT h⁺</i>	Este trabajo
HVP0004	<i>cfr1::his3⁺ gga21::KAN gga22::KAN Pnda2:mCherry-FYVE(EEA1):NAT h⁺</i>	Este trabajo
	<i>cdc42-L160S</i>	P. Pérez
Escherichia coli		
DH5α	<i>supE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Stratagene
CJ236	<i>dut-1, ung-1, thi-1, relA-1; pCJ104 (Cmr)</i>	BioRad

2. Medios de cultivo

2.1 Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y el mantenimiento de *S. pombe* han sido descritos por Moreno y colaboradores (Moreno *et al.*, 1991). Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2%. Todos los medios se prepararon con agua destilada (Milli-Rho) y se esterilizaron en el autoclave.

El medio **YES (Yeast Extract Supplemented)** se utilizó habitualmente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Su composición es: glucosa al 3% y extracto de

levadura al 0,5%. El medio se suplementa con adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo (225 mg/l) y se ajusta a un pH de 5,6. En los casos en que era necesario un estabilizador osmótico, se añadió sorbitol a una concentración de 1,2 M, después de la esterilización del medio.

La selección de cepas resistentes a antibióticos se realizó añadiendo al medio de cultivo sulfato de geneticina (G-418, FORDEMIUM™) a una concentración final de 120 µg/ml o nourseotricina/cloNat (WERNER BioAgents) a una concentración de 50 µg/ml, a partir de soluciones stock esterilizadas por filtración (**Tabla III**).

Cuando fue necesario, el medio se suplementó con diversos compuestos como caspofungina, micafungina y papulacandina B disueltos en agua o DMSO. Todos ellos se añadieron al medio una vez esterilizado, a la concentración final indicada en cada experimento, partiendo de soluciones stock más concentradas y esterilizadas por filtración. Estas soluciones se describen en la **tabla III**.

El **medio mínimo (EMM, *Edinburgh Minimal Media*)** se utilizó para el cultivo y/o selección de cepas de *S. pombe* auxótrofas. La composición de este medio es: glucosa al 2%, ftalato monopotásico al 0,3%, Na₂HPO₄ al 0,22% y NH₄Cl al 0,5%. Este medio se esterilizó en el autoclave y posteriormente se le añadieron diferentes cantidades de las soluciones concentradas de sales, minerales y vitaminas, esterilizadas previamente por filtración:

- Solución concentrada de sales (50x): MgCl₂·6H₂O 0,26 M; Cl₂Ca·2H₂O 5 mM; KCl 0,67 M y Na₂SO₄ 14 mM.
- Solución concentrada de minerales (10.000x): H₃BO₃ 81 mM; MnSO₄ 23,7 mM; ZnSO₄·7H₂O 14 mM; FeCl₃·6H₂O 7,4 mM; MoO₄·2H₂O 2,5 mM; KI 6 mM; CuSO₄·5H₂O 1,6 mM y ácido cítrico 47,6 mM.
- Solución concentrada de vitaminas (1.000x): ácido nicotínico 81,2 mM; inositol 55,5 mM; biotina 49,8 mM y ácido pantoténico 4,2 mM.

El medio se suplementó con adenina, histidina, leucina, lisina y/o uracilo (225 mg/ml) en aquellos casos en los que la cepa así lo necesitaba. El medio mínimo con los cinco suplementos se denominó MM completo.

2.2 Medios de cultivo para *E. coli*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *E. coli* son:

- **Medio LB (*Luria-Bertani*)** se utilizó para el crecimiento rutinario de esta bacteria. Su composición es: bacto triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 1%. Antes de esterilizarlo en el autoclave, se ajusta el pH a 7,2 - 7,4.
- **Medio 2xYT (*2x Yeast Extract Tryptone*)**, cuya composición es: bacto triptona al 1,6%, extracto de levadura al 1% y NaCl al 1%.

Los medios sólidos se prepararon con agar al 2%.

La selección de clones bacterianos resistentes a antibióticos se realizó suplementando los medios con ampicilina (Roche) a una concentración final de 100 µg/ml (**Tabla III**).

3. Condiciones y estimación del crecimiento

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

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de cepas de *S. pombe* cuyas características genéticas se habían comprobado previamente.

Para conseguir un cultivo de la cepa deseada en fase exponencial normalmente se usaba un preinóculo en medio líquido que se incubaba a la temperatura adecuada. Posteriormente, se preparaba el cultivo a analizar a partir del preinóculo teniendo en cuenta el tiempo de generación de la levadura, el medio de cultivo y la temperatura de incubación adecuada, hasta alcanzar dicha fase.

Los cultivos se incubaron en placas Petri (cultivos sólidos) o en matraces y tubos de ensayo (cultivos líquidos) a la temperatura adecuada para la realización del experimento, normalmente 25°C, 28°C ó 32°C. La temperatura óptima de crecimiento de la cepa silvestre de *S. pombe* es de 32°C. Para algunos experimentos puntuales se utilizaron otras temperaturas como 34°C, 35°C, 36°C y 37°C. En el caso de los cultivos

líquidos, los matraces se mantuvieron con una agitación de entre 200 y 250 rpm y el volumen del cultivo no superó $\frac{1}{4}$ del volumen del matraz para su correcta aireación.

El crecimiento de la levadura en medio líquido se determinó mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro (SmartSpec™Plus, BioRad). Empleando curvas de calibración obtenidas previamente en el laboratorio se sabe que una densidad óptica de 1,0 equivale aproximadamente a 10^7 células/ml de *S. pombe*.

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

Las células de *E. coli* se incubaron en medio líquido con agitación orbital de 200-250 rpm a una temperatura de 28°C y/o 37°C. Para el crecimiento en medio sólido las células se incubaron en estufas a las mismas temperaturas que en el caso anterior.

3.3 Ensayos de crecimiento en gota

Los estudios de crecimiento a diferentes temperaturas o en presencia de distintos compuestos se realizaron en medios sólidos YES y YES con sorbitol 1,2 M. Partiendo de cultivos líquidos, las células se concentraron hasta una D.O.₆₀₀ de 1,0. A continuación, se realizaron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ hasta un total de 6 concentraciones decrecientes de células y con un replicador se colocó una gota de cada concentración sobre las placas del medio de cultivo. Las placas se incubaron a las distintas temperaturas de 2 a 5 días dependiendo del medio y de la temperatura.

3.4 Crecimiento de *S. pombe* en condiciones de cultivo especiales

- **Medios suplementados con Brefeldina A (SIGMA)**. Éste es un compuesto que inhibe el transporte de proteínas en el aparato de Golgi, debido a que inhibe la actividad de la GTPasa Arf1 de varias cubiertas vesiculares como COPI y CCVs (Turi *et al.*, 1994). La droga se añadió a una concentración final de 100 μ M a partir de una solución stock a 5 mg/ml en etanol al 70% (Tabla III) a cultivos líquidos de células creciendo

exponencialmente. Se utilizaron cultivos tratados con etanol al 70% como control del experimento. Los tratamientos con este compuesto se realizaron durante 10 minutos a 30°C.

- **Medios suplementados con Latrunculina A (SIGMA).** La Latrunculina A se empleó con el fin de bloquear el proceso de endocitosis de la célula y así poder observar la localización de la proteína Bgs4 en algunos mutantes de interés. Ésta es una toxina derivada de la esponja *Latrunculina magnifica*, que secuestra monómeros de actina; cuando se realizan tratamientos cortos (15 minutos) se bloquea principalmente el proceso de endocitosis, mientras que con tratamientos más largos pueden afectarse otros procesos biológicos. Esta droga se utilizó a una concentración de 100 µM a partir de una solución stock a 5 mM en DMSO (**Tabla III**) en cultivos creciendo exponencialmente. Dichos ensayos se realizaron por duplicado, poniendo como control un cultivo tratado con DMSO al 0,5%.

Tabla III. Soluciones stock utilizadas en este trabajo.

Producto	Solución stock	Casa comercial
Ampicilina	100 µg/ml en agua estéril	Roche
Brefeldina A	5 mg/ml en etanol al 70%	SIGMA
Caspofungina	10 mg/ml en DMSO	MSD*
CloNat	50 µg/ml en agua estéril	WERNER BioAgents
DTT	1 M en AcNa 10 mM	FORDERMIUM™
Geneticina G-418	120 µg/ml en agua estéril	FORDERMIUM™
Latrunculina A	5 mM en DMSO	SIGMA
Micafungina	10 mg/ml en DMSO	Astella Pharma
Papulacandina B	10 mg/ml en etanol	MSD*

MSD* (Merck Sharp & Dohme)

4. Métodos genéticos

Para la construcción de mutantes dobles, o la introducción en determinadas cepas de proteínas integradas en el genoma y marcadas con algún epítipo o proteína fluorescente, se realizaron cruces genéticos entre las cepas parentales correspondientes. Posteriormente, se analizaron las colonias obtenidas y se seleccionaron los clones que portaban los caracteres de interés.

4.1 Conjugación

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe* se usaron estirpes heterotálicas de tipo sexual opuesto (h^+ o h^-) incubadas durante 24 horas en placas de medio YES. Se tomó aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa y se mezclaron en una placa de MM completo. Los cigotos se originan después de 12-20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 1-2 días de incubación a 28°C ó 3-4 días de incubación a 25°C (en el caso de cepas termosensibles). Este mismo procedimiento se llevó a cabo cuando los cruces genéticos se realizaron entre una cepa homotálica h^{90} y una cepa heterotálica h^+ o h^- , con la excepción de que la cantidad de la cepa homotálica utilizada debe ser menor que la cantidad de la cepa heterotálica para disminuir así la probabilidad de conjugación entre las células procedentes de la misma cepa.

4.2 Aislamiento de ascosporas al azar

Para la selección de esporas al azar se tomó una pequeña muestra del cruce cuando las ascas estaban suficientemente maduras y se resuspendió en 1 ml de agua estéril al que se añadieron 5 μ l de extracto enzimático β -glucuronida (Roche). La mezcla se incubó durante aproximadamente 16 horas en agitación a temperatura ambiente. Este tratamiento destruye las paredes celulares de las células vegetativas, favoreciendo la liberación de las esporas. Después, se llevó a cabo la cuantificación del número de esporas presentes por ml de muestra, y a partir de la misma se hicieron las diluciones adecuadas para sembrar entre 300 y 500 esporas en cada una de las placas de medio sólido empleadas, las cuales se incubaron a la temperatura adecuada. Las colonias obtenidas se analizaron seleccionando aquellas que poseían el genotipo de interés mediante la utilización de medios selectivos, PCR u observación al microscopio.

4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: análisis de tétradas

Con el fin de determinar los productos de la segregación meiótica se realizó el análisis de tétradas. El proceso se llevó a cabo con un micromanipulador automático (Singer MSM System Series 200). Para ello, se resuspendió una pequeña cantidad de cultivo esporulado en 200 μ l de agua estéril y se extendieron 5 μ l en un extremo de una placa de YES. Se recogieron ascas con el micromanipulador y se depositaron en una zona de la placa libre de células. Esta placa se incubó durante 4-6 horas a 32°C. Posteriormente se separaron las cuatro esporas de cada asca a posiciones libres de células de la misma placa. Las placas se incubaron durante 4-5 días a 25°C. Finalmente, para la realización del estudio genotípico de cada espora, se realizaron réplicas en medios selectivos y se incubaron a la temperatura adecuada.

5. Técnicas generales de biología molecular

5.1 Vectores utilizados

5.1.1 Vectores de *E. coli*

- **pBluescript KS⁺ y SK⁺ (Stratagene).** Son plásmidos autorreplicativos de 2,9 kb que llevan el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación *colE1* y un fragmento del operón de lactosa de *E. coli* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa (LacZ'). Los dos vectores se diferencian por la orientación del sitio de clonación múltiple y los promotores de las ARN-polimerasas T3 y T7 que los flanquean y que sirven para la síntesis *in vitro* del ARN. También poseen el origen de replicación del fago 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).** Es un vector de 3 kb que contiene 13 sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción y se comercializa en forma lineal con una timidina adicional en sus extremos, lo que facilita la inserción de fragmentos generados por PCR. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7. Al igual que el vector pBluescript SK⁺ permite la selección de clones recombinantes por α -complementación (azul-blanco).

5.1.2 Vectores de *S. pombe*

- **pAL-KS⁺**. Este vector tiene 6,3 kb y fue obtenido por el Dr. Ishiguro (Konan University, Japón) a partir del plásmido pBluescript II KS⁺ al que se le ha añadido un fragmento de ADN que incluye sitios de reconocimiento para 11 endonucleasas de restricción en la región estructural del gen que codifica el péptido α de la β -galactosidasa, el origen de replicación de *S. pombe*, *ars1⁺* y el gen *LEU2* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *leu1-32* de *S. pombe*.
- **pAU-KS⁺**. Este vector tiene un tamaño de 5,6 kb y las mismas características que el vector anterior pAL-KS⁺. En este caso el marcador de selección es el gen *URA3* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *ura4- Δ 18* de *S. pombe*.
- **pJK148** (McLeod *et al.*, 1987). Es un vector de 5,3 kb que lleva el gen *leu1⁺* de *S. pombe* como marcador de selección y carece de secuencias *ars1*, por lo que no se replica de manera autónoma. Se utiliza para la integración de secuencias de ADN en el genoma de *S. pombe*. Para que la integración tenga lugar es necesario digerir el plásmido con una enzima de restricción que corta dentro del gen *leu1⁺*, así el plásmido pasa a forma lineal. Esta nueva forma del plásmido se introduce en una cepa *leu1-32*, de modo que tras la recombinación, en el genoma de *S. pombe*, se reconstituyen 2 copias del gen *leu1⁺*, una mutada y otra silvestre, recuperándose así la capacidad de crecimiento en un medio sin leucina (Keeney & Boeke, 1994). Este plásmido posee además un fragmento de ADN que incluye sitios de reconocimiento para 19 enzimas de restricción, el gen de resistencia a ampicilina, un fragmento del fago f1 que codifica las funciones requeridas para la obtención de ADN monocatenario, un origen de replicación para *E. coli* y el gen *lacZ* de la β -galactosidasa para la selección de clones por su color blanco o azul.

5.2 Obtención del ADN

La extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias se efectuó por el método de lisis alcalina (Zhou *et al.*, 1990), que consiste en romper las células en presencia de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). Cuando fue preciso obtener ADN de

pureza superior y en mayor cantidad, se utilizaron columnas de intercambio aniónico comerciales QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

La extracción de ADN plasmídico de levaduras se realizó según los protocolos descritos previamente por Moreno y colaboradores (Moreno *et al.*, 1991) y en el manual de laboratorio de Sambrook y colaboradores (Sambrook & Russell 2001).

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se llevó a cabo en el termociclador MyCycler™ (BioRad). Las mezclas de reacción contenían el tampón de reacción suministrado por la enzima, MgCl₂ a una concentración final de 3 mM, mezcla de los 4 desosinucleótidos trifosfato precursores a una concentración final de 0,2 mM cada uno, oligonucleótidos utilizados como cebadores a una concentración final de 100 μM, 0,25 unidades de la polimerasa Taq (BIOLINE), y ADN molde utilizado en cantidad variable, dependiendo de si se trataba de ADN genómico o plasmídico. La reacción requiere la desnaturalización del ADN molde, el anillamiento de los oligonucleótidos incorporados a la reacción y finalmente, la extensión de las hebras sintetizadas. En cada momento la reacción requiere una temperatura determinada. Por último, el número de ciclos, la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión se modificó dependiendo de las características del experimento. En algunas ocasiones se utilizó una enzima con capacidad de corrección de errores (VELOCITY DNA Polymerase, BIOLINE) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Cuando fue necesario la purificación de los productos de PCR se realizó mediante el sistema Gel Band Purification Kit (MACHEREY-NAGEL).

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por SIGMA y por Invitrogen™.

5.4 Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN se realizó en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca que utiliza un secuenciador automático Abi prism 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems).

La técnica usada se basa en la descrita por (Sanger *et al.*, 1977) con alguna modificación. En este caso se utilizan didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos y un láser capaz de reconocer las distintas longitudes de onda de emisión de estos fluorocromos, que corresponden a cada una de las distintas bases.

Las secuencias obtenidas mediante esta técnica se importaron mediante el programa Chromas, que muestra tanto el cromatograma de la reacción, como la secuencia de ADN.

5.5 Manipulación de ADN

Todos los protocolos utilizados para la manipulación de ADN se recogen en distintos manuales (Ausubel *et al.*, 1995; Sambrook & Russell 2001). Además de las indicaciones generales de estos manuales de laboratorio, se tuvieron en cuenta otras recomendaciones de las casas comerciales suministradoras de materiales y enzimas utilizadas.

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o por amplificación mediante PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (Hispanlab) de distinto porcentaje (entre 0,7% y 2%) según el tamaño de los fragmentos a analizar. Estos geles de agarosa llevaban bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml, para localizar el ADN mediante iluminación con una fuente de luz ultravioleta. El tampón utilizado, tanto para preparar la agarosa como para realizar la electroforesis, fue 1xTAE (Tris-Ácético 40 mM; EDTA 1mM).

El aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN después de su separación en geles de agarosa se llevó a cabo mediante el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL).

La ligación de fragmentos de ADN, tras eliminar el grupo fosfato del extremo 5' del vector mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (Boehringer), se realizó con la enzima ADN ligasa del fago T4 (Fermentas). La mezcla de la ligación se incubó durante 12-16 horas a 16°C y posteriormente se utilizó para transformar *E. coli*.

5.6 Mutagénesis dirigida *in vitro*

Esta técnica se utilizó para la introducción de mutaciones en el gen de interés. En todos los casos se siguieron los pasos descritos (Kunkel *et al.*, 1987) que se resumen a continuación:

- Transformación de la cepa CJ236 de *E. coli* con el plásmido que contenía el inserto de ADN bicatenario que deseábamos mutagenizar.

La cepa CJ236 de *E. coli* contiene el episoma F' que le permite ser infectada por el fago auxiliar M13K07 y dos mutaciones que son de interés en la mutagénesis dirigida: la mutación *dut* inactiva la enzima dUTPasa y esto hace que las moléculas de ADN sintetizadas porten la base uracilo en los lugares donde debería aparecer timina; y la mutación *ung*, que inactiva la uracilo N-glicosidasa, así el uracilo incorporado al ADN no puede ser eliminado.

- Obtención de ADN de cadena sencilla infectando las bacterias con el fago M13 que tras replicarse empaqueta una de las cadenas del plásmido bicatenario con el inserto de interés.

- Fosforilación del oligonucleótido que porta la mutación deseada y que actuará como cebador para la síntesis de la cadena complementaria a la hebra sencilla obtenida en el paso anterior. Para ello se utilizó la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (Fermentas), según la técnica descrita (Sambrook & Russell, 2001).

- Anillamiento del oligonucleótido fosforilado a la zona complementaria del ADN de cada sencilla y síntesis de la hebra complementaria en presencia del correspondiente tampón de síntesis, T4 ADN ligasa y T7 ADN polimerasa (Amersham Pharmacia).
- Transformación de la cepa DH5 α de *E. coli* con la mezcla de reacción anterior. Como esta cepa no porta la mutación *ung*, la hebra rica en uracilo se degrada, replicándose exclusivamente la hebra sin uracilo que es la que ha incorporado la mutación deseada.

5.7 Transformación de *E. coli*

La transformación de cepas de *E. coli* con plásmidos o con mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado por Kushner (Kushner, 1978) basado en el choque térmico.

En algunos casos la transformación se realizó por un método simplificado conocido como "transformación del minuto" (Golub, 1988).

En ocasiones se empleó la técnica de la electroporación, que consiste en aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática mediante un campo eléctrico externo.

5.8 Transformación de *S. pombe*

La transformación de *S. pombe* se realizó por el método del acetato de litio-sorbitol (Ito *et al.*, 1983), con las modificaciones descritas (Bahler *et al.*, 1998).

5.9 Clonación del gen *bch1*⁺

El gen *bch1*⁺ se clonó mediante la técnica conocida como *gap repair* (Orr-Weaver *et al.*, 1983). Esta técnica permitió la transferencia de un fragmento de ADN desde el genoma de una cepa silvestre de *S. pombe* hasta un plásmido replicativo que contenía las regiones flanqueantes a dicho fragmento. Este plásmido debe estar en forma lineal, de modo que al introducirlo en una cepa de levadura por transformación ocurra un proceso de recombinación homóloga que recupere el fragmento de interés localizado

entre las dos regiones flanqueantes, esto permitirá que el plásmido se vuelva circular y que los transformantes obtenidos puedan crecer en el medio selectivo adecuado.

Los oligonucleótidos *bch1* *Apal*-F y *bch1* *Sall*-R (**tabla IV**) se emplearon para amplificar por PCR una región de ADN de 1 kb localizada antes del ATG de la ORF del gen *bch1*⁺ en el genoma de *S. pombe*, de forma que quedase flanqueada por los sitios de restricción *Apal* y *Sall*. De la misma forma, se utilizaron los oligonucleótidos *bch1* *ERI*-F y *bch1* *SpeI*-R (**tabla IV**) para amplificar una región de tamaño parecido a la anterior, en este caso posterior al codón de parada en el genoma de *S. pombe*, y flanqueada por los sitios de restricción *EcoRI* y *SpeI*. Ambos fragmentos se clonaron en el plásmido KS-Not de *E. coli*; el plásmido obtenido se denominó KS-Not + 5' + 3' *bch1*⁺.

Este plásmido se digirió con las enzimas *Apal* y *SpeI* para poder clonar las secuencias flanqueantes del gen *bch1*⁺ entre estos mismos sitios de restricción del plásmido pAL de *S. pombe*. El plásmido obtenido se denominó pAL + 5' + 3' + *bch1*⁺. Para hacerlo lineal, se digirió con las enzimas *Sall* y *HindIII* y se introdujo en la cepa silvestre HVP281 de *S. pombe* mediante transformación. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM sin leucina.

Los plásmidos de algunos de los transformantes se recuperaron mediante extracción de ADN de levadura y posterior transformación de una cepa de *E. coli* mediante la técnica de la electroporación. Además, se confirmó que portaban la secuencia del gen *bch1*⁺ mediante análisis de restricción. Aquellos transformantes que presentaron un patrón correcto de ADN se secuenciaron. El plásmido obtenido se denominó pAL + *bch1*⁺.

5.9.1 Obtención de mutantes nulos *bch1::KAN*

Con el fin de estudiar la función del gen *bch1*⁺ se construyó un mutante nulo del mismo mediante la técnica del reemplazamiento génico (Rothstein, 1983). Esta técnica se basa en la construcción de un casete de delección en el que las regiones 5' y 3' no codificantes del gen de interés se ligan a un marcador de selección que reemplaza la ORF del gen. Al introducir este casete en la cepa de interés, mediante transformación,

se produce el proceso de recombinación homóloga entre las zonas promotora y terminadora, y así el gen queda eliminado del genoma.

Para la construcción del mutante nulo del gen *bch1*⁺ se utilizó un casete de delección en el cual la ORF del gen se sustituyó por el gen *KANMX6* (Bahler *et al.*, 1998). Este fragmento se clonó en los sitios *Sall/EcoRI* del plásmido KS-Not + 5' + 3' + *bch1*⁺, quedando flanqueado por las regiones no codificantes del gen *bch1*⁺. El plásmido obtenido se denominó KS + *bch1::KAN*. Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción *ApaI* y *SpeI* y se utilizó para transformar las cepas HVP281 (haploide) y HVP124 (diploide) de *S. pombe*. Se obtuvieron diferentes transformantes capaces de crecer en medio rico suplementado con G-418. El número de colonias procedentes de la transformación de la cepa haploide y de la cepa diploide fue parecido, lo que sugería que el gen *bch1*⁺ no era esencial, por lo que no se procedió al análisis de los clones diploides.

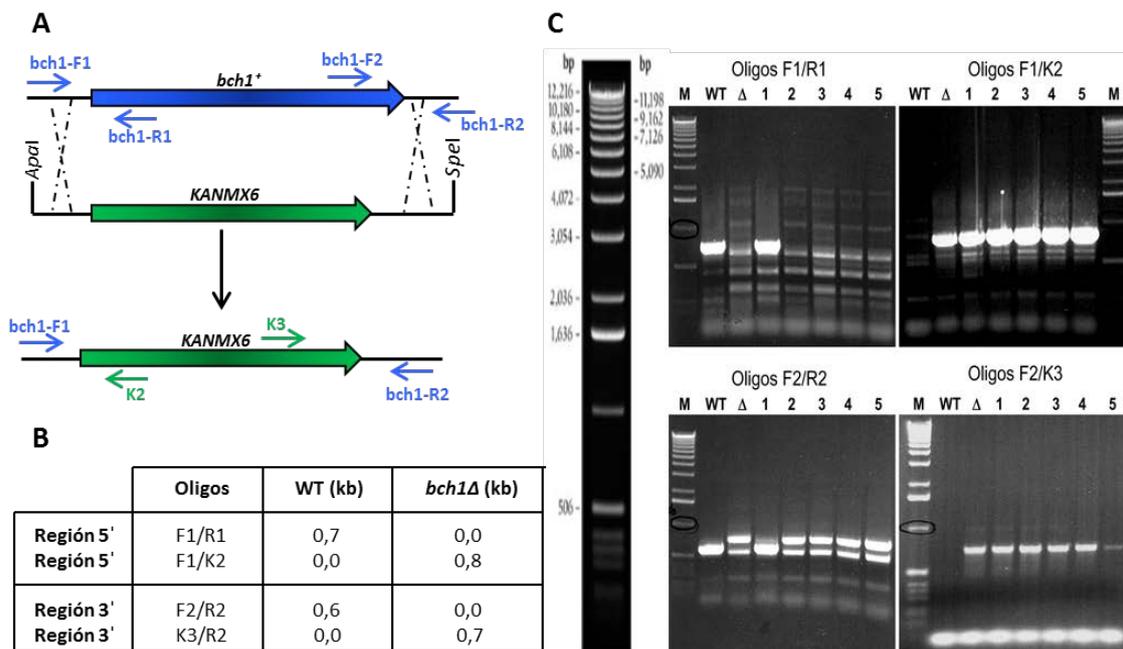


Figura 52. Delección del gen *bch1*⁺.

A. Representación esquemática del proceso de delección en el que se indican la posición relativa de los oligonucleótidos empleados para comprobar la integración del casete *bch1::KANMX6* en el cromosoma.

B. Tamaño teórico de los fragmentos de ADN esperados al realizar las reacciones de PCR con los oligonucleótidos indicados y ADN total de una cepa silvestre (WT) o de un mutante nulo *bch1Δ*.

C. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) en las que se muestran los productos obtenidos al realizar reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos indicados y ADN de una cepa silvestre (WT), del plásmido KS-Not + *bch1::KAN* (Δ) o de cinco clones potencialmente carente del gen *bch1*⁺. En cada caso M indica el marcador de pesos moleculares, que se muestra ampliado a la izquierda.

Por último, se comprobó mediante PCR que en los clones obtenidos de la cepa haploide la integración del casete *bch1::KAN* había ocurrido en su *locus*. Para analizar la región 5' se realizaron dos reacciones de PCR independientes: con los oligonucleótidos *bch1-F1* (que hibrida en la región 5' de ADN clonada) y *bch1-R1* (interno en la ORF de *bch1⁺*, y por tanto no hibrida si la delección *bch1::KAN* ha tenido lugar) y con los oligonucleótidos *bch1-F1* (que como se ha dicho hibrida en la región 5' de ADN clonada) y *K2* (interno en el gen *KANMX6*, y que por tanto solo hibrida si la delección *bch1::KAN* ha tenido lugar). Mientras que en la región 3' se realizaron otras dos reacciones de PCR: se utilizaron los oligonucleótidos *bch1-F2* (interno en la ORF de *bch1⁺*, y por tanto no hibrida si la delección *bch1::KAN* ha tenido lugar) y *bch1-R2* (hibrida en el fragmento 3' de ADN clonado) y los oligonucleótidos *K3* (interno en el gen *KANMX6*) y *bch1-R2* (Tabla IV y Figura 52).

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados para la clonación y la delección del gen *bch1⁺*.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Utilidad
bch1 Apal-F	GGGCCCACTTTGTTTAATCTTAACACTTATCGTAGTTAATTTAA AAAT	Clonación del gen <i>bch1⁺</i>
bch1 Sall-R	GTCGACCATATATCATAAATTGGAATTAATATGC	Clonación del gen <i>bch1⁺</i>
bch1 ERI-F	GAATTCTAAGTTTAGACTCATTAAGC	Clonación del gen <i>bch1⁺</i>
bch1 SpeI-R	ACTAGTGAGATGCCAGTTGACATGGC	Clonación del gen <i>bch1⁺</i>
bch1 CTNot	GCTTTAATGAGTCTAAACTTAGCGGCCGCCAATTCATGGCCA GGAAT	Introducción de un sitio <i>NotI</i> antes del STOP del gen <i>bch1⁺</i>
bch1 ATGNot	CCTTAAAGAATGAATCACTGCGGCCGCCATATATCATAAATT GGAAT	Introducción de un sitio <i>NotI</i> antes del ATG del gen <i>bch1⁺</i>
bch1-F1	GCTACACTATTCGTTGGGTACTAC	Comprobación <i>bch1::KAN</i>
bch1-F2	GAGCTCGTTTTGACCGCTATCGCT	Comprobación <i>bch1::KAN</i>
bch1-R1	GCCGCTAGTGAAGCTGAGGAAGG	Comprobación <i>bch1::KAN</i>
bch1-R2	CAAGCAAGGATGCGCTACTCTGC	Comprobación <i>bch1::KAN</i>
K2	GTCGCACCTGATTGCCCGAC	Comprobación <i>bch1::KAN</i>
K3	TTGGACGAGTCGGAATCGCAG	Comprobación <i>bch1::KAN</i>

5.10 Marcaje del gen *bch1⁺*

Para detectar las proteínas de interés mediante ensayos tipo *Western blot* se realizó el marcaje de dichas proteínas con el epítipo HA (HemAgglutinina) es un pequeño péptido de 9 aminoácidos (YPYDVPDYA) procedente de la proteína hemagglutinina del virus de la gripe. (Wilson *et al.*, 1984). Para la realización de este marcaje se utilizó un fragmento de ADN de 115 pb que portaba tres copias consecutivas del epítipo.

Este fragmento de ADN se clonó o bien detrás del ATG de inicio o bien antes del codón de parada del gen *bch1*⁺. Previamente, fue preciso crear un sitio de corte para la enzima de restricción *NotI* detrás del ATG de inicio o antes del codón de parada del gen mediante mutagénesis dirigida *in vitro*. Esto es debido a que el fragmento de ADN del epítipo HA está flanqueado por sitios de restricción *NotI*. La correcta inserción de los fragmentos se comprobó por análisis con enzimas de restricción.

La GFP flanqueada por sitios *NotI* se fusionó al gen *bch1*⁺ en el sitio *NotI* generado detrás del codón de inicio o anterior al codón de parada. La GFP emite luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariotas, por ello suele usarse como sistema para la detección de la localización *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia. Ambas construcciones, Bch1-GFP y GFP-Bch1 se comprobaron por análisis con enzimas de restricción y se integraron en el *locus bch1*⁺ mediante digestión del plásmido integrativo pJK148 con la enzima de restricción *NsiI* y transformación de las cepas de interés. En ambos casos se comprobó la funcionalidad de la proteína. A lo largo de este trabajo se van a utilizar cepas con el gen *bch1*⁺ marcado o bien en el extremo N-terminal o bien en el extremo C-terminal, lo cual se detallará en cada experimento.

6. Análisis de proteínas

Las técnicas generales para el análisis de proteínas se realizaron acorde con los protocolos desarrollados por Harlow (Harlow, 1998) con algunas variaciones que se detallarán a continuación.

6.1 Obtención de extractos celulares

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento a una D.O.₆₀₀ entre 0,8 y 1,0. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1 ml de agua fría. A continuación, se añadió 5 µl de tampón de extracción (Tris-HCl pH 7,2 50 mM; NaCl 350 mM y EDTA 50 mM) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pestatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM) por D.O. de células de la muestra. Las células se lisaron con bolitas de vidrio (Braun

Biotech International) en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 3 pulsos de 15 segundos a una potencia de 5,5 m/s espaciados por una incubación de 5 minutos en hielo. Se comprobó la rotura celular mediante la observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, las paredes y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 3.000 rpm durante 1 minuto. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito (Bradford, 1976). Por último, se añadió a las muestras la cantidad necesaria de tampón de carga 2xSB (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS al 10%; β -mercaptoetanol 0,286 M; glicerol al 50% y azul de bromofenol); estas muestras se calentaron a la temperatura adecuada durante 8 minutos.

En caso de trabajar con proteínas implicadas en la formación de cubiertas vesiculares, se añadió GTP- γ -S al tampón de extracción (5 μ l/ml de una solución a 10 mM) para evitar el desensamblaje de las mismas, debido a que la adición de este compuesto ayuda a mantener activa la GTPasa Arf1.

Por último, en algunos casos se utilizó el molino criogénico (FREEZER / MILL® 6670) como método de rotura. En este caso, las células se recogieron, se lavaron con 1 ml de agua fría y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido, evitando así la degradación de las proteínas. Las muestras se sometieron a 2 ciclos de rotura de 10 segundos cada ciclo a una intensidad de 12 (rango 1-15). Una vez obtenidos los extractos celulares, la valoración y la cuantificación de los mismos se llevaron a cabo del mismo modo que se hizo para las muestras obtenidas mediante rotura por bolitas de vidrio.

6.1.1 Obtención de extractos celulares para el análisis de proteínas de membrana

Para realizar este tipo de ensayos fue necesario partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento a una D.O.₆₀₀ entre 0,8 y 1,0. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1 ml de tampón *STOP* (EDTA 10 mM; NaCl 154 mM; NaF 10 mM y NaN₃ 10 mM) y con 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5/EDTA 5 mM.

A continuación, se añadió 5 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 5 mM y sacarosa al 10%) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pestatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM) por D.O. de células de la muestra. Las células se lisaron con bolitas de vidrio (Braun Biotech International) en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 3 pulsos de 15 segundos a una potencia de 5,5 m/s espaciados por una incubación de 5 minutos en hielo. Se comprobó la rotura celular mediante la observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, las paredes y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 1.600 xg durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976). A continuación, se prepararon 160 µl de cada una de las muestras a la concentración deseada más 40 µl de urea 8 M, las muestras se incubaron en rotación durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se añadió a cada muestra 200 µl de tampón de carga 2xSB (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS al 10%; β-mercaptoetanol 0,286 M; glicerol al 50% y azul de bromofenol); estas muestras se calentaron a 65°C durante 8 minutos.

6.2 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Una vez que las muestras de extracto total estaban desnaturalizadas, se cargaron en geles de poliacrilamida (BioRad). Estas proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de distinto porcentaje de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) a 150V durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. El tampón de carrera utilizado fue 1xLaemmli, cuya composición es Tris/Glicina (24,8 mM/192 mM) y SDS al 0,1% pH 8,3.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Inmobilon™-P, Millipore) mediante el sistema Mini Trans Blot (BioRad) usando el tampón de transferencia Tris/Glicina (24,8 mM/192 mM) y metanol al 10% pH 8,3 durante aproximadamente 2 horas a 100 V.

6.3 Inmunodetección de proteínas

En primer lugar, las membranas se bloquearon en TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,25%) con leche en polvo desnatada (Sveltesse-Nestlé) al 5% o con seroalbúmina bovina (BSA, SIGMA) al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después del bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario adecuado a la dilución apropiada en la solución de bloqueo correspondiente durante toda la noche a 4°C. A continuación, las membranas se lavaron 2 veces durante 10 minutos con abundante TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado anti-IgG unido a peroxidasa (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) adecuado durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se volvieron a lavar 2 veces con TBST.

El revelado se produce debido a la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia, empleando el kit WesternBright™ ECL (Advansta) siguiendo las instrucciones de la propia casa comercial. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron en películas fotosensibles (Medical X-Ray Film Blue, AGFA).

Los anticuerpos utilizados en este trabajo están descritos en la [tabla V](#).

Tabla V. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
anti-Cpy monoclonal, 10A5	1:500	Molecular Probes, Invitrogen
anti-GFP monoclonal, JL-8	1:1000	BD Living Colors™, Clontech
anti-HA monoclonal, 12CA5	1:10.000	Roche
anti-Pma1 monoclonal	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology
anti-Pep12 monoclonal	1:500	Life technologies™
anti-Cdc2 p34, Y100.4	1:4000	Santa Cruz Biotechnology
anti-tubulina, clon B-5-1-2	1:10.000	SIGMA
anti-GFP policlonal, A6455	1:120	Invitrogen
anti-RFP policlonal	1:1.000	Clontech
anti-Vma2 policlonal	1:500	ABNOVA
anti-IgG de ratón unido a HRP	1:10.000	BioRad
anti-IgG de conejo unido a HRP	1:10.000	BioRad

6.4 Co-inmunoprecipitación de proteínas

Para realizar este tipo de ensayos fue necesario partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento a una D.O.₆₀₀ entre 0,8 y 1,0. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1 ml de tampón *STOP* (EDTA 10 mM; NaCl 154 mM; NaF 10 mM y NaN₃ 10 mM) y con 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5/EDTA 5 mM. A continuación, se añadió 5 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 200 mM; EDTA 5 mM e IGEPAL CA-630 al 0,5%) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM) por D.O. de células de la muestra. En el caso de trabajar con proteínas de cubiertas vesiculares se añadió también GTP-γ-S (5 µl/ml de una solución a 10 mM). Después, las células se rompieron siguiendo uno de los distintos métodos de rotura previamente descritos en el apartado 6.1 de esta misma sección. Una vez obtenidos los extractos celulares, entre 1 y 5 mg totales se llevaron hasta un volumen de 330 µl con tampón de extracción. A continuación, se separaron 30 µl que se mezclaron con la cantidad apropiada de 2xSB (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS al 10%; β-mercaptoetanol 0,286 M; glicerol al 50% y azul de bromofenol) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a la temperatura adecuada, dependiendo de la naturaleza de las proteínas. Estas muestras son los denominados "Extractos totales".

Al resto de los extractos celulares se le añadió otros 300 µl de tampón de inmunoprecipitación o IP (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 200 mM; EDTA 5 mM y Triton X-100 al 2%) con inhibidores de proteasas. Estos extractos se incubaron con 2,5 µl de anticuerpo policlonal frente al epítipo GFP durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se añadieron 50 µl de proteína A-sefarosa (Protein A sepharose CL-4B, GEHealthcare a 0,1 g/ml en tampón IP) durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, los complejos unidos a la matriz de sefarosa se sedimentaron por centrifugación y se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón IP con inhibidores de proteasas y una vez más con 1 ml de tampón 1xPBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,7 mM y KH₂PO₄ 2 mM) también con inhibidores. Finalmente, los complejos se resuspendieron en 50 µl de 2xSB y se desnaturalizaron durante 5 minutos. Estas muestras son los denominados "IPs".

Los extractos totales y las IPs obtenidos en este proceso se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, como ya se ha detallado en un apartado anterior de esta misma sección.

El anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación fue:

- Anticuerpo policlonal frente al epítipo GFP (Invitrogen), dilución 1:120.

Para el revelado de las membranas se utilizó:

- Anticuerpo monoclonal frente al epítipo GFP (BD Living Colors™, Clontech), dilución 1:3.000.
- Anticuerpo monoclonal frente al epítipo HA (Roche), dilución 1:10.000.

6.4.1 Co-inmunoprecipitación de proteínas de membrana

Para realizar este tipo de ensayos fue necesario partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento a una D.O.₆₀₀ entre 0,8 y 1,0. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1 ml de tampón *STOP* (EDTA 10 mM; NaCl 154 mM; NaF 10 mM y NaN₃ 10 mM). A continuación, se lavaron con 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5/EDTA 5 mM. El siguiente paso fue la rotura de las células, para ello se añadieron 5 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 200 mM y EDTA 5 mM) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pestatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM) por D.O. de células de la muestra. Las células se lisaron con bolitas de vidrio (Braun Biotech International) en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 3 pulsos de 15 segundos a una potencia de 5,5 m/s separado por períodos de incubación de 5 minutos en hielo. Se comprobó la rotura celular mediante la observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, las paredes y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. A continuación, se diluyó el sobrenadante con 500 µl de tampón de extracción más inhibidores de proteasas. Después las muestras se centrifugaron a 21.000 xg durante 30 min. Pasado ese tiempo, el pellet (membranas) se resuspendió en 3 ml de tampón IP (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 200 mM; EDTA 5 mM; Tween-20 al 10% y Triton X-100 al 2%) con inhibidores de proteasas

y se mantuvo en rotación durante aproximadamente 2 horas a 4°C. Las muestras se centrifugaron de nuevo, en este caso a 100.000 xg durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckman Optima™ TL 120 para así poder tener en el sobrenadante únicamente las proteínas solubilizadas en el tampón de IP. La concentración de proteína de los sobrenadantes se cuantificó como se ha indicado antes (Bradford, 1976). Por último, entre 1 y 5 mg de extractos celulares se llevaron hasta un volumen de 400 µl con tampón de extracción más inhibidores de proteasas. Se separaron 50 µl de cada muestra que se mezclaron con la cantidad apropiada de 2xSB (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS al 10%; β-mercaptoetanol 0,286 M; glicerol al 50% y azul de bromofenol) y se calentaron durante 8 minutos a 65°C. Estas muestras son los denominados "Extractos totales".

Al resto de los extractos celulares se añadieron otros 350 µl de tampón IP más inhibidores de proteasas. Estos extractos se incubaron con 2,5 µl de anticuerpo policlonal frente al epítipo GFP durante 2 horas a 4°C, posteriormente se añadieron 60 µl de proteína A-sefarosa (Protein A sepharose CL-4B, GEHealthcare a 0,1 g/ml en tampón IP) durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, los complejos unidos a la matriz de sefarosa se sedimentaron por centrifugación y se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón IP con inhibidores de proteasas y una vez más con 1 ml de tampón 1xPBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,7 Mm y KH₂PO₄ 2 mM) también con inhibidores. Finalmente, los complejos se resuspendieron en 50 µl de 2xSB y se calentaron durante 8 minutos a 65°C. Estas muestras son los denominados "IPs".

Ambos extractos obtenidos en este proceso se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, como ya se ha detallado anteriormente. Los anticuerpos utilizados en este tipo de co-inmunoprecipitaciones son los mismos que los usados en el apartado anterior de esta misma sección.

6.5 Ensayo de *immunoblot* de colonias (*dot blot*)

Este ensayo de colonias para detectar la proteína Cpy1 secretada por defectos en su transporte se realizó como lo describieron Iwaki y colaboradores (Iwaki *et al.*, 2006) con las modificaciones descritas (Codlin & Mole, 2009). Células creciendo en fase

exponencial se concentraron hasta una D.O.₆₀₀ de 2,0 por centrifugación. Se depositaron 6 µl de esta suspensión de células sobre una membrana de nitrocelulosa colocada sobre placas de MM completo, medio rico (YES) o YES suplementado con sorbitol 1,2 M, incubándose durante 30 horas (YES) o 5 días (MM completo). Tras lavar la membrana con TBST para eliminar las células, se procedió a bloquear la membrana con BSA al 1% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente, y se inmunodetectó Cpy1, tal y como se describe en el apartado 6.3 de esta sección, con el anticuerpo monoclonal frente a la proteína CPY de *S. cerevisiae* (Invitrogen) a una dilución 1:500.

7. Fraccionamientos subcelulares por gradientes de sacarosa

I. Preparación de los gradientes

Se prepararon distintas soluciones de sacarosa al 55%, 45%, 40%, 37,5%, 35%, 32,5% y 30% en el tampón adecuado (HEPES 20 mM pH 7,2/EDTA 1 mM). Estas soluciones se utilizaron para la preparación de los gradientes depositando en orden (desde el fondo hasta la parte superior del tubo) con sumo cuidado las siguientes cantidades de cada solución en los tubos adecuados (*Ultra-Clear Tubes*; Ref. 344057):

250 µl de la solución de sacarosa al 30%

500 µl de la solución de sacarosa al 32,5%

750 µl de la solución de sacarosa al 35%

750 µl de la solución de sacarosa al 37,5%

750 µl de la solución de sacarosa al 40%

500 µl de la solución de sacarosa al 45%

500 µl de la solución de sacarosa al 50%

250 µl de la solución de sacarosa al 55%

Estos gradientes se conservaron a 4°C durante 24 horas aproximadamente hasta la obtención de los extractos celulares.

II. Obtención de los extractos celulares

Se partió de cultivos en fase logarítmica de crecimiento a una D.O.₆₀₀ entre 0,8 y 1,0. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1 ml de tampón *STOP* (EDTA 10 mM; NaCl 154 mM; NaF 10 mM y NaN₃ 10 mM). A continuación, se lavaron con 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5/EDTA 5 mM. El siguiente paso fue la rotura de las células, para ello se resuspendieron en 3 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 20 mM pH 7,2; EDTA 1 mM y sacarosa al 10%) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM) y con GTP-γ-S (5 µl/ml de una solución a 10 mM) en tubos de 15 ml. Las células se lisaron con bolitas de vidrio (Braun Biotech International) en una Fast-Prep 24 (MP™) durante 5 pulsos de 30 segundos a una potencia de 6,5 m/s con incubaciones en frío durante 5 minutos entre cada pulso de rotura. Se comprobó la rotura celular mediante la observación al microscopio de contraste de fases. Después, se añadieron 2 ml más de tampón de extracción con inhibidores de proteasas para así poder recoger todo el sobrenadante posible con la ayuda de unas puntas muy finas para que no pasaran las bolitas (BioRad #223-9915). Las paredes celulares se eliminaron por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 100.000 xg durante una hora en una ultracentrífuga Beckman Optima LE-80 con un rotor 70 Ti. El pellet, que contiene las membranas celulares, se resuspendió en 300 µl de una solución de sacarosa al 10% en HEPES 20 mM pH 7,2/EDTA 1 mM. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas.

III. Fraccionamiento celular

Una vez obtenidos los extractos se cargaron 250 µl de los mismos en la parte superior de los gradientes.

A los 50 µl restantes se añadieron 17 µl de 4xSB (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS al 20%; β-mercaptoetanol 0,286 M; glicerol al 100% y azul de bromofenol) y se calentaron durante 20 minutos a 37°C. Estas muestras son los denominados "Extractos totales".

Los gradientes se centrifugaron a 38.000 rpm durante 20 horas en una ultracentrífuga Beckman Optima LE-80 con un rotor basculante SW 55.

Pasado este tiempo, se sacaron 17 fracciones de 250 μ l de forma manual con una pipeta automática, empezando por la parte superior del tubo. De cada 250 μ l se pasaron 160 μ l a un tubo y se añadieron 40 μ l de urea 8 M. Estas muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C en rotación. A continuación, se añadieron 67 μ l de 4xSB y se calentaron durante 20 minutos a 37°C.

Las distintas fracciones obtenidas en este proceso se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de dos porcentajes (12% en la parte superior y 7% en la parte inferior), como ya se ha detallado en el apartado 6.2 de esta misma sección. Normalmente se cargaron 40 μ l de la fracción 3 hasta la fracción 16.

Los anticuerpos utilizados en este proceso fueron los siguientes:

- Anticuerpo monoclonal frente al epítipo GFP (BD Living Colors™, Clontech), dilución 1:500.
- Anticuerpo monoclonal frente a la proteína Pep12 (Life technologies™), dilución 1:500.
- Anticuerpo policlonal frente al epítipo RFP (Clontech), dilución 1:1.000.
- Anticuerpo policlonal frente a la proteína Pma1 cedido por Ramón Serrano a Ángel Durán, dilución 1:10.000.
- Anticuerpo policlonal frente a la proteína Vma2 (ABNOVA), dilución 1:500.

8. Actividades enzimáticas

8.1 Valoración de la actividad de la fosfatasa ácida

Debido a que en *S. pombe* hasta un 40% de la fosfatasa ácida se secreta al medio (Wang *et al.*, 2002), se procedió a valorar esta actividad enzimática en el medio de cultivo como indicador general del proceso de secreción. Para la realización de este ensayo se partió de cultivos con una D.O.₆₀₀ de 0,5. Para cada una de las muestras se centrifugó 1 ml de cultivo, y se tomaron 500 μ l del sobrenadante que se mezclaron con 500 μ l de la solución sustrato (paranitrofenil-fosfato 2 mM en tampón acetato sódico 1

M pH 4,0) precalentada a 30°C. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 30°C en rotación. Pasado ese tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 500 µl de hidróxido sódico 1 M. A continuación, se midió la absorbancia a 405 nm de cada muestra para así poder cuantificar la cantidad de nitrofenol liberado, utilizando como blanco 500 µl del medio de cultivo tratados de la misma forma que las muestras.

Los resultados se expresaron relativizando la actividad fosfatásica (absorbancia a 405 nm) con respecto al número de células (absorbancia a 600 nm) en unidades arbitrarias.

8.2 Valoración de la actividad β -glucán sintasa

Para realizar este ensayo se partió de un volumen de cultivo de 100 ml, creciendo exponencialmente a la temperatura adecuada, 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 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se lavaron con 10 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 1 Mm y β -mercaptoetanol 1 mM). Tras esto, las células 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 3.000 rpm a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. A cada muestra se le añadieron 120 µl de tampón de lavado suplementado con 1 µl de GTP- γ -S (10 mM) y bolitas de vidrio (Braun Biotech International), para proceder a la rotura de las células en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 3 pulsos de 15 segundos a una potencia de 5,5 m/s con incubaciones de 5 minutos en hielo entre cada pulso de rotura. Posteriormente, los extractos se transfirieron a tubos fríos, se diluyeron hasta 15 ml con tampón de lavado y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga a 4°C para eliminar las paredes celulares. A continuación, los sobrenadantes se pasaron a tubos fríos de 30 ml y se centrifugaron durante 30 minutos a 18.000 rpm en una centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus de Thermo Scientific™ con rotor Fiberlite™ F21-81x50y a 4°C, para recoger las membranas celulares. Éstas se resuspendieron en un volumen final de 100 µl de tampón de resuspensión (Tris-HCl 50

mM pH 8,0; EDTA 1 mM; β -mercaptoetanol 1Mm y glicerol al 30%) usando varillas de vidrio y vórtex.

La concentración de la proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico Bradford (Bradford, 1976).

Seguidamente se prepararon las mezclas de reacción empleando [14 C] 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 μ l
- [14 C] UDP-D-glucosa (2×10^5 cpm/ μ l) 5 mM: 5 μ l
- BSA al 6%: 5 μ l
- GTP 6 mM: 1 μ l

Mezcla B (cantidades añadidas por cada muestra):

- H₂O: 2 μ l
- EDTA 17 mM: 5 μ l
- Tris-HCl 1M pH 8: 3 μ l
- Membranas (de cada muestra): 5 μ l

Se tomaron 20 μ l de la mezcla de reacción A y se mezclaron con 20 μ l de la mezcla de reacción B de cada muestra en tubos de vidrio. El volumen final de la reacción fue de 40 μ l, en los que 5 μ l 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 Whatman GF/C que se lavaron 2 veces con 2,5 ml de TCA al 10 % y una vez más 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

radiactividad de las muestras se valoró en un contador de centelleo Wallac 1409. Como control, se colocaron 5 μ l de [14 C] UDP-D-glucosa 5 mM en un filtro, para obtener las cuentas totales de la reacción.

Para calcular la actividad específica en miliunidades por miligramo de proteína se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{cpm obtenidas} \times 200 \times 1000 / \text{cpm totales} \times \text{minutos} \times \mu\text{g proteína} = \text{mU} / \text{mg}$$

donde cpm son las cuentas por minuto y los minutos son 30.

La unidad específica se define como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 μ mol de glucosa por minuto a 30°C.

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

Para analizar la composición de la pared celular de *S. pombe* se utilizó un método que utiliza un precursor radiactivo (Arellano *et al.*, 1996). Las células se incubaron en medio rico hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Una vez alcanzada esta fase se diluyeron con medio sin glucosa hasta una D.O.₆₀₀ de 0,5 en un volumen total de 10 ml. El marcaje de los mismos se llevó a cabo con 5 μ Ci/ml de 14 C-glucosa durante un periodo de 6 horas a 28°C. Se tomaron 2 muestras de 50 μ l al comenzar y 2 al terminar la incubación para calcular la incorporación total de glucosa radiactiva en las células. El resto del cultivo se recogió, se lavó 2 veces con 1 ml de EDTA 1 mM y se sometió a una rotura mecánica mediante agitación con bolas de vidrio en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant). El extracto obtenido se diluyó hasta 1 ml con EDTA 1 mM, se eliminaron las bolitas de vidrio y se centrifugó a 1.000 xg durante 10 minutos para recoger las paredes. Éstas se lavaron 3 veces con 1 ml de NaCl 2 M y una vez más con EDTA 1 mM y se tomaron dos alícuotas de 20 μ l para determinar la incorporación total de 14 C-glucosa en las paredes. El resto de la muestra se hirvió durante 5 minutos para inactivar las posibles glucanasas incluidas en la pared y se resuspendió en un volumen final de 500 μ l de EDTA 1 mM. A continuación, se prepararon las siguientes reacciones enzimáticas en un volumen final de 200 μ l:

- Control: 50 μ l de paredes suplementadas con 50 μ l de tampón citrato/fosfato 50 mM pH 5,6 y 100 μ l de agua estéril.
- Zimoliasa-1: 100 μ l de paredes suplementadas con 50 μ l de tampón citrato/fosfato 50 mM pH 5,6; 30 μ l de agua estéril y 20 μ l de Zimoliasa 100T (10 mg/ml).
- Zimoliasa-2: 100 μ l de paredes suplementadas con 50 μ l de tampón citrato/fosfato 50 mM pH 5,6; 40 μ l de agua estéril y 10 μ l de Zimoliasa 100T (10 mg/ml).
- Quantazima-1: 100 μ l de paredes suplementadas con 95 μ l de tampón Tris 50 mM pH 7,5 y 5 μ l de Quantazima (10 mg/ml).
- Quantazima-2: 100 μ l de paredes suplementadas con 97 μ l de tampón Tris 50 mM pH 7,5 y 3 μ l de Quantazima (10 mg/ml).

Todas las reacciones se incubaron a 28°C durante 36-40 horas, después se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 minutos y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y de los precipitados. Todas las alícuotas, excepto los sobrenadantes que se valoran directamente, se diluyeron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10%, manteniéndose a 4°C hasta ser filtradas sobre filtros Whatman GF/C. Estos filtros se lavaron 2 veces con 2,5 ml de TCA al 10% y una vez más con 3-4 ml de etanol al 96%. La radioactividad se determinó en un contador de centelleo Wallac 1409, añadiendo líquido de centelleo OptiPhase HiSafe, Wallac.

La Zimoliasa 100T (Seikagaku Kogio) es un complejo enzimático que contiene β -glucanasa y proteasas. El precipitado de la incubación con Zimoliasa 100T corresponde con el α -glucano que no se degrada. La Quantazima (Quantum, Biotevhnologies ING) es una $\beta(1-3)$ -glucanasa recombinante. El sobrenadante de la incubación con Quantazima corresponde al $\beta(1-3)$ -glucano, mientras que en el precipitado permanece el $\beta(1-6)$ -glucano, el α -glucano y el galactomanano. La diferencia entre los precipitados de Quantazima y Zimoliasa 100T corresponde al galactomanano más el β -glucano que pueden separarse en este procedimiento.

Los cálculos se realizaron de la siguiente forma, 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 μ l x 100 = incorporación total

Alícuota 2: 10 μ l x 100 = incorporación total incompleta

Alícuota 3: 20 μ l x 50 = paredes totales

Alícuota 4: sobrenadante

Control: degradación espontánea

Zimoliasa: β -glucano + manano: 50 μ l x 4 x 5

Quantazima: β -glucano: 50 μ l x 4 x 5

Alícuota 5: precipitado

Control: paredes totales 50 μ l x 10

Zimoliasa: α -glucano 100 μ l x 5

Quantazima: α -glucano + manano 100 μ l x 5

10. Técnicas microscópicas

Para llevar a cabo estas técnicas, se emplearon diversos microscopios:

Leica DM RXS en el cual la captación de imágenes se realizó con una cámara digital Leica Qsensys y el programa informático Qfish.

El equipo DeltaVision Microscope (Applied Precision), que incluye un microscopio invertido **Olympus IX-70**, con una cámara CoolSNAP HQ2 (PHOTOMETRICS) y controlado mediante el software softWoRx Resolve3D.

Microscopio confocal **Spinning-Disk Olympus IX-81**, equipado con un módulo confocal CSUX1-A1 (Yokogawa) además de con una cámara para la adquisición de imágenes EVOLVE de PHOTOMETRICS y se controla por el programa informático MetaMorph®.

Las imágenes se procesaron posteriormente con los programas Adobe Photoshop CS3 (Adobe System, Inc), ImageJ (*Nacional Institute of Health, USA*) y MetaMorph® (MDS Analytical Technologies).

10.1 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 utilizándose generalmente el microscopio Leica DM RXS.

10.2 Microscopía de fluorescencia

Para la observación de muestras fluorescentes se utilizaron los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. En algunas ocasiones se realizaron como referencia imágenes de campo claro o contraste de fases.

10.2.1 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 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 procariotas. Por ello suele usarse como sistema de detección de la expresión y localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para usar este sistema 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. En los experimentos escritos en esta memoria se ha empleado una variante de la proteína verde fluorescente, denominada EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), más brillante que la original, que emite luz de 507 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 488 nm.

Existe, además, una proteína roja fluorescente (DsRFP), que emite luz de 586 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 556 nm. Se trata de una proteína diferente a la GFP, que se ha aislado del coral. Al igual que en el caso de la GFP, se han obtenido variantes de esta proteína, como son las denominadas Cherry y Tomato, usadas en este trabajo.

El marcaje de parejas de proteínas con diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes permiten la realización de experimentos de co-localización (Shaner *et al.*, 2005).

10.2.2 Tinción con calcoflúor

El calcoflúor es un compuesto que se une a los polímeros con enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$ -glucano de la pared celular de las levaduras, por esta razón se utiliza tanto para detectar posibles anomalías en la pared como para determinar los lugares de crecimiento de la célula. En *S. cerevisiae* el calcoflúor tiñe fundamentalmente las zonas de la pared celular ricas en quitina. Sin embargo, en el caso de *S. pombe* que no posee cantidades detectables de quitina, se une fundamentalmente al $\beta(1-3)$ -glucano lineal del septo y de los polos de crecimiento (Cortés *et al.*, 2007). Este compuesto se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul. El calcoflúor (Blankophor BBH, Bayer Corporation) se preparó en agua a una concentración de 10 mg/ml, al que se añadieron unas gotas de KOH 10 N para su completa disolución, ya que este compuesto precipita a pH ácido. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

La tinción se realizó partiendo de cultivos creciendo en fase logarítmica. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1 ml de agua. Después se resuspendieron en una solución de calcoflúor a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 2 veces con agua y se concentraron en un pequeño volumen para así poder observarlas en un microscopio de fluorescencia.

10.2.3 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 ADN 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 en 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 debido a que no todas las moléculas de este colorante logran penetrar en las células) en células vivas.

Para la tinción con este colorante se tomó 1 ml de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento, se lavó con 1 ml de agua y a continuación las células se resuspendieron en 20 μ l de Hoechst 33258 a 50 μ g/ml (stock disuelto en agua a 1 mg/ml). Las células permanecieron en contacto con el colorante durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con agua y se observaron al microscopio de fluorescencia a una excitación de 352 nm de longitud de onda y una emisión de 455 nm.

10.2.4 Tinción con FM4-64

Para analizar el proceso de endocitosis se empleó la tinción de células vivas con el colorante FM4-64 (Vida y Emr, 1995). El FM4-64 [dibromuro de N-(3-trietilamoniopropil)-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 a una D.O.₆₀₀ entre 0,8 y 1,0. Se tomó 1 ml de cultivo de la muestra y se centrifugó a 3.000 rpm durante 1 minuto. Después 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). Para permitir una incorporación eficiente del colorante a la membrana se mantuvieron las muestras durante 3-5 minutos en el hielo. A partir de este tiempo se pudieron observar claramente las zonas activas de endocitosis de 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 28°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), como para visualizar la membrana vacuolar (de 30 a 180 minutos a 30°C).

En todos los casos las células se observaron al microscopio de fluorescencia, este compuesto emite luz de 751 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 508 nm, tras la incubación en las condiciones adecuadas.

10.2.5 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).

Se tomó 1 ml de cultivo en fase exponencial, al cual se le añadió 1 μ l de CDCFDA (stock a 48 mM en DMSO, SIGMA). Esta muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, las células se lavaron 3 veces con 1 ml de medio de cultivo. A continuación, se resuspendieron en 1 ml de medio y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se observaron en un microscopio de fluorescencia a una excitación de 492 nm de longitud de onda y una emisión de 517 nm.

10.2.6 Microscopía confocal a tiempo real

Cuando interesó conocer las trayectorias realizadas por algunos de los componentes implicados en el tráfico vesicular dentro de las células se realizaron estudios a tiempo real de las mismas. Para poder realizarlo, se empleó un microscopio confocal Spinning-Disk Olympus IX-81. Se obtuvieron unas 100 imágenes cada 2 segundos de 3 secciones transversales de todo el volumen celular (series en z) con un grosor de 0,150 μm cada una. En algunas ocasiones las condiciones se modificaron en función de las necesidades de cada experimento, en cuyo caso serán indicadas. Dichas imágenes fueron luego procesadas mediante el uso del programa MetaMorph® asociado a este microscopio.

10.2.7 Microscopía electrónica

La microscopía electrónica se realizó sobre las células fijadas en glutaraldehído (EM Grade, SIGMA) teñidas con permanganato potásico al 2% (PanReac), deshidratadas en etanol, embebidas en resina Spurr (TAAB) y teñidas con acetato de uranilo (Konomi *et al.*, 2003). Las secciones ultrafinas se cortaron empleando un microtómo Reichert-Jung Ultracut y se observaron usando un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-100.

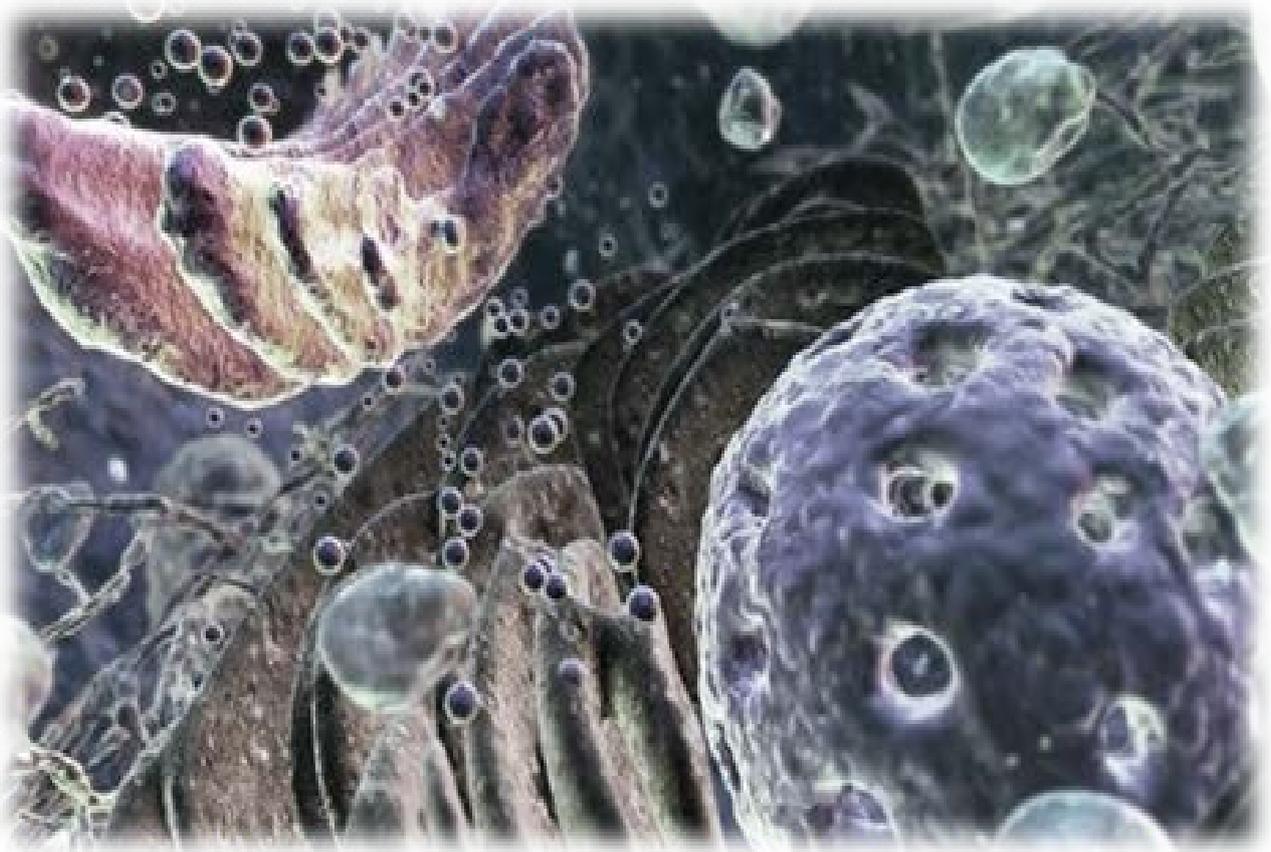
11. Análisis bioinformático de datos

Para el análisis informático de las secuencias de ADN y de proteínas, alineamiento de secuencias y mapas de restricción, se utilizaron los programas DNASTar, ClustalW y BLAST. Las secuencias de genes y proteínas se obtuvieron de la base de datos de *S. pombe* (<http://www.pombe.org>).

12. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo con el programa GraphPad Prism 6.07. La significación estadística de los resultados obtenidos se realizó los test de ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) con comparación múltiple de Dunnett.

Bibliografía



- Anand, V. C., Daboussi, L., Lorenz, T. C. & Payne, G. C.** (2009). Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 1592-1604.
- Anitei, M. & Hoflack, B.** (2011). Exit from the trans-Golgi network: from molecules to mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 443-451.
- 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**, 1450-1459.
- Arellano, M., Durán, A. & Pérez, P.** (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J* **15**, 4584-4591.
- Arellano, M., Cartagena-Lirola, H., Nasser Hajibagheri, M. A., Durán, A. & Valdivieso, M. H.** (2000). Proper ascospore maturation requires the *chs1⁺* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **35**, 79-89.
- Arighi, C. N.** (2004). Role of the mammalian retromer in sorting of the cation independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* **165**, 123-133.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K.** (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A. 3rd., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. & Pringle, J. R.** (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-951.
- Balderhaar, H. J., Arlt, H., Ostrowicz, C., Bröcker, C., Sündermann, F., Brandt, R., Babst, M. & 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**, 4085-4094.
- Barfield, R. M., Fromme, J. C. & Schekman, R.** (2009). The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 4985-4996.
- Barlowe C. K. & Miller, E. A.** (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**, 383-410.
- Bassett, D. E., Boguski, M. S. & Hieter, P.** (1996). Yeast genes and human disease. *Nature Rev* **379**, 589-590.
- Bateman, A. & Chothia, C.** (1996) Fibronectin type III domains in yeast detected by a hidden Markov model. *Curr Biol* **6**, 1544-1547.
- Behnia, R. & Munro, S.** (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597-604.
- Bendezu, F. O. & Martín, G. M.** (2010). Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol Biol Cell* **22**, 44-53.

- Betz, W. J., Mao, F. & Bewick, G. S.** (1992). Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* **12**, 363-375.
- Betz, W. J., Mao, F. & Smith, C. B.** (1996). Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 365-371.
- Bhave, M., Papinikou, E., Iyer, P., Pandya, K., Jain, B. K., Ganguly, A., Sharma, C., Pawar, K., Austin, J. 2nd., Day, K. J., Rossanese, O. W., Glick, B. S. & Bhattacharyya, D.** (2014). Golgi enlargement in Arf-depleted yeast cells is due to altered dynamics of cisternal maturation. *J Cell Sci* **127**, 250-257.
- 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**, 587-600.
- Blatch, G. L. & Lassle, M.** (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays Rev* **21**, 932-939.
- 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**, 2907-2920.
- Boehm, M. & Bonifacino, J. S.** (2002). Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene Rev* **286**, 175-186.
- 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**, 3699-3714.
- Boettner, D. R., Chi, R. J. & Lemmon, S. K.** (2012). Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Cell Biol* **14**, 2-10.
- Boman, A. L., Zhang, C. J., Zhu, X. & Kahn, R. A.** (2000). A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol Biol Cell* **4**, 1241-1255.
- Boman, A. L., Salo, P. D., Hauglund, M. J. Strand, N. L., Rensink, S. J. & Zhdankina, O.** (2002). ADP-ribosylation factor (ARF) interaction is not sufficient for yeast GGA protein function or localization. *Mol Biol Cell* **9**, 3078-3095
- Bonifacino, J. S. & Lippincott-Schwartz, J.** (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 409-414.
- Bonifacino, J. S.** (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 23-32.
- Bonifacino, J. S. & Glick, B. S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell Rev* **116**, 153-166.
- Bonifacino, J. S. & Hierro, A.** (2011). Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol Rev* **21**, 159-167.

- Bonifacino, J. S.** (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Biol Rev* **204**, 7-17.
- Bowers, K. & Stevens, T. H.** (2005). Protein transport from the late Golgi to vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta Rev* **1744**, 438-454.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bröcker, C., Engelbrencht-Vandré, S. & Ungermann, C.** (2010). Multisubunits tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr Biol Rev* **20**, 946-952.
- Brodsky, F. M.** (2012). Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 309-336.
- Bulawa, C. E.** (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol* **47**, 505-534.
- Burd, C. G. & Emr, S. D.** (1998). Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell* **2**, 157-162.
- 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.
- Carroll, S. Y., Stirling, P. C., Stimpson, H. E., 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**, 552-560.
- Cartagena-Lirola, H., Durán, A. & Valdivieso M. H.** (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* *cfr1⁺* gene participates in mating through a new pathway that is independent of *fus1⁺*. *Yeast* **23**, 375-388.
- Chapa-y-Lazo, B., Allwood, E. G., Smaczynska-de Rooij, I. I., Snape, M. L. & Ayscough, K. R.** (2014). Yeast endocytic adaptor AP-2 binds the stress sensor Mid2 and functions in polarized cell responses. *Traffic* **15**, 546-557.
- Chappell, T. G., Hajibagheri, M. A., Ayscough, K., Pierce, M. & Warren, G.** (1994). Localization of an alpha 1,2 galactosyltransferase activity to the Golgi apparatus of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **5**, 519-528.
- 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**, 6109-6117.
- Chidambaram, S., Müllers, N., Wiederhold, K., Haucke, V. & von Mollard, G.F.** (2004). Specific interaction between SNAREs and epsin N-terminal homology (ENTH) domains of epsin-related proteins in trans-Golgi network to endosome transport. *J Cell Biol* **279**, 4175-4179.
- Chidambaram, S., Zimmermann, J. & von Mollard, G. F.** (2008). ENTH domain proteins are cargo adaptors for multiple SNARE proteins at the TGN endosome. *J Cell Sci* **121**, 329-338.

- Cho, S. K. & Hofmann, S. L.** (2004). *pdf1*, a palmitoyl protein thioesterase 1 ortholog in *Schizosaccharomyces pombe*: a yeast model of infantile Batten disease. *Eukaryotic Cell* **3**, 302-310.
- 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**, 33123-33130.
- 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**, 1163-1173.
- Collins, B. M.** (2008). The structure and function of the retromer protein complex. *Traffic Rev* **9**, 1811-1822.
- Conibear, E. & Stevens, T. H.** (1998). Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 211-230.
- 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**, 1803-1815.
- Cortés, J. C. G., 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**, 4081-4096.
- Cortés, J. C. G., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A. & Ribas, J. C.** (2005). The novel fission yeast (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci* **118**, 157-174.
- Cortés, J. C. G.** (2006). Estudio de Bgs1p y Bgs4p: dos proteínas esenciales implicadas en la biosíntesis del $\beta(1,3)$ -D-glucano en *Schizosaccharomyces pombe*. *Doctoral Thesis* (Vol. 1, p. 166). Universidad de Salamanca, Spain.
- Cortés, J. C. G., Konomi, M., Martins, I. M., Muñoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., Durán, A. & Ribas, J. C.** (2007). The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol* **65**, 201-217.
- Cortés, J. C. G., Sato, M., Muñoz, J., Moreno, M. B., Clemente-Ramos, J. A., Ramos, M., Okada, H., Osumi, M., Durán, A. & Ribas, J. C.** (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol* **198**, 637-656.
- Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S. D. & Payne G. S.** (2001). Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol Biol Cell* **12**, 1885-1896.
- Costaguta, G., Duncan, M. C., Fernández, G. E., Huang, G. H. & Payne, G. S.** (2006). Distinct roles for TGN/endosome epsin-like adaptors Ent3p and Ent5p. *Mol Biol Cell* **17**, 3907-3920.
- Cullen, P. J. & Korswagen, H. C.** (2012). Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Rev Cell Biol* **14**, 29-37.

- Daboussi, L., Costaguta, G. & Payne, G. S.** (2012). Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **14**, 239-248.
- Dallies, N., Francois, J. & Paquet, V.** (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1297-1306.
- Dancourt, J. & Barlowe, C.** (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem* **79**, 777-802.
- De Camillia, P., Chena, H., Hymanc, J., Panepuccia, E., Batemand, A., Axel, T. & Brungera, A. T.** (2002). The ENTH domain. *FEBS Lett Rev* **513**, 11-18.
- de León, N., Sharifmoghadam, M. R., Hoya, M., Curto, M. A., Doncel, C. & Valdivieso M. H.** (2013). Regulation of cell wall synthesis by the clathrin light chain is essential for viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **8**, e71510.
- de León, N., Hoya, M., Curto, M. A., Moro, S., Yanguas, F., Doncel, C. & Valdivieso M. H.** (2016). The AP-2 complex is required for proper temporal and spatial dynamics of endocytic patches in fission yeast. *Mol Microbiol* **100**, 409-424.
- de León, N. & Valdivieso, M. H.** (2016). The long life of an endocytic patch that misses AP-2. *Curr Gen*. En prensa.
- De Matteis, M. A. & Luini, A.** (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 273-284.
- de Medina-Redondo, M., Arnáiz-Pita, Y., Fontaine, T., del Rey, F., Latgé, J. P. & Vázquez de Aldana, C. R.** (2008). The beta-1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **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). $\beta(1,3)$ -glucanosyl-transferase activity is essential for cell wall integrity and viability of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **5**, e14046.
- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. C., Hartnell, L. M. & Bonifacino J. S.** (2000). GGAs: A family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* **149**, 81-93.
- Dell'Angelica, E. C.** (2009). AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 552-559.
- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J. & Kornfeld, S.** (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* **297**, 1700-1703.
- Douglas, C. M.** (2001). Fungal $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Med Mycol* **39**, 55-66.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B. & Schekman, R.** (1994). Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J Biol Chem* **269**, 24486-24495.

- Dueñas-Santero, E., Martín-Cuadrado, A. B., Fontaine, T., Latgé, J. P., del Rey, F. & Vázquez de Aldana C. R.** (2010). Characterization of glycoside hydrolase family 5 proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* **9**, 1650-1660.
- 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**, 77-81.
- Durán, A. & Pérez, P.** (2004). Cell wall synthesis: Egel, R. (Ed.), *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer, New York, 269-279.
- Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y.** (2003). Fission yeast synaptobrevin is involved in cytokinesis and cell elongation. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 641-645.
- Epp, N., Rethmeier, R., Krämer, L. & Ungermann, C.** (2011). Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *Eur J Cell Biol* **90**, 779-785.
- Estravís, M., Rincón, S. A., Santos, B. & Pérez, P.** (2011). Cdc42 regulates multiple membrane traffic events in fission yeast. *Traffic* **12**, 1744-1758.
- 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**, 1011-1023.
- Faini, M., Beck, R., Wieland, F. T. & Briggs, J. A.** (2013). Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol Rev* **23**, 279-288.
- 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**, 615-626.
- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans P. R. & McMahon H. T.** (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 631-666.
- 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**, 573-579.
- Foury, F. & Kucej, M.** (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* **6**, 106-111.
- Franzusoff, A., Redding, K., Crosby, J., Fuller, R. S. & Schekman, R.** (1991). Localization of components involved in protein transport and processing through the yeast Golgi apparatus. *J Cell Biol* **112**, 27-37.
- 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**, 526-540.
- 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.

- García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T. & Sánchez, Y.** (2006a). Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol* **59**, 836-853.
- García, P., Tajadura, V., García, I. & Sánchez, Y.** (2006b) Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* **23**, 1031-1043.
- Gemmill, T. R. & Trimble, R. B.** (2004). Protein glycosilation: Egel, R. (Ed.), *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer, New York, 405-515.
- Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J. & Kornfeld, S.** (2003). Mammalian GGAs act together to sort mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* **163**, 755-766.
- Gillingham, A. K. & Munro, S.** (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 579-611.
- 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**, 871-883.
- Golub, E. I.** (1988). 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **16**, 1641.
- Grün, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P. & Vliegenthart, J. F.** (2005). The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiol* **15**, 245-257.
- Guo, Y., Sirkis, D. W. & Schekman R.** (2014). Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annu Rev Cell Dev Bio* **30**, 169-206.
- Ha, S. A., Torabinejad, J., DeWald, D. B., Wenk, M. R., Lucast, L., De Camilli, P., Newitt, R. A., Aebersold, R. & 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**, 1319-1333.
- Harlow, D. E.** (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- He, X., Li, F., Chang, W. P. & Tang, J.** (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem* **12**, 11696-11703.
- 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**, 1129-1133.
- Hedges, S. B.** (2002). The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* **3**, 838-849.
- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D. & Hubbard, A.** (1983). Endosomes. *Trends Biochem Sci* **8**, 245-250.
- 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**, 1281-1284.

- Henne, W. M., Buchkovich, N. J. & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell* **21**, 77-91.
- Hirst, J. & Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 173-193.
- Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N. & Robinson, M. S. (2000). A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **149**, 68-79.
- Hirst, J., Motley, A., Harasaki, K., Chew, S. Y. & Robinson, M. S. (2003). EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell* **14**, 625-641.
- Hirst, J., Miller, S. E., Taylor, M. J., von Mollard, G. F. & Robinson, M. S. (2004). EpsinR is an adaptor for the SNARE protein Vti1b. *Mol Biol Cell* **15**, 5593-5602.
- Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N., Dacks, J. B. & Robinson, M. S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol* **9**, e1001170.
- Hirst, J., Borner, G. H., Antrobus, R., Peden, A. A., Hodson, N. A., Sahlender, D. A. & Robinson, M. S. (2012). Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the "knocksideways" system. *Curr Biol* **22**, 1711-1716.
- Hirst, J., Irving, C. & Borner, G. H. (2013). Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. *Traffic* **14**, 153-164.
- Hirst, J., Schlacht, A., Norcott, J. P., Traynor, D., Bloomfield, G., Antrobus, R., Kay, R. R., Dacks, J. B. & Robinson, M. S. (2014). Characterization of TSET, an ancient and widespread membrane trafficking complex. *eLife* **3**, e02866.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J. & Klausner, R. D. (1998). Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9161-9166.
- Holthuis, J. C., Nichols, B. J. & Pelham, H. R. (1998). The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol Biol Cell* **9**, 3383-3397.
- Hong, W. & Lev, S. (2014). Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol Rev* **24**, 35-43.
- Horisberger, M., Vonlanthen, M. & Rosset, J. (1978). Localization of α -galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* **119**, 107-111.
- Hsu, V. W. & Yang, J. S. (2009). Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett* **583**, 3758-3763.
- Hsu, V. W. & Prekeris, R. (2010). Transport at the recycling endosome. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 528-534.
- 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**, 899-910.

- 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**, 16657-16661.
- 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.
- Hung, C. W., Aoh, Q. L., Joglekar, A. P., Payne, G. S. & Duncan M. C. (2012). Adaptor autoregulation promotes coordinated binding within clathrin coats. *J Biol Chem* **287**, 17398-17407.
- Huotari, J. & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J Rev* **30**, 3481-3500.
- Huranova, M., Muruganandam, G., Weiss, M. & Spang, A. (2016). Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Reports* **17**, 202-219.
- Huyton, T., Bates, P. A., Zhang, X., Sternberg, M. J. & Freemont P. S. (2000). The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutat Res* **460**, 319-332.
- 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.
- 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.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- Iwaki, T., Hosomi, A., Tokudomi, S., Kusunoki, Y., Fujita, Y., Giga-Hama, Y. & Takegawa, K. (2006). Vacuolar protein sorting receptor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiol* **152**, 1523-1532.
- Iwaki, T., Masayuki, O., Masaru, I., Kita, A., Sugiura, R., Giga-Hama, Y., Fukui, Y. & Takegawa, K. (2007). Essential roles of class E Vps proteins for sorting into multivesicular bodies in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiol* **153**, 2753-2764.
- Jensen, D. & Schekman, R. (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J Cell Sci* **124**, 1-4.
- Jungmann, J. & Munro, S. (1998). Multi-protein complexes in the *cis* Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J* **17**, 423-434.
- 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 Rep* **8**, 743-748.
- Kaksonen, M., Toret, C. P., & Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**, 305-320.

- 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.
- 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**, 419-428.
- Kirchhausen, T. & Harrison, S. C.** (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* **23**, 755-761.
- Kita, A., Sugiura, R., Shoji, H., He, Y., Deng, L., Lu, Y. & Kuno, T.** (2004). Loss of Apm1, the μ 1 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**, 2920-2931.
- Kita, A., 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**, 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**, 561-574.
- Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T. & Osumi, M.** (2003). Characterization and behaviour of α -glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast* **20**, 427-438.
- 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.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A.** (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**, 367-382.
- Kushner, S. R.** (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafer, E. M.** (2002). Clathrin-protein interactions. *Traffic Rev* **3**, 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**, 997-1009.
- Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R. & André, B.** (2010). The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol Rev* **20**, 196-204.
- Lemmon, S. K. & Jones, E. W.** (1987). Clathrin requirement for normal growth of yeast. *Science* **238**, 504-509.

- Lemmon, S. K. & Traub, L. M.** (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 457-466.
- Leto, D. & Saltiel, A. R.** (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 383-396.
- Leupold, U.** (1950). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol.* **24**, 381-480.
- Lewis, M. J. & Pelham, H. R.** (1992). Sequence of a second human KDEL receptor. *J Mol Biol* **226**, 913-916.
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. & Pelham, H. R.** (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**, 23-38.
- Liu, J., Wang, H., McCollum, D. & Balasubramanian, M. K.** (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **153**, 1193-1203.
- 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**, 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**, 989-1000.
- 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**, 3526-3535.
- Liu, J., Sun, Y., Drubin, D. G. & Oster, G. F.** (2009). The mechanochemistry of endocytosis. *PLoS Biol* **7**, e1000204.
- Liu, T. T., Gómez, T. S., Sackey, B. K., Billadeaub, D. D. & Burd, C. G.** (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell* **23**, 2505-2015.
- Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J. & Glick, B. S.** (2006). Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**, 1002-1006.
- Lui, W. W., Collins, B. M., Hirst, J., Motley, A., Millar, C., Schu, P., Owen D. J. & Robinson M. S.** (2003). Binding partners for the COOH-terminal appendage domains of the GGAs and gamma-adaptin. *Mol Biol Cell* **14**, 2385-2398.
- 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**, 1015-1028.
- MacGurn, J. A., Hsu, P. C. & Emr, S. D.** (2012). Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem* **81**, 231-259.

- 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**, 202–222.
- 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**, 2936-2948.
- 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.
- 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.
- Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A. & Sánchez, Y.** (2003). Bgs3p, a putative 1,3- β -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **2**, 159-169.
- Martín-García, R., Durán, A. & Valdivieso, M. H.** (2003). In *Schizosaccharomyces pombe* chs2p has no chitin synthase activity but is related to septum formation. *FEBS Lett* **549**, 176-180.
- Martín-García, R. & Valdivieso, M. H.** (2006). The fission yeast Chs2 protein interacts with the type-II myosin Myo3p and is required for the integrity of the actomyosin ring. *J Cell Sci* **119**, 2768-2779.
- Martín-García, R., de León, N., Sharifmoghadam, M. R., Curto, M. A., 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**, 2907-2917.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. & Nakano, A.** (2006). Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**, 1007-1010.
- 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**, 4235-4246.
- Mazur, P., 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**, 5671-5681.
- McGough, I. J. & Cullen, P. J.** (2011). Recent advances in retromer biology. *Traffic Rev* **12**, 963-971.
- 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.
- Misra, S. & Hurley, J. H.** (1999). Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* **97**, 657-666.

- Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino J. S. & Hurley J. H. (2002). Structural basis for acidic-cluster dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* **415**, 933-937.
- Miyatake, M., Kuno, T., Kita, A., Katsura, K., Takegawa, K., Uno, S., Nabata, T. & Sugiura, R. (2007). Valproic acid affects membrane trafficking and cell-wall integrity in fission yeast. *Genetics* **175**, 1695-1705.
- 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**, 605-645.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. & Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* **162**, 909-918.
- Mukaiyama, H., Iwaki, T., Idiris, A. & Takegawa, K. (2011). Processing and maturation of carboxypeptidase Y and alkaline phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 203-213.
- 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 Cytoskeleton* **63**, 149-161.
- 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**, 3868-3878.
- Muñiz, M. & Zurzolo, C. (2014). Sorting of GPI-anchored proteins from yeast to mammals--common pathways at different sites? *J Cell Sci* **127**, 2793-2801.
- Muñoz, J., Cortés, J. C. G., Sipiczki, M., Ramos, M., Clemente-Ramos, J. A., Moreno, M. B., Martins, I. M., Pérez, P. & Ribas, J. C. (2013). Extracellular cell wall $\beta(1,3)$ glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J Cell Biol* **203**, 265-282.
- Nakamura, T., Nakamura-Kubo, M., Hirata, A. & Shimoda C. (2009). 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**, 3955-3972.
- Nakayama, K. & Wakatsuki, S. (2003). The structure and function of GGAs, the traffic controllers at the TGN sorting crossroads. *Cell Struct Funct Rev* **28**, 431-442.
- 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**, 3552-3566.
- 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**, 3412-3420.
- Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron Rev* **29**, 207-233.

- 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.
- Owen, D. J., Collins, B. M. & Evans, P. R.** (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 153-191.
- Paczkowski, J. E., Richardson, B. C., Strassner, A. M. & Fromme, J. C.** (2012). The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J* **31**, 4191-4203.
- Paczkowski, J. E. & Fromme, J. C.** (2014). Structural basis for membrane binding and remodeling by the exomer secretory vesicle cargo adaptor. *Dev Cell* **30**, 610-624.
- Paczkowski, J. E., Richardson, B. C. & Fromme, J. C.** (2015). Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol Rev* **25**, 408-416.
- Page, L. J., Sowerby, P. J., Lui, W. W. & Robinson, M. S.** (1999). Gamma-synergin: an EH domain-containing protein that interacts with gamma-adaptin. *J Cell Biol* **146**, 993-1004.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 867.
- Papanikou, E., Day, K. J., Austin, J. & Glick, B. S.** (2015) COPI selectively drives maturation of the early Golgi. *eLife* **4**, e13232.
- Park, S. Y. & Guo, X.** (2014). Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep* **34**, 381-390.
- Payne, G. S. & Schekman, R.** (1985). A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science* **230**, 1009-1014.
- 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**, 3888-3898.
- Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C.** (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**, 889-901.
- Pérez, P. & Ribas, J. C.** (2004). Cell wall analysis. *Methods* **33**, 245-251.
- Pérez, P. & Rincón, S. A.** (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J Rev* **426**, 243-253.
- Poole, R. K. & Lloyd, D.** (1972) Effect of 2-deoxy-D-glucose on growth and cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Arc Microbiol* **88**, 257-272.
- Popoff, V., Adolf, F., Brügger, B. & Wieland, F.** (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005231.
- Poupon, V., Girard, M., Legendre-Guillemin, 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**, 168-173.
- Prescianotto-Baschong, C. & Riezman, H.** (1998). Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **9**, 173-189.

- Puertollano, R., Randazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M. & Bonifacino, J. S.** (2001). The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* **105**, 93-102.
- Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latgé, J. P. & Polopo L.** (2007). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* **24**, 297-308.
- Reggiori, F. & Pelham, H. R.** (2002). A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol* **4**, 117-123.
- 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**, 3103-3116.
- Reider, A. & Wendland, B.** (2011). Endocytic adaptors--social networking at the plasma membrane. *J Cell Sci* **124**, 1613-1622.
- Ribas, J. C., Díaz, M., Durán, A. & Pérez, P.** (1991). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3)beta-D-glucan. *J Bacteriol* **173**, 3456-3462.
- Richardson, B. C. & Fromme, J. C.** (2013). The exomer cargo adaptor features a flexible Hinge domain. *Structure* **21**, 486-492.
- Risselada, H. J. & Grubmüller, H.** (2012). How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 187-196.
- Ritz, A. M., Trautwein, M., Grassinger, F. & Spang, A.** (2014). The prion-like domain in the exomer-dependent cargo Pin2 serves as a trans-Golgi retention motif. *Cell Rep* **7**, 249-260.
- Roberts, C. J., Raymond, C. K., Yamashiro, C. T. & Stevens, T. H.** (1991). Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol* **194**, 644-661.
- Robinson, M. S. & Bonifacino, J. S.** (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 444-453.
- Robinson, M. S.** (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol Rev* **14**, 167-174.
- Robinson, D. G. & Pimpl, P.** (2014). Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci Rev* **19**, 134-139.
- Rockenbauch, U., Ritz, A. M., Sacristán, C., Roncero, C. & Spang, A.** (2012). The complex interactions of Chs5p, the ChAPs and the cargo Chs3p. *Mol Biol Cell* **23**, 4402-4415.
- Roncero, C., Sánchez-Díaz, A. & Valdivieso, M. H.** (2016). Chitin synthesis and fungal cell morphogenesis. In *The Mycota vol III. Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd Edition, (ed D. Hoffmeister), 167-190. Heidelberg: Springer.
- Rothstein, R. J.** (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 202-211.

- Rusten, T. E., Vaccari, T. & Stenmark, H.** (2012). Shaping development with ESCRTs. *Nat Rev Cell Biol* **14**, 38-45.
- Sacristán, C., Manzano-López, J., Reyes, A., Spang, A., Muñiz, M. & Roncero, C.** (2013). Oligomerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol Microbiol* **90**, 252-266.
- Sambrook, J. & Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 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**, 4157-4166.
- Sánchez-Mir, L., Franco, A., Martín-García, R., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Soto T., Gacto, M., Pérez, P. & Cansado, J.** (2014). Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity mitogen- activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **34**, 2745-2759.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Sankaran, V. G., Klein, D. E., Sachdeva, M. M. & Lemmon, M. A.** (2001). High-affinity binding of a FYVE domain to phosphatidylinositol 3-phosphate requires intact phospholipid but not FYVE domain oligomerization. *Biochem* **40**, 8581-8587.
- Santiago-Tirado, F. H. & Bretscher, A.** (2011). Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol Rev* **21**, 515-525.
- Santos, B., Durán, A. & Valdivieso, M. H.** (1997). *CHS5*, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 2485-2496.
- Santos, B. & Snyder, M.** (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* **136**, 95-110.
- Santos, B. & Snyder, M.** (2003). Specific protein targeting during cell differentiation: polarized localization of Fus1p during mating depends on Chs5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **2**, 821-825.
- 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**, 3605-3616.
- Scott, P. M., Bilodeau, P. S., Zhdankina, O., Winistorfer, S. C., Hauglund, M. J., Allaman, M. M., Kearney, W. R., Robertson, A. D., Boman, A. L. & Piper, R. C.** (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **6**, 252-259.
- Scott, C. C. & Gruenberg, J.** (2010). Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start. *Bioessays* **33**, 103-110.
- Scott, C. C., Vacca, F. & Gruenberg, J.** (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Cell Dev Biol Rev* **31**, 2-10.

- Seaman, M. N.** (2005). Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol Rev* **15**, 68-75.
- Sengupta, D. & Linstedt, A. D.** (2011). Control of organelle size: the Golgi complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 57-77.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. & Fink, G. R.** (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**, 689-693
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y.** (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-909.
- 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**, 11070-11079.
- Sharifmoghadam, M. R., Curto, M. A., Hoya, M., de León, N., Martín-García, R., Doncel, C. & Valdivieso, M. H.** (2012). The integrity of the cytokinesis machinery under stress conditions requires the glucan synthase Bgs1p and its regulator Cfh3. *PLoS One* **7**, e42726.
- Shiba, Y., Takatsu, H., Shin, H. W. & Nakayama, K.** (2002). Gamma-adaptin interacts directly with Rabaptin-5 through its ear domain. *J Biochem* **131**, 327-336.
- Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Yoshino, K., Takatsu, H., Kobayashi, H., Shin, H. W., Wakatsuki, S. & Nakayama, K.** (2004). GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. *J Biol Chem* **279**, 7106-7111.
- Shin, H. W. & Nakayama, K.** (2004). Dual control of membrane targeting by PtdIns(4)P and ARF. *Trends Biochem Sci* **29**, 513-515.
- Sietsma, J. H. & Wessels, J. G.** (1990). The occurrence of glucosaminoglycan in the wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Microbiol* **136**, 2261-2265.
- 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**, 1437-1449.
- Sipiczki, M.** (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* **1**.
- Solinger, J. A. & Spang, A.** (2013). Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *FEBS J* **280**, 2743-2757.
- Spang, A.** (2009a). On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 531-536.
- Spang, A.** (2009b). On the fate of early endosomes. *Biol Chem* **390**, 753-759.
- Spang, A.** (2015). The road not taken: less traveled roads from the TGN to the plasma membrane. *Membranes* **5**, 84-98.
- Spasic, D., Raemaekers, T., Dillen, K., Declerck, I., Baert, V., Serneels, L., Füllekrug, J. & 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**, 629-640.

- Stahelin, R. V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K. S., Murray, D. & Cho, W.** (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J Biol Chem* **277**, 26379-26388.
- Steinmetz, K. L.** (2002). Colesevelam hydrochloride. *Am J Health Syst Pharm* **59**, 932-939.
- Stimpson, H. E., 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**, 4640-4651.
- 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**, 4694-4706.
- Suda, Y. & Nakano, A.** (2012). The yeast Golgi apparatus. *Traffic Rev* **13**, 505-510.
- 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**, 237-242.
- Tabuchi, M., Iwaihara, O., Ohtani, Y., Ohuchi, N., Sakurai, J. I., Morita, T., Iwahara, S. & Takegawa, K.** (1997). Vacuolar protein sorting in fission yeast: cloning, biosynthesis, transport, and processing of carboxypeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **179**, 4179-4189.
- 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**, 3053-3060.
- 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**, 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**, 420-422.
- 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.
- Valdivieso, M. H., Durán, A. & Roncero, C.** (2004). Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In *The Mycota vol III. Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd Edition, (eds R. Brambl and G. A. Marzluf), 275-290. Heidelberg: Springer.

- VerPlank, L. & Li, R.** (2005). Cell cycle-regulated trafficking of Chs2 controls actomyosin ring stability during cytokinesis. *Mol Biol Cell* **16**, 2529-2543.
- Vida, T. A. & Emr, S. D.** (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-792.
- Wakana, Y., van Galen, J., Meissner, F., Scarpa, M., Polishchuk, R. S., Mann, M. & Malhotra, V.** (2012). New class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *EMBO J* **31**, 3976-3990.
- Wan, L., Molloy, S. S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S. L. & Thomas, G.** (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* **94**, 205-216.
- 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**, 515-529.
- Wang, J., 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**, 891-901.
- 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**, 973-983.
- Ward, T. H., Polishchuk, R. S., Caplan, S., Hirschberg, K. & Lippincott-Schwartz, J.** (2001). Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J Cell Biol* **155**, 557-570.
- Weinberg, J. & Drubin, D. G.** (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol Rev* **22**, 1-13.
- Whittle, J. 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**, 347-361.
- 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**, 32870-32879.
- Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenon, M. L., Connolly, M. L. & Lerner, R. A.** (1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* **37**, 767-778.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.
- 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**, 850-856.
- 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**, 1101-1110.

Yeung, B. G., Phan, H. L. & Payne, G. S. (1999). Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 3643-3659.

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**, 565-576.

Yu, I. M. & Hughson, F. M. (2010). Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Ann Rev Cell Dev Bio* **26**, 137-156.

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**, e45324.

Yu, Y., 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**, e68488.

Zaitsevskaya-Carter, T. & Cooper, J. A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J* **16**, 1318-1331.

Zahner, J. E. Harkins, H. A. & Pringle, J. R. (1996). Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 1857-1870.

Zhang, X., Moréra, S., Bates, P. A., Whitehead, P. C., Coffey, A. I., Hainbucher, K., Nash, R. A., Sternberg, M. J., Lindahl, T. & Freemont, P. S. (1998). Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *EMBO J* **17**, 6404-6411.

Zhang, Z., Kulkarni, K., Hanrahan, S. J., Thompson, A. J. & Barford, D. (2010). The APC/C subunit Cdc16/Cut9 is a contiguous tetratricopeptide repeat superhelix with a homo-dimer interface similar to Cdc27. *EMBO J* **29**, 3733-3744.

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**, 1-18.

Zhou, C., Yang, Y. & Jong, A. Y. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173.

Ziman, M., Chuang, J. S. & Schekman, R. W. (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**, 1909-1919.

Ziman, M., Chuang, J. S., Tsung, M., Hamamoto, S. & Schekman, R. (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 1565-157.