



**Instituto de Biología  
Funcional y Genómica**

# **Análisis funcional de mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* con alteraciones en tráfico vesicular**

**Functional analysis of *S. pombe* mutants with vesicular  
traffic defects**

**Autora: Sara García Dosil**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO  
Universidad de Salamanca  
Junio de 2018**

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

## RESUMEN

## INTRODUCCIÓN..... 1

1. *Schizosaccharomyces pombe*..... 1
2. La pared celular..... 1
  - 2.1.  $\alpha$ (1,3)-glucano..... 2
  - 2.2.  $\beta$ -glucanos..... 3
  - 2.3. Galactomanano..... 3
3. El tráfico vesicular..... 4
  - 3.1. El sistema de endomembranas..... 4
  - 3.2. Proteínas de cubierta..... 5
    - 3.2.1. Las vesículas cubiertas por clatrina..... 6
    - 3.2.2. El retrómero..... 6
    - 3.2.3. La maquinaria ESCRT..... 7

## ANTECEDENTES..... 7

## OBJETIVOS..... 8

## MATERIALES Y MÉTODOS..... 9

1. Medios de cultivo para *S. pombe*..... 9
2. Condiciones y evaluación del crecimiento de cepas de *S. pombe*..... 10
  - 2.1. Condiciones de cultivo para el crecimiento de *S. pombe*..... 10
  - 2.2. Ensayos de crecimiento en gota..... 10
  - 2.3. Crecimiento de *S. pombe* en condiciones de cultivo especiales..... 10
3. Realización de cruces genéticos..... 11
  - 3.1. Conjugación..... 11
  - 3.2. Aislamiento de las ascosporas..... 11
  - 3.3. Reacción en cadena de la polimeras (PCR)..... 12
4. Transformación..... 12
5. Obtención de imágenes mediante microscopía de fluorescencia..... 12
  - 5.1. Fluorescencia directa con GFP..... 12
  - 5.2. Tinción con Hoechst 33258..... 13
  - 5.3. Tinción con calcoflúor white..... 13

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
1. Estudio y análisis de mutantes que tienen alterada la ruta transGolgi- Endosoma-Vacuola.....	14
1.1. Análisis morfológico mediante tinción Hoechst en condiciones basales.....	14
1.2. Estudio del crecimiento y morfología de <i>ent3Δ</i> , <i>gga22Δ</i> y <i>ent3Δ gga22Δ</i> en diferentes condiciones de estrés.....	15
1.2.1. Respuesta ante estrés salino.....	15
1.2.2. Respuesta ante estrés térmico.....	16
1.2.3. Respuesta ante inhibidores de la síntesis proteica.....	16
1.2.4. Respuesta ante fármacos antifúngicos.....	16
1.3. Estudio de la pared celular en el mutante <i>ent3Δ gga22Δ</i> .....	17
1.3.1. Análisis de la pared celular mediante tinción con calcoflúor en condiciones basales.....	17
1.3.2. Estudio de la distribución de la glucán sintasa Bgs4.....	19
2. Estudio y análisis de mutantes del ESCRT y del retrómero.....	20
2.1. Análisis morfológico mediante tinción Hoechst en condiciones basales.....	20
2.2. Estudio del crecimiento y la morfología de <i>vps27Δ</i> , <i>vps35Δ</i> y <i>vps27Δ vps35Δ</i> en diferentes condiciones de estrés.....	21
2.2.1. Respuesta ante estrés salino.....	21
2.2.2. Respuesta ante estrés térmico.....	23
2.2.3. Respuesta antes fármacos antifúngicos.....	23
2.3. Estudio morfológico de la vacuola y del compartimento prevacuolar.....	24
2.3.1. Utilización de la construcción 41xUb-GFP-Cps1.....	24
2.3.2. Utilización del plásmido integrativo Ub-GFP-Cps1.....	24
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>28</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>29</b>

# ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

<b><math>\alpha</math>GS</b>	$\alpha$ -glucán sintasa
<b><math>\beta</math>GS</b>	$\beta$ -glucán sintasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AP</b>	Proteína adaptadora ( <u>A</u> daptor polypeptide)
<b>COP</b>	<i>Coatomer protein</i>
<b>CMV</b>	Cuerpo multivesicular
<b>CW</b>	Calcoflúor white
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>EE</b>	Endosoma temprano ( <i>Early endosome</i> )
<b>ESCRT</b>	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green fluorescent protein</i> )
<b>GGA</b>	<i>Golgi-localized, gamma-ear-containing, arf-binding protein</i>
<b>GTPasa</b>	Guanosín trifosfato (GTP) hidrolasa
<b>Leu</b>	Leucina
<b>MM</b>	Medio mínimo para <i>S. pombe</i> ( <i>Minimal media</i> )
<b>MP</b>	Membrana plasmática
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
<b>SNX</b>	Sorting nexins
<b>SP</b>	Septo primario
<b>SS</b>	Septo secundario
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>WT</b>	Estirpe silvestre ( <i>Wild type</i> )
<b>YES</b>	Medio rico para <i>S. pombe</i> ( <i>Yeast extract + supplements</i> )

## ABSTRACT

The transport of proteins and lipids between distinct cellular compartments is essential for the cell integrity and behaviour. This traffic is mediated by the vesicle coat proteins, such as clathrin, the clathrin adaptors, the ESCRT machinery and the retromer. In this work we carried out a functional analysis of six *S. pombe* mutants that do not express proteins implicated in vesicular traffic. We used microscopy and growth essays to study the maintenance of the cell wall, septum formation and cellular division. Our results show that two of the proteins, Ent3 and Gga22, are essential for the integrity of the cell wall in standard and stress conditions, and that two other proteins, Vps27 and Vps35, are necessary for the transport of cargos to the vacuole and for cell growth in media supplemented with some ions.

## RESUMEN

El transporte de proteínas y lípidos entre los diferentes orgánulos de la célula es un proceso esencial para su integridad y correcto funcionamiento. Este tráfico está mediado por las proteínas de las cubiertas vesiculares, tales como la clatrina, los adaptadores de clatrina, el ESCRT y el retrómero. En este trabajo se ha realizado un estudio funcional de seis mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* que no producen diferentes proteínas implicadas en el transporte vesicular. Para ello, se han utilizado ensayos de crecimiento en placa y análisis por microscopía para estudiar la morfología de la pared celular, la formación del septo y el proceso de división celular. Los resultados obtenidos han permitido saber que dos de las proteínas, Ent3 y Gga22, son necesarias para el mantenimiento de la pared tanto en condiciones normales como de estrés salino, y que otras dos proteínas, Vps27 y Vps35, son necesarias para el transporte de cargos hasta la vacuola y para el crecimiento en presencia de algunos iones.

# INTRODUCCIÓN

## 1. *Schizosaccharomyces pombe*

El organismo utilizado para la realización de este trabajo ha sido la levadura de fisión *S. pombe*. Estos organismos unicelulares tienen forma cilíndrica, son haploides y se dividen por fisión.

Cuando una célula alcanza el tamaño adecuado se forma el septo y se divide en dos células hijas que cuando alcanzan el mismo tamaño volverán a dividirse. Podemos diferenciar tres tipos sexuales: dos estirpes heterotálicas  $h^+$  y  $h^-$ , y una estirpe homotálica  $h^{90}$  (cuyas células cambian de sexo cada dos generaciones). Cuando se dejan crecer en ausencia de nitrógeno, las células de ambos sexos conjugan y dan lugar a una célula diploide inestable, la cual esporula rápidamente dando lugar a un asca zigótica que contiene 4 ascosporas haploides.

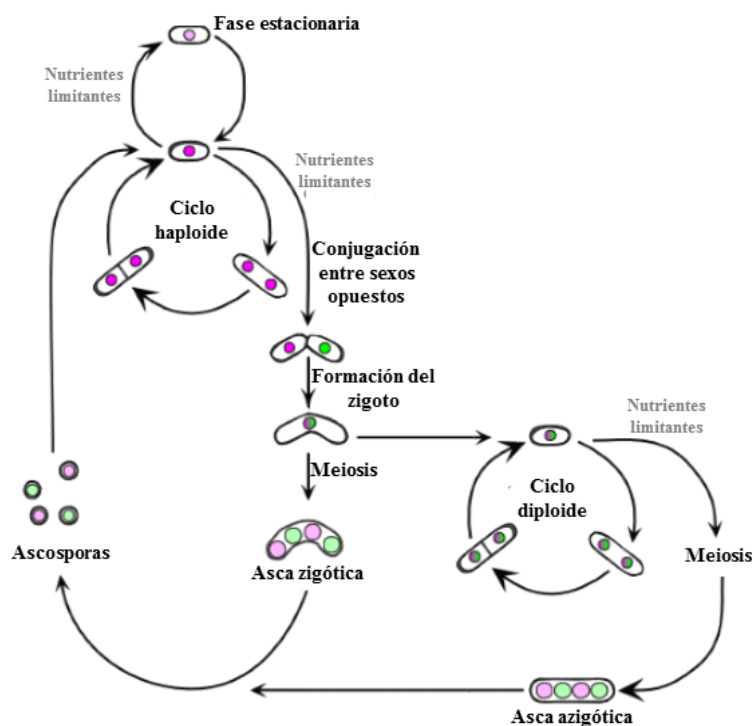


FIGURA 1. Esquema del ciclo de vida de *S. pombe*.

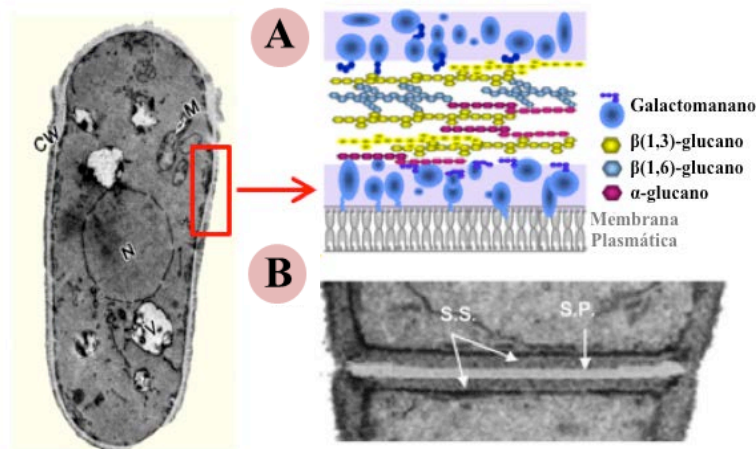
Las ascas se liberan por dehiscencia, germinando cuando las condiciones ambientales son favorables. El ciclo de vida de *S. pombe* está representado en la **Figura 1**.

*S. pombe* es un buen modelo de estudio y se utiliza frecuentemente en ciencia porque algunos de sus procesos biológicos son similares a los de las células eucariotas superiores. Además no es un organismo patógeno, su fase de crecimiento es rápida y es fácil de manipular genéticamente en el laboratorio pudiéndose obtener diferentes mutantes para su estudio.

## 2. La pared celular

La pared celular es una estructura externa a la membrana plasmática que protege a las células de la lisis osmótica y daños mecánicos. Es una estructura esencial para hongos y levaduras y, al no estar presente en células animales, es una buena diana en diseño de fármacos antifúngicos. La pared celular es plástica y dinámica pero al mismo tiempo aporta rigidez, lo cual es fundamental para

mantener la integridad de la célula ante medios osmóticamente inadecuados. Estas características hacen que la pared sea un elemento morfogenético clave en las células de *S. pombe*, facilitando que



**FIGURA 2. La pared celular de *S. pombe*.** (A) Representación esquemática de los componentes que conforman la pared celular. (B) Imagen tomada con microscopía electrónica del septo primario (S.P.) y del septo secundario (S.S.).

las células adopten con la forma más adecuada en cada momento. Esto se consigue mediante la coordinación entre el ciclo celular, el crecimiento y procesos continuados de síntesis y degradación de esta estructura.

En la levadura de fisión la pared está formada por tres componentes mayoritarios:  $\alpha$ (1,3)-glucano (un 18-28% del total),  $\beta$ -glucanos (46-54%) y galactomanano (9-14%)

(Ishiguro, 1998). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* la estructura es similar pero presenta quitina, componente que hasta el momento no se ha detectado en *S. pombe*. Estos tres componentes forman una estructura formada por tres capas que están esquematizadas en la **Figura 2A**, la externa e interna están constituidas por galactomanano y la intermedia por  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucanos.

El septo de división es una estructura muy organizada generada por la actividad de las enzimas Ags1, Bgs1, Bgs3 y Bgs4. Está formada por una capa intermedia denominada septo primario y por dos capas externas que son los septos secundarios (**Figura 2B**). La división celular se produce por la digestión del septo primario mediante la actividad de  $\beta$ (1,3)-glucanasas específicas y, finalmente, se obtienen dos células hijas que tendrán en su pared el septo secundario (Humbel et al., 2001). También se sabe que el septo primario está constituido fundamentalmente por  $\alpha$ (1,3)-glucanos y  $\beta$ (1,3)-glucanos y, que el septo secundario tiene la misma composición que el resto de la pared celular.

## 2.1. $\alpha$ (1,3)-glucano

Está formado por residuos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ (1,3) con una pequeña proporción de enlaces  $\alpha$ (1,4). Constituye casi un tercio de la pared celular en *S. pombe* y es un polímero que no está presente en la pared de *S. cerevisiae*. La enzima que sintetiza el  $\alpha$ (1,3)-glucano es la  $\alpha$ -glucán sintasa Ags1. Esta enzima se encuentra en los polos y en la zona de la célula donde se formará el septo de división (Muñoz et al., 2013). Cuando esta enzima está ausente se obtienen células con

septos deformes y con problemas para la separación de las células hijas, por lo que se puede considerar una proteína fundamental para la formación del septo primario y secundario (Cortés et al., 2012).

## 2.2. $\beta$ -glucanos

Representan hasta el 54% de los componentes de la pared celular y se pueden diferenciar tres tipos diferentes:  $\beta(1,3)$ -glucano lineal,  $\beta(1,3)$ -glucano con ramificaciones y  $\beta(1,6)$ -glucano.

- **$\beta(1,3)$ -glucano lineal:** Está formado por monómeros de  $\beta(1,3)$ -glucano sin ramificaciones. Está presente fundamentalmente en el septo primario y también en pequeñas cantidades en el resto de la pared celular (Cortés et al., 2007).
- **$\beta(1,3)$ -glucano con ramificaciones:** Este polímero presenta cadenas lineales de glucosa con ramificaciones en  $\beta(1,6)$ . Es el  $\beta$ -glucano más abundante de la pared y está presente en toda su extensión (Manners et al., 1977).
- **$\beta(1,6)$ -glucano:** Está formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\beta(1,6)$  y con ramificaciones en  $\beta(1,3)$ . Es un componente minoritario en la pared celular (Manners et al., 1977).

La enzima que forma este polímero es la  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa. Este complejo proteico está constituido por una subunidad reguladora, denominada GTPasa Rho, y por una catalítica. La subunidad catalítica en *S. pombe* tiene 4 isoformas diferentes, Bgs1, Bgs2, Bgs3 y Bgs4 y cada una de ellas tiene una función diferente. Bgs1 es una proteína esencial para la síntesis del septo primario así como para el crecimiento polar y la germinación (Cortés et al., 2002; 2007), Bgs2 interviene en el proceso de esporulación (Liu et al., 2000), Bgs3 regula la polaridad celular (Martín et al., 2003) y Bgs4 es necesaria para la formación de la pared celular lateral y el septo secundario (Cortés et al., 2004).

## 2.3. Galactomanano

Es un polímero formado por unidades de manosa unidas por enlaces  $\alpha(1,6)$  y con ramificaciones en  $\alpha(1,2)$  terminadas en un resto de galactosa en los extremos no reductores. Representa la fracción glucídica de las glicoproteínas de la pared celular y está presente tanto en la parte externa como interna de la estructura trilaminar. La glicosilación de estas proteínas tiene lugar en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi. Posteriormente las proteínas de la pared celular son secretadas y se unen a la membrana plasmática o a los glucanos de la pared.



### 3. El tráfico vesicular

El tráfico vesicular es el conjunto de procesos que permiten el transporte de distintos compuestos (denominados “carga”) entre los compartimentos celulares mediante la formación de vesículas transportadoras. Básicamente se puede hablar de dos procesos opuestos que permiten regular el intercambio de lípidos y proteínas entre la membrana plasmática y los orgánulos membranosos intracelulares: la endocitosis y la secreción. Los pasos que se suceden en el transporte vesicular son: la formación de la vesícula a partir de un orgánulo donador, la translocación de la vesícula hasta el orgánulo aceptor, la unión de la vesícula con los “factores amarra” en la membrana diana y, por último, la fusión de la membrana de la vesícula con la del orgánulo aceptor (Hong, 2005).

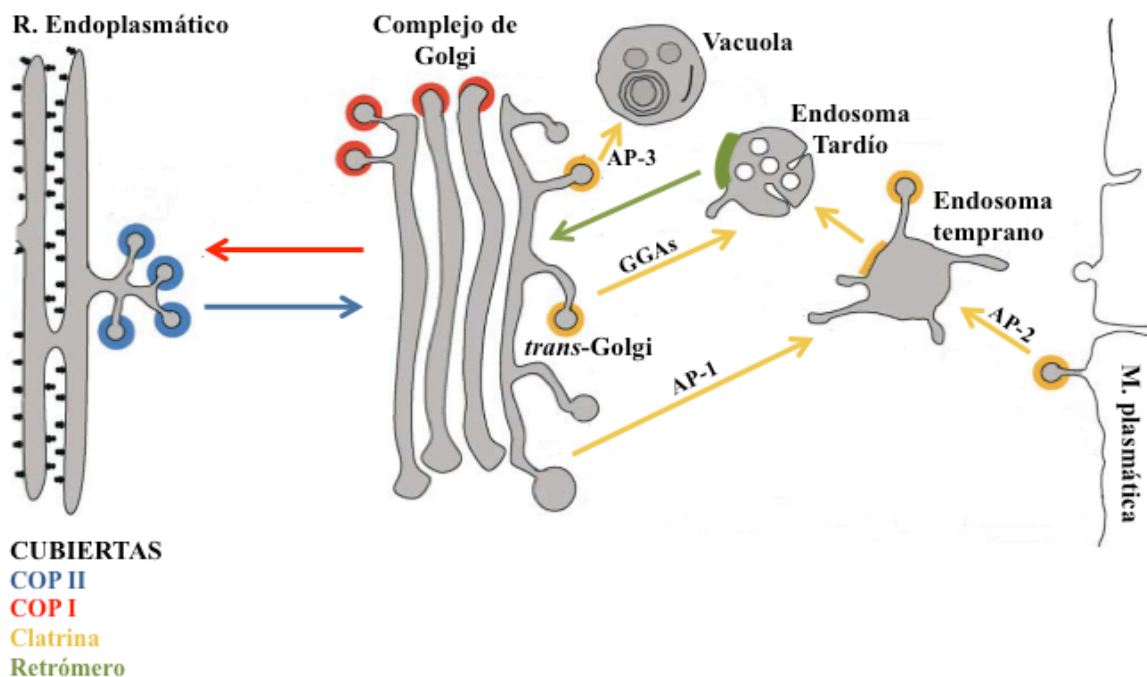
#### 3.1. El sistema de endomembranas

Las células eucariotas tienen una serie de orgánulos entre los que se mueven las vesículas transportadoras permitiendo el intercambio de proteínas y lípidos. Éstos son: el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi, los endosomas (temprano y tardío) y los lisosomas/vacuolas. Comúnmente se denomina a este conjunto como “sistema de endomembranas”. Este sistema está representado esquemáticamente en la **Figura 3** (página siguiente).

- **Retículo endoplasmático (RE):** El RE liso participa en el proceso de secreción celular interviniendo en el transporte de sustratos y productos por el citoplasma hasta el exterior celular.
- **Complejo de Golgi:** Tiene un papel importante en la secreción celular. Recibe proteínas del RE mediante la acción de las proteínas de cubierta COP-II, las transforma (generalmente mediante procesos de glicosilación) y las libera en nuevas vesículas que van dirigidas hacia la membrana plasmática. También interviene en el transporte de proteínas a la vacuola para su eliminación y en el transporte retrógrado hacia el RE mediante la colaboración de las proteínas de cubierta COP-I.
- **Endosomas:** Son un conjunto heterogéneo de orgánulos membranosos intermedios al que llegan vesículas tanto de la membrana plasmática por endocitosis como del complejo de Golgi por secreción. Este orgánulo, una vez que ha recibido las vesículas, puede participar en varios procesos. Por un lado, hay proteínas de cubierta que pueden recuperar algunos cargos y enviarlos de nuevo al complejo de Golgi; por otro lado, vesículas que se generan en los endosomas se envían hacia la membrana plasmática, en procesos de secreción o de reciclaje. Por último, desde los endosomas algunos cargos se envían hacia los lisosomas/vacuolas para su degradación. Podemos hablar de dos tipos de endosomas: los **endosomas tempranos** (Early

Endosomes, EE), que se encargan de recibir el material de la endocitosis y del Golgi, y el **compartimento prevacuolar**, que está formado por los endosomas tardíos y los cuerpos multivesiculares (CMV), y se forma por maduración de los EEs. Desde los **endosomas tardíos** se produce el reciclado vesicular de algunos componentes hacia el *trans*-Golgi y el endosoma temprano. Los **cuerpos multivesiculares** representan el paso anterior a la degradación lisosómica, ya que se fusionan con la membrana vacuolar descargando su contenido en el lumen de estos orgánulos.

- **Lisosomas y vacuolas:** Son orgánulos cargados de hidrolasas ácidas que van a degradar componentes macromoleculares, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Estos orgánulos se denominan lisosomas en las células eucariotas, y vacuolas en organismos inferiores como son las levaduras, y en las plantas.



**FIGURA 3. Cubiertas y adaptadores que intervienen en el tráfico vesicular.** Las flechas se corresponden con las diferentes cubiertas proteicas que intervienen en el tráfico vesicular. En el esquema también se indican los adaptadores que intervienen en las vesículas de clatrina. Imagen modificada de Bonifacino et al., 2004.

### 3.2. Proteínas de cubierta

Existen distintos complejos de proteínas que median el transporte vesicular entre los orgánulos celulares. Normalmente las vesículas que intervienen en el transporte están rodeadas de proteínas que forman una cubierta a su alrededor. Puesto que estas cubiertas no son capaces de unirse directamente a los lípidos de las membranas ni a los cargos, se unen a ellos a través de unos

complejos adaptadores. La cubierta más estudiada es la de clatrina. Tanto las proteínas de cubierta como los distintos adaptadores relacionados con las vesículas de clatrina están representados en el esquema de la **Figura 3** (página anterior). A continuación se describen de manera resumida los complejos proteicos, necesarios para el transporte vesicular, que se han estudiado en este trabajo.

### 3.2.1. Las vesículas cubiertas por clatrina

Las vesículas de clatrina median el transporte desde el *trans*-Golgi a otros orgánulos y el proceso de endocitosis. La clatrina es un componente de la cubierta vesicular que está formado por tres cadenas pesadas y tres ligeras que se ensamblan formando los trisqueliones. Estos trisqueliones se unen en una zona de la membrana específica y van a permitir la gemación de la misma formando una vesícula con los cargos en el interior. La interacción de las cadenas de clatrina con los cargos está mediada por los denominados complejos adaptadores. Podemos diferenciar dos tipos:

- **Complejos AP** (*Assembly Polypeptides*): Incluyen a AP-1, AP-3 y AP-4, que forman vesículas en el complejo de Golgi y el endosoma, y a AP-2, que interviene en el proceso de endocitosis.
- **Complejos GGA** (*Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, ARF-binding proteins*): Median el transporte desde el *trans*-Golgi hasta la vacuola/lisosoma.

En el proceso de endocitosis mediada por clatrina podemos diferenciar 3 pasos: la unión de los complejos adaptadores a la membrana mediante su fijación a cargos específicos, la unión de los trisqueliones a los adaptadores y la formación de la vesícula por deformación y curvatura de la membrana, seguida de la escisión de la vesícula. Una vez que la vesícula ya está en el citosol se produce el desprendimiento de los trisqueliones y de los adaptadores por la acción principal de la enzima Hsc70 y la liberación de los cargos (Lemmon, 2001).

### 3.2.2. El retrómero

El retrómero es un complejo de proteínas que forma una cubierta en vesículas generadas en el endosoma tardío y que regula el tráfico y el reciclado intracelular entre dichos endosomas y el Golgi. Su función fundamental es evitar que determinadas proteínas transmembrana sean degradadas en el lisosoma mediante su reciclado enviándolas de nuevo al *trans*-Golgi (Hierro et al., 2017). En levaduras, el retrómero está compuesto por Vps26, Vps29 y Vps35. Estos complejos interactúan con las SNX (*sorting nexins*) que van a regular el reclutamiento de las distintas proteínas mediante la interacción con el fosfatidil inositol 3-fosfato (PtdIns(3)P) de la membrana de los endosomas. Cuando aumenta la cantidad de PtdIns(3)P en la membrana de los endosomas, se incrementan el número de SNX que están unidas a la membrana endosomal y, como consecuencia,

el reclutamiento del retrómero. Así, la presencia del PtdIns(3)P va a determinar que las proteínas sigan la vía hacia el *trans*-Golgi en lugar de hacia la vía lisosomal (Seaman, 2012).

### 3.2.3. La maquinaria ESCRT

El ESCRT (*Endosome Sorting Complex Required for Transport*) es un complejo de proteínas que permite la formación de los cuerpos multivesiculares (CMVs), un paso esencial para la correcta degradación en la vacuola de lípidos y proteínas de membrana ubiquitinadas (Henne et al., 2011). Además de ser fundamental en la vía de los CMVs, también es importante en la citocinesis y en la reproducción de virus como el del VIH (Teis et al., 2010). El ESCRT está compuesto por cinco componentes: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y Vps4. Cada uno de los complejos tiene una función diferente, desde el reconocimiento de proteínas ubiquitinadas hasta la invaginación de la membrana del endosoma tardío y la escisión de las vesículas en el interior del mismo (Wollert et al., 2009).

**TABLA I. Resumen de las proteínas estudiadas en este trabajo.**

Proteína	Tipo de proteína de cubierta	Función
Gga22	Adaptador de Clatrina	Transporte de proteínas desde el complejo de Golgi hasta el endosoma tardío para que finalmente sean degradadas en la vacuola
Ent3	Adaptador	
Vps27	ESCRT (ESCRT-0)	Reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas para ser introducidas en el endosoma
Vps35	Retrómero	Transporte retrógrado del endosoma al <i>trans</i> -Golgi, evitando la degradación de proteínas en la vacuola

## ANTECEDENTES

A lo largo de los últimos años se han generado y estudiado múltiples mutantes relacionados directamente con el tráfico vesicular. Así, gracias a la investigación desarrollada en este organismo, se conocen muchas de las características de determinados mutantes:

- ***gga22A***: Mutante sin el adaptador Gga22 de las vesículas de clatrina que media el transporte del Golgi a la vacuola. En este mutante se ha podido ver por microscopía que hay un aumento en el número de vacuolas durante la fase vegetativa (Ma et al., 2011) así como alteraciones en el tráfico de algunas proteasas que normalmente funcionan en las vacuolas.

- ***ent3Δ***: Mutante nulo del gen *ent3*<sup>+</sup>. Ent3 es un adaptador muy poco conocido y estudiado hasta el momento, aunque se sabe que interviene en el transporte vesicular desde el Golgi hasta el endosoma.
- ***vps27Δ***: Carente de una proteína perteneciente al ESCRT-0 que reconoce las proteínas ubiquitinadas y permite la entrada de las mismas en el endosoma. Se ha descrito que las células de *S. pombe* que no producen esta proteína tienen problemas en la conjugación (Dudin et al., 2017), en la frecuencia de esporulación y en la germinación de las esporas (Onishi et al., 2007). Así mismo, se han descrito dificultades en la separación de las células tras la citocinesis (Bhutta et al., 2014), una menor degradación de proteínas en la vacuola (Stewart et al., 2011) y alteraciones en la formación de los cuerpos multivesiculares (Takegawa et al., 2007).
- ***vps35Δ***: Mutante nulo en el gen que codifica una proteína perteneciente al retrómero, cuya ausencia provoca que el proceso de reciclado de proteínas no funcione y que, como consecuencia, no se recuperen algunas proteínas importantes. Este mutante también presenta una segregación cromosómica descompensada (Blyth et al., 2018).

Además de estos mutantes simples, en este trabajo se han estudiado 2 mutantes dobles: ***vps27Δ vps35Δ*** y ***ent3Δ gga22Δ***. Por otro lado, los 3 mutantes simples *fsv1Δ*, *apm3Δ* y *gga22Δ*, además de los 7 mutantes dobles *gga21Δ gga22Δ*, *vps27Δ gga22Δ*, *vps27Δ ent3Δ*, *vps27Δ gga22Δ*, *vps27Δ ent3Δ*, *fsv1Δ apm3Δ* y *fsv1Δ vps35Δ* han sido estudiados durante la realización de este trabajo, pero los resultados no están incluidos en esta memoria. Como resultados destacables podemos citar que con *gga21Δ gga22Δ* se han hecho varios estudios y experimentos en nuestro laboratorio y sabemos que este mutante doble afecta gravemente a la viabilidad de la célula (Hoya et al., 2017).

## OBJETIVOS

Muchos de los estudios realizados para caracterizar el tráfico vesicular se han llevado a cabo en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, algunos aspectos de la biología de este organismo se parecen menos a los de humanos que los que se dan en *S. pombe*. Por esta razón, el estudio del tráfico vesicular en la levadura de fisión aporta un conocimiento complementario al obtenido hasta el momento. Por otro lado, casi todos los estudios realizados con mutantes afectados en estos procesos se han llevado a cabo en condiciones estándar de laboratorio, pero la participación de estos procesos en la respuesta a estrés apenas se conoce. En este trabajo se han estudiado mutantes que tienen bloqueados diferentes pasos del tráfico celular, proceso que si no funciona

correctamente provoca consecuencias como son la descompensación de receptores en la membrana plasmática, la desorganización de la localización de enzimas o la acumulación de productos que no son eliminados en la vacuola. Además, alteraciones en estas vías intracelulares están relacionadas con enfermedades neurodegenerativas humanas como son el Parkinson, el Alzheimer o la enfermedad de Huntington (Luzio et al., 2015; Hierro et al., 2017), lo cual demuestra la importancia del estudio de los mecanismos del transporte vesicular en la célula.

El **objetivo general** de este Trabajo de Fin de Grado es el análisis funcional de 6 mutantes de *S. pombe* con alteraciones en el tráfico vesicular en diferentes condiciones de estrés mediante:

- La realización de estudios de viabilidad.
- El análisis de la morfología celular de los mutantes.
- El estudio del tamaño y forma de las vacuolas y del compartimento prevacuolar en los mutantes con alteraciones destacadas.
- El estudio de la disposición de la glucán sintasa Bgs4 en los mutantes con defectos en pared celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Medios de cultivo para *S. pombe*

Para el cultivo de las células se utilizaron diferentes medios según las exigencias de cada experimento.

El medio **YES** (*Yeast Extract Supplemented*) se utilizó de manera rutinaria para el crecimiento de la levadura *S. pombe*. Su composición es: glucosa al 3% y extracto de levadura al 0,5%. Además, el medio se suplementa con adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo (225 mg/l).

El **medio mínimo** (**EMM**, *Edinburgh Minimal Media*) se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* para la obtención de transformantes. La composición de este medio es: glucosa al 2%, ftalato monopotásico al 0,3%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,22% y NH<sub>4</sub>Cl al 0,5%. Este medio se suplementó con antibióticos, minerales o aminoácidos según fuera necesario en cada caso.

El **medio mínimo completo** se utilizó para inducir la conjugación de estirpes heterotálicas en los cruces genéticos. Éste se genera a partir de EMM suplementándolo con adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo (225 mg/ml).

Todos los medios se prepararon con agua destilada y se esterilizaron en el autoclave. El procedimiento de preparación de los medios sólidos fue el mismo pero añadiendo agar a una concentración final del 2%.

## **2. Condiciones y evaluación del crecimiento de cepas de *S. pombe***

### **2.1. Condiciones de cultivo para el crecimiento de *S. pombe***

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de cepas de *S. pombe*. Para conseguir un cultivo de la cepa deseada en fase exponencial normalmente se usaba un preinóculo en medio líquido que se incubaba a 28°C durante 16-18 horas. Posteriormente, se preparaba el cultivo a analizar a partir del preinóculo teniendo en cuenta el tiempo de generación de la levadura, la cantidad inicial de la misma y el medio de cultivo. La cantidad de células inicial se determinó mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro (SmartSpec™Plus, BioRad), teniendo en cuenta que la densidad óptica de 1,0 equivale aproximadamente a  $10^7$  células/ml de *S. pombe*.

Los cultivos sólidos se incubaron en placas Petri, y los líquidos en matraces y tubos de ensayo. Ambos fueron incubados a la temperatura óptima de 28°C, excepto en el ensayo puntual ante estrés térmico que se realizó a las temperaturas de 25°C, 28°C, 32°C, 34°C, 35°C, 36°C y 37°C. En el caso del crecimiento de la levadura en medio líquido se utilizaron matraces de 100 mL que se llenaron hasta una quinta parte de su volumen total y que se mantuvieron con una agitación de 200 rpm.

### **2.2. Ensayos de crecimiento en gota**

Los estudios de crecimiento a diferentes condiciones de estrés se realizaron en medios sólidos YES y YES suplementado con diferentes compuestos, según fuera el caso. Partiendo de cultivos líquidos, las células se reinocularon a una D.O. de 1,0. A continuación, se realizaron diluciones seriadas 1:4 obteniendo 3 concentraciones diferentes de células y con un replicador se colocó una gota de cada concentración sobre las placas del medio de cultivo. Las placas se incubaron en las diferentes condiciones de estrés de dos a cuatro días a 28°C.

### **2.3. Crecimiento de *S. pombe* en condiciones de cultivo especiales**

Para los ensayos de crecimiento en gota se tuvieron que preparar medios suplementados con cloruro potásico, cloruro sódico, cloruro magnésico, higromicina y Cancidas®. Para ello se hicieron diluciones a partir de la solución stock en YES agar. En el caso del KCl, la cantidad necesaria para alcanzar la concentración deseada se pesó y se añadió junto a los otros componentes del medio

antes de ser autoclavado. La solución stock y las concentraciones que se utilizaron de cada compuesto en este trabajo se resumen en la **Tabla II**. En estas condiciones de estrés se cultivaron las células a 28°C durante 2-4 días.

Para los estudios en medio líquido se prepararon diluciones en YES de NaCl a 50 mM, MgCl<sub>2</sub> a 75 mM y de Cancidas a 0,05 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; y 1 µg/mL. En este caso se dejaron crecer a 28°C durante 3 horas.

**TABLA II. Productos utilizados en este trabajo y sus concentraciones iniciales y finales.**

Producto	Solución stock	Concentraciones finales
Cloruro potásico (KCl)	-	0,2 M-0,4 M-0,6 M-0,8 M-1 M
Cloruro sódico (NaCl)	5 M	50 mM-60 mM-75 mM-100 mM-125 mM-150 mM
Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> )	4 M	50 mM-75 mM-100 mM-125 mM-150 mM
Higromicina	2,5 mg/mL	0,5 µg/mL-1 µg/mL-2,5 µg/mL
Cancidas	10 mg/mL	0,5 µg/mL-1 µg/mL-1,5 µg/mL-2,5 µg/mL-5 µg/mL

### 3. Realización de cruces genéticos

#### 3.1. Conjugación

Se llevaron a cabo cruces genéticos para la obtención de cepas con características de dos estirpes parentales. En todos los cruces realizados se utilizaron estirpes heterotálicas de sexo opuesto incubadas durante 24 horas en placas de medio YES. Se tomó la misma cantidad de cada uno de los parentales y se cultivaron en condiciones limitantes de nutrientes para que se produjera la conjugación. De este modo, la inducción de la conjugación se realizó en placas de MM completo a 28°C. Los zigotos se originan 12-20 horas más tarde y las ascas con las ascosporas en su interior se pueden ver a los 2-3 días del inicio de la incubación.

#### 3.2. Aislamiento de las ascosporas

Para la selección de las ascosporas se cogió una pequeña cantidad del cruce y se resuspendió en 500 µL de agua con 7 µL del extracto enzimático glusulasa. La mezcla se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 16 horas para facilitar la liberación de las esporas mediante la rotura de la pared celular del asca, además de lisar aquellas células que no habían esporulado. Después, se incubaron las esporas en medio YES sólido y, tras unos días, se seleccionaron las colonias con el genotipo deseado mediante su crecimiento en medios selectivos y análisis por PCR.



### **3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta técnica se utilizó para comprobar si las ascosporas seleccionadas tenían el genotipo deseado mediante la amplificación de la secuencia deseada. Este proceso consiste en la repetición de tres pasos (desnaturalización, anillamiento y elongación) de manera cíclica entre 24 y 32 veces. El termociclador utilizado para la realización de la PCR fue MyCycler (BioRad). Para la reacción se utilizaron: el tampón suministrado por la casa comercial de la enzima, 3 mM de cloruro de magnesio, 0,25 Unidades de la enzima Taq polimerasa, 0,2 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, los oligonucleótidos correspondientes a una concentración de 1  $\mu$ M y una cantidad variable del ADN molde (cuando se purificó) o una pequeña cantidad de células (cuando se hizo PCR de colonia).

Cuando se realizó la PCR utilizando un molde de ADN, se purificó mediante el sistema Gel Band Purification Kit (Macherey-Nagel). En el caso de la PCR de colonia se cultivaron las células 16 horas antes, aproximadamente, de comenzar el proceso.

## **4. Transformación**

La entrada del plásmido en la levadura *S. pombe* se realizó mediante la formación de poros en la pared celular con Acetato de Litio y siguiendo el protocolo de Ito y colaboradores (Ito et al., 1983). Una vez realizada la transformación se incubaron las células a 28°C para permitir su correcto crecimiento.

## **5. Obtención de imágenes mediante microscopía de fluorescencia**

Para la visualización de los diferentes mutantes se recurrió a la utilización del microscopio Leica DM RXS, en el cual la captación de las imágenes se realizó con la cámara digital Leica Qsensys. Para ello se utilizaron filtros que permiten el paso de la luz ultravioleta de una longitud de onda determinada. Las imágenes se procesaron mediante el programa Adobe Photoshop 7.0.

### **5.1. Fluorescencia directa con GFP**

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz ultravioleta a una longitud de onda de 488 nm. Así, debido a sus características, esta proteína suele utilizarse como sistema de detección de la localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para la visualización de una proteína en concreto debe fusionarse la GFP con la secuencia de ADN del gen que la codifica y posteriormente observar la muestra con un microscopio de fluorescencia.

## 5.2. Tinción con Hoechst 33258

El colorante Hoechst es un compuesto que se une preferentemente a las zonas del DNA de doble cadena ricas en dímeros A-T. Esto va a permitir la visualización de los núcleos tras su excitación con longitud de onda de 360 nm emitiendo fluorescencia azul. Permite así hacer un estudio de la distribución de estos orgánulos. Además, este colorante es muy poco permeable para *S. pombe* quedando atrapadas algunas moléculas entre la pared celular. Esto nos permite hacer una tinción simultánea de los núcleos (por tinción específica) y de la pared celular (inespecífica por las moléculas de Hoechst que no logran penetrar la pared).

Para la realización de la tinción se tomó 1 mL de cultivo en fase exponencial, se lavó con 1 mL de agua destilada y se resuspendió en 20  $\mu$ L de Hoechst 33258 a 50  $\mu$ g/mL. Tras 7 minutos en contacto con el colorante en oscuridad, las células se lavaron con agua y se visualizaron en el microscopio.

## 5.3. Tinción con calcoflúor white

El calcoflúor es un colorante que se une a los polímeros con enlaces  $\beta(1,3)$  y  $\beta(1,4)$  glucano de la pared celular. Por esto, es un compuesto que se utiliza frecuentemente para teñir las paredes celulares tanto de células vegetales como fúngicas. En las plantas se une a la celulosa y en *S. cerevisiae* se une fundamentalmente a la quitina. En el caso de *S. pombe*, al ser un organismo en el que la cantidad de quitina es ínfima, el calcoflúor se une al  $\beta(1,3)$ glucano lineal del septo y de los polos de crecimiento. Este compuesto se excita por la luz ultravioleta a una longitud de onda de 372 nm y emite luz azul.

Para la realización de la tinción se tomó 1 mL de cultivo en fase exponencial, se lavó con 1 mL de agua destilada y se resuspendió en 50  $\mu$ L de calcoflúor a 50  $\mu$ g/mL. Tras 5 minutos en contacto con el colorante, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se visualizaron en el microscopio.

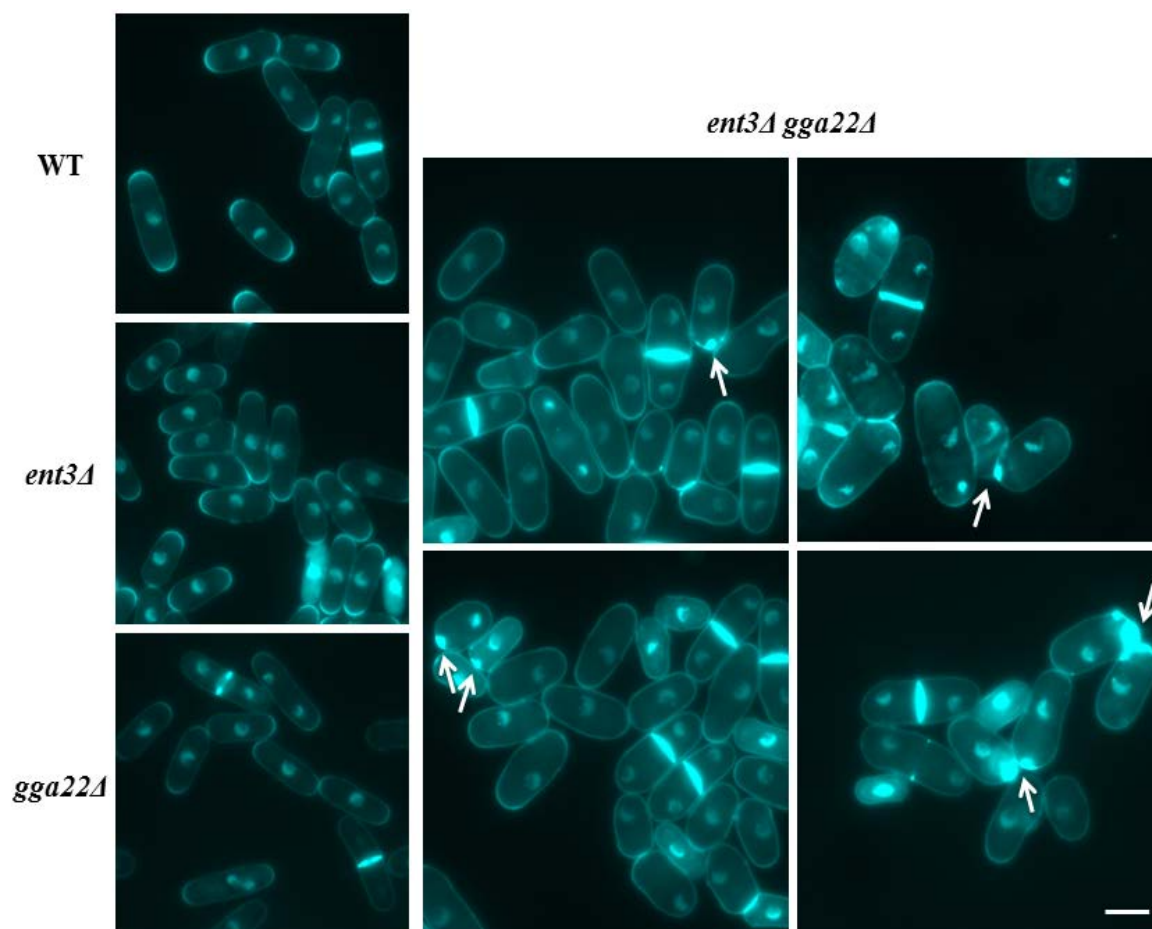
# RESULTADOS

## 1. Estudio y análisis de mutantes que tienen alterada la ruta *trans*Golgi - Endosoma - Vacuola

Se decidió analizar los mutantes *ent3Δ*, *gga22Δ* y *ent3Δ gga22Δ*. Ent3 es una proteína que facilita el transporte desde el *trans*Golgi al endosoma y Gga22 es un adaptador de las vesículas recubiertas de clatrina que dirige el transporte desde el *trans*Golgi hasta la vacuola.

### 1.1. Análisis morfológico mediante tinción Hoechst en condiciones basales

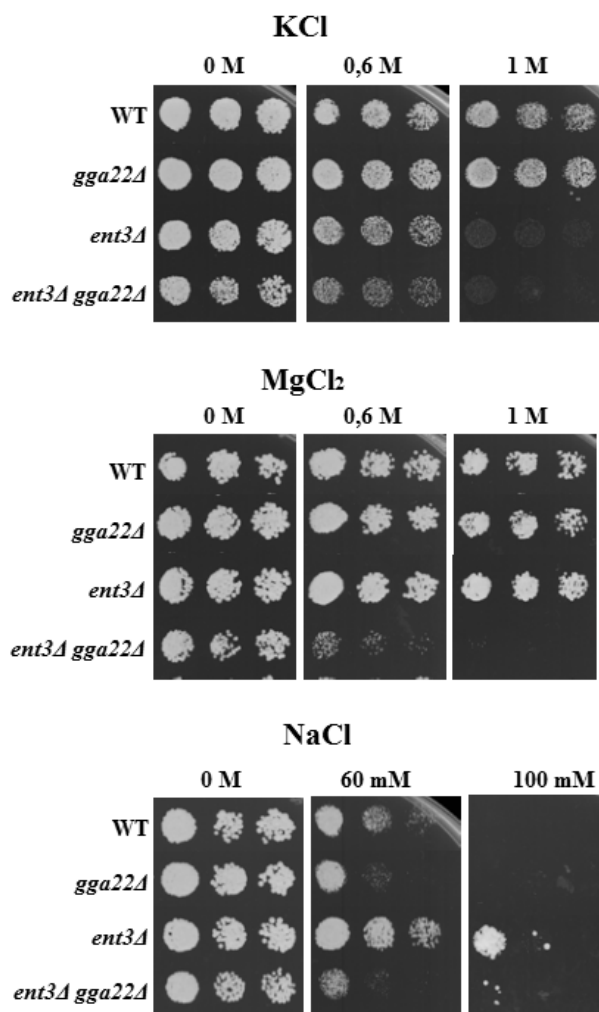
La primera aproximación experimental que se realizó para analizar el efecto de la pérdida individual o combinada de la función de Ent3 y Gga22 en condiciones estándar de crecimiento fue realizar una tinción con Hoechst 33258, un colorante que permite visualizar el núcleo y la pared celular. Esta aproximación permite analizar la existencia de defectos aparentes en la división nuclear y/o en la morfología celular. Los mutantes *ent3Δ*, *gga22Δ* y el mutante doble *ent3Δ gga22Δ* se cultivaron en medio rico en nutrientes (YES) a 28°C y se tiñeron con el colorante Hoechst, que



**FIGURA 4. Tinción de Hoechst de diversas cepas.** Se tomaron las imágenes de las células silvestres (WT), *ent3Δ*, *gga22Δ* y *ent3Δ gga22Δ* en fase exponencial mediante microscopía de fluorescencia. Las flechas señalan cúmulos de material celular. Barra de escala, 5  $\mu$ m.

tiñe al núcleo porque se une específicamente a los pares A+T del ADN, y además tiñe inespecíficamente la pared celular, en la que queda retenido en su paso hacia el núcleo. Este estudio primario nos permitió ver si alguno de los mutantes tenía grandes diferencias fenotípicas con respecto al silvestre en condiciones normales. En el caso del mutante *ent3Δ* las células tienen un tamaño algo mayor, y una forma ligeramente menos polarizada que el silvestre y que *gga22Δ* (Figura 4). Este fenotipo es mucho más grave en el caso del mutante doble *ent3Δ gga22Δ*, en el que además se aprecian septos de división curvos, y cúmulos de material celular en los polos de las células. Estos fenotipos indican que este mutante tiene alteraciones en la pared celular. Los defectos en la pared celular hacen que las células no soporten eficientemente la turgencia interna, debido a la diferencia osmótica con el medio circundante, lo que hace que las células se hagan más redondeadas y con septos curvos.

## 1.2. Estudio del crecimiento y morfología de *ent3Δ*, *gga22Δ* y *ent3Δ gga22Δ* en diferentes condiciones de estrés



**FIGURA 5. Ensayos de gota en KCl, MgCl<sub>2</sub> y NaCl.** 3 x 10<sup>4</sup> células y diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT, *gga22Δ*, *ent3Δ* y *gga22Δ-ent3Δ* en medio YES suplementado con los tres tipos de sal.

Dado que la ausencia de función de las proteínas Ent3 y Gga22 da lugar a fenotipos característicos, decidimos comprobar si estos se veían empeorados o mejorados en respuesta a diferentes tipos de estrés. De este modo, se analizó la morfología y la resistencia de los mutantes a diferentes condiciones estresantes.

### 1.2.1. Respuesta ante estrés salino

Se estudió el crecimiento de los mutantes en presencia de diferentes concentraciones de cloruro potásico (KCl), cloruro magnésico (MgCl<sub>2</sub>) y cloruro sódico (NaCl). Los resultados se muestran en la Figura 5. *gga22Δ* tiene un crecimiento similar al del silvestre en todos los tipos de estrés salino. Por contra, *ent3Δ* tiene una respuesta variada en cada una de las sales: es sensible a KCl, creciendo muy poco en la concentración 1 M; en presencia de MgCl<sub>2</sub> responde igual que el

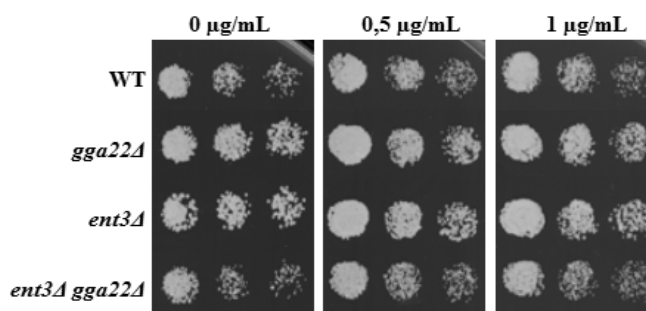
silvestre, y en NaCl presenta una resistencia muy marcada incluso a concentraciones elevadas. El doble mutante *ent3Δ gga22Δ* es sensible a KCl y MgCl<sub>2</sub> incluso a bajas concentraciones pero en NaCl presenta algo de resistencia.

### 1.2.2. Respuesta ante estrés térmico

A continuación se cultivaron los mutantes a temperaturas no óptimas para *S. pombe* para ver si su crecimiento se veía afectado por el estrés térmico. Las placas de medio YES con los mutantes se incubaron a la temperatura óptima de 28°C y a 25°C, 32°C, 34°C, 35°C, 36°C y 37°C. En este caso, no hubo ninguna respuesta destacable, por lo que se puede establecer que la eliminación de las proteínas Ent3 y Gga22, de manera tanto aislada como combinada, no afecta a la capacidad de adaptación a diferentes temperaturas (resultado no mostrado).

### 1.2.3. Respuesta ante inhibidores de la síntesis proteica

La higromicina es un antibiótico que afecta tanto a bacterias como a hongos y células eucariotas superiores. Actúa inhibiendo la síntesis proteica bloqueando la traducción del mRNA. Además, la sensibilidad a concentraciones muy bajas de esta droga es un reflejo de la existencia de defectos en la interfaz *trans*Golgi-endosoma tardío, sin que se conozca la razón para ello, por lo que nos pareció útil estudiar la respuesta a higromicina de estos mutantes. En ninguno de los mutantes se vio un crecimiento más reducido que en el silvestre en presencia de cantidades bajas del antibiótico (**Figura 6**), lo que indica que los mutantes *ent3Δ*, *gga22Δ* y *ent3Δ gga22Δ* no alteran al proceso de tráfico hasta el endosoma tardío, y que sus alteraciones parecen limitarse al tráfico hasta el endosoma temprano, como está descrito en *S. cerevisiae*.



**FIGURA 6.** Los mutantes *gga22Δ*, *ent3Δ* y *ent3Δ gga22Δ* no son sensibles a higromicina.  $3 \times 10^4$  células y diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT, *gga22Δ*, *ent3Δ* y *ent3Δ gga22Δ* en medio YES suplementado higromicina.

### 1.2.4. Respuesta ante fármacos antifúngicos

Se decidió estudiar la respuesta de los mutantes ante un antifúngico específico que ataca a la pared celular. Concretamente se utilizó el fármaco Cancidas que actúa inhibiendo la  $\beta$ -(1,3) glucán sintasa, enzima esencial para el mantenimiento de la pared celular. Como resultado hay una

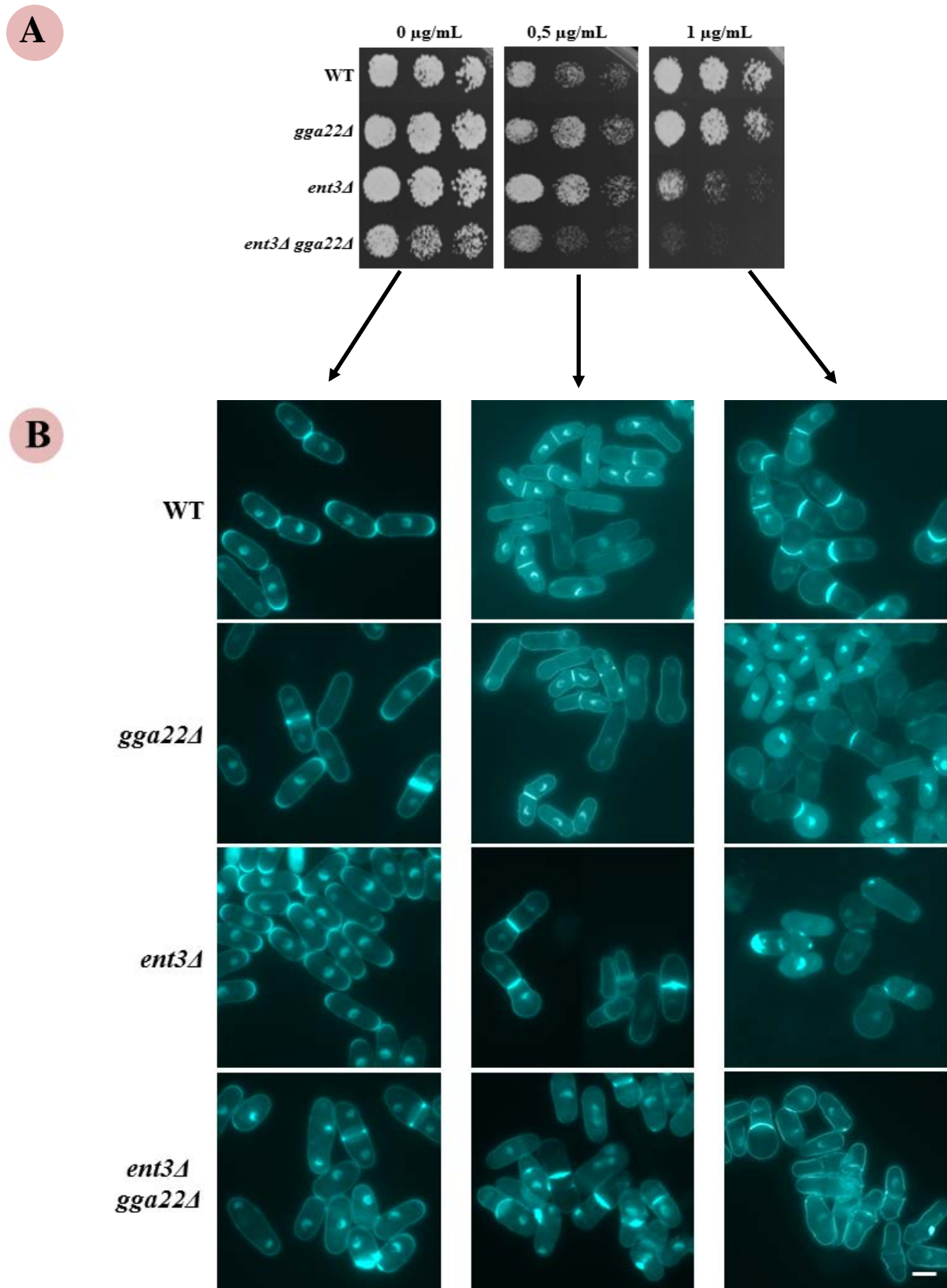
descompensación entre la síntesis y degradación de componentes de la pared afectando gravemente a la viabilidad de los hongos, de hecho es un fármaco de uso terapéutico común para la eliminación de infecciones micóticas. Para el análisis de las células ante este estrés se crecieron en placas de YES con diferentes concentraciones de Cancidas. Como resultado se obtuvo que *gga22Δ* tiene un crecimiento similar al del silvestre, que *ent3Δ* es sensible a concentraciones elevadas y que *ent3Δ gga22Δ* es muy sensible al antifúngico teniendo un crecimiento muy escaso incluso a la concentración de 0,5 μg/mL (**Figura 7A**, página siguiente). Esto nos indicaba que el mutante doble podía tener graves daños en la pared celular, como ya sugerían las imágenes tomadas en condiciones basales. Para corroborar estos fallos en pared, se tomaron imágenes de las células teñidas con Hoechst después de ser tratadas con diferentes concentraciones de Cancidas. Como se puede ver en la **Figura 7B**, a la concentración de 0,5 μg/mL podemos ver que el silvestre tiene un fenotipo muy similar al de las células sin tratar, aunque con septos más curvos debido a la acción del fármaco que lo debilita. Sin embargo, las células de *ent3Δ gga22Δ* presentan septos más curvos que en la condición basal, más acumulaciones en la pared, y una aparente dificultad para que se produzca la división celular. El mutante *ent3Δ* también se altera a esta concentración de la droga antifúngica, aunque no tanto como el mutante doble.

### **1.3. Estudio de la pared celular en el mutante *ent3Δ gga22Δ***

Puesto que el mutante doble *ent3Δ gga22Δ* presenta unas características morfológicas destacables tanto en condiciones basales como estresantes se decidió profundizar en su estudio. A continuación, ante la sospecha de que la ausencia de los genes *ent3<sup>+</sup>* y *gga22<sup>+</sup>* causan alteraciones en la pared celular, se comprobó mediante diversos experimentos si esta estructura estaba realmente modificada.

#### **1.3.1. Análisis de la pared celular mediante tinción con calcoflúor en condiciones basales**

En primer lugar, se realizó una tinción con calcoflúor white (CW), un colorante específico de la pared celular, para comprobar si realmente los cúmulos que se veían en la tinción Hoechst pertenecían a esta estructura y no al núcleo. El CW se une a polisacáridos como la quitina y la celulosa. Sin embargo, ante la ausencia de estos polímeros en *S. pombe* se cree que este colorante se une al β(1,3)-glucano lineal, tiñendo más fuertemente al septo primario y, en menor medida, a los polos (Cortés et al., 2007). Así, se cultivaron las células en medio YES a 28°C, se tiñeron con calcoflúor y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Como resultado, pudimos constatar

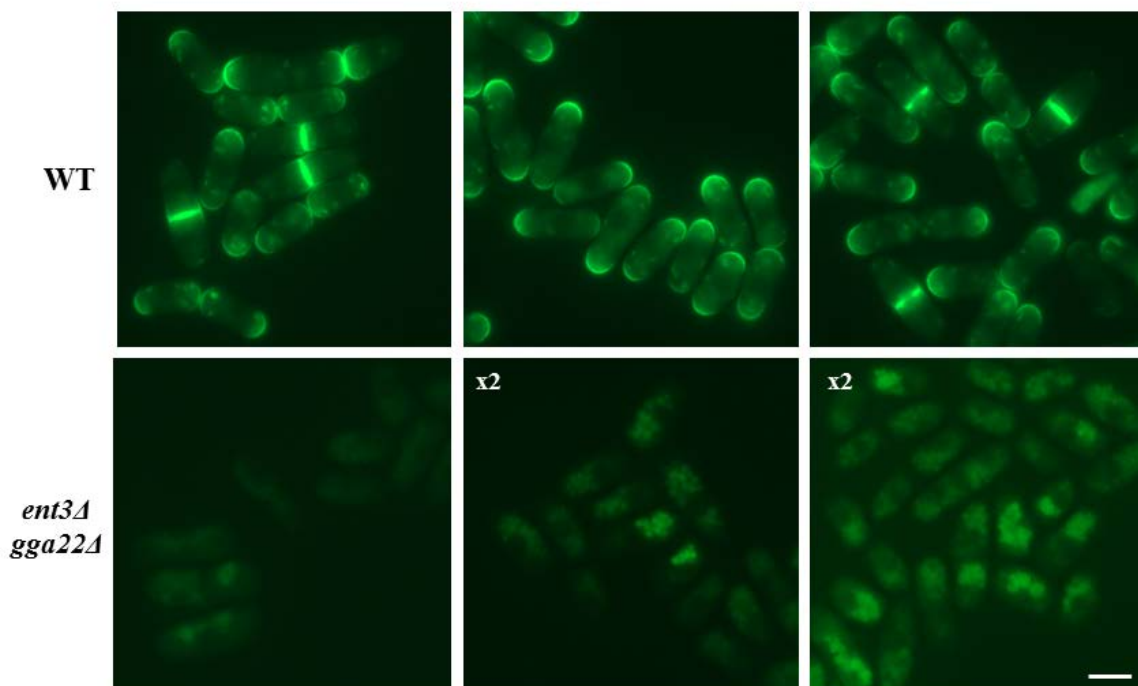


**FIGURA 7. *ent3Δ gga22Δ* es muy sensible a Cancidas.** (A) Ensayos de gota en Cancidas.  $3 \times 10^4$  células y diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT, *gga22Δ*, *ent3Δ* y *ent3Δ gga22Δ* en medio YES suplementado Cancidas. (B) Análisis fenotípico de *gga22Δ*, *ent3Δ* y *ent3Δ gga22Δ* mediante tinción de las células con Hoechst. Se tomaron imágenes de los mutantes a 0, 0,5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  con el microscopio de fluorescencia. Barra de escala, 5 $\mu\text{m}$ .

*ent3Δ gga22Δ* da lugar a tres tipos de alteraciones en la pared celular: septos curvos, septos engrosados y cúmulos de pared en los polos de la célula. Estos defectos demuestran una descompensación de los componentes que conforman la pared celular, provocando que haya un déficit en la resistencia de la turgencia interna. Además, se puede verificar que los cúmulos presentes en la pared no pertenecen al núcleo y que, por lo tanto, la ausencia de Ent3 y Gga22 no causa alteraciones aparentes en este orgánulo (resultados no mostrados).

### 1.3.2. Estudio de la distribución de la glucán sintasa Bgs4

Tras verificar que los defectos visibles en estas células se corresponden con alteraciones en la pared celular, se decidió estudiar la localización de la enzima Bgs4 en el mutante *ent3Δ gga22Δ*. Para poder observar estas enzimas mediante microscopía, se utilizaron cepas que portaban el gen *bgs4<sup>+</sup>* fusionado con la secuencia de la proteína fluorescente GFP. Tras la generación del mutante deseado, se cultivaron las células en medio YES a 28°C y se tomaron imágenes en el microscopio de fluorescencia. Como resultado obtuvimos que *ent3Δ gga22Δ* tiene una distribución alterada de la enzima Bgs4. Esta proteína en las células silvestres se encuentra fundamentalmente en los polos de crecimiento activo y en el ecuador de la célula, donde se sintetiza el septo de división. Sin embargo, en las células del doble mutante *ent3Δ gga22Δ*, Bgs4 no se observa en la superficie celular, sino que se encuentra aparentemente acumulada en las vacuolas, siendo la intensidad de fluorescencia



**FIGURA 8.** Bgs4 se localiza en la vacuola en el mutante doble *ent3Δ gga22Δ*. Imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia de células con la construcción GFP-Bgs4. Las dos imágenes inferiores indicadas con un 2x están tomadas al doble de exposición que el resto.



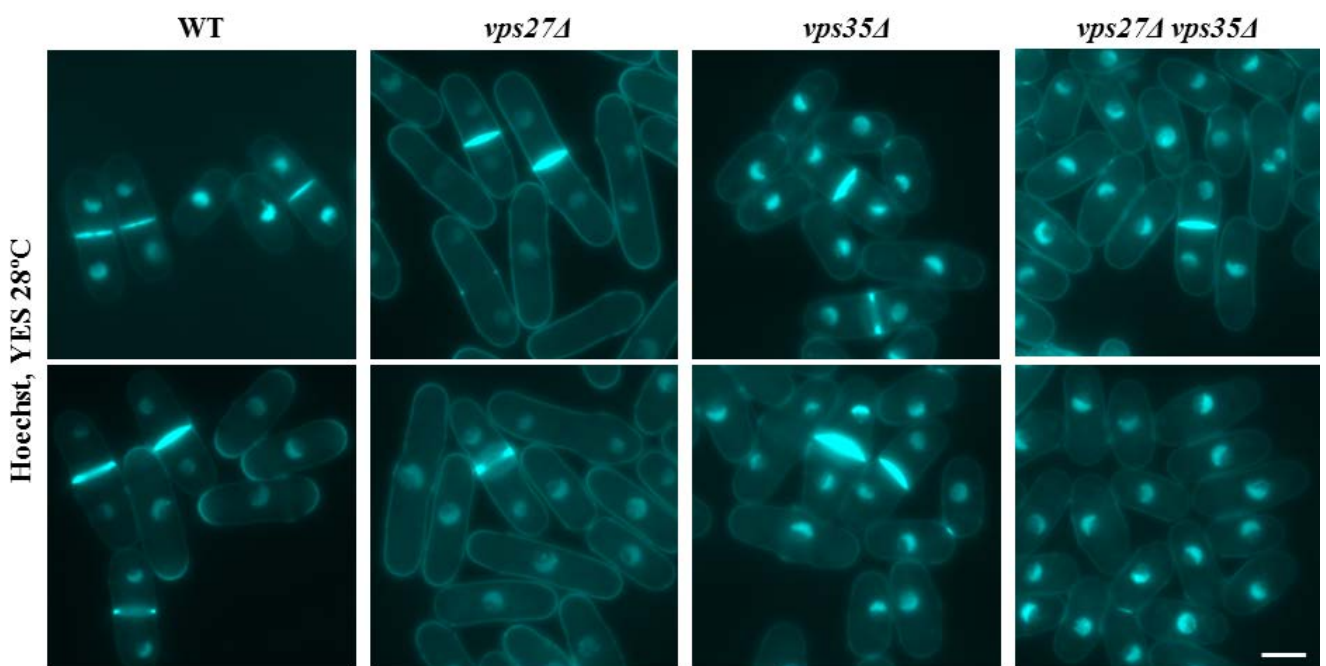
inferior a la de la cepa silvestre (**Figura 8**, página anterior). Estas imágenes nos indican que los defectos en pared pueden ser causados por una alteración en la localización de la glucán sintasa Bgs4. Realmente no se sabe por qué Bgs4 se acumula en las vacuolas en este mutante, y para la obtención de resultados más concluyentes tendremos que estudiar la distribución de la glucán sintasa en otros estudios.

## 2. Estudio y análisis de mutantes del ESCRT y del retrómero

Se estudiaron los mutantes *vps27Δ* (carente del componente del ESCRT que reconoce las proteínas ubiquitinadas), *vps35Δ* (sin un componente del retrómero) y *vps27Δ vps35Δ* (el mutante doble que se obtuvo mediante cruce genético de ambos mutantes simples).

### 2.1. Análisis morfológico mediante tinción Hoechst en condiciones basales

En este caso, el procedimiento se realizó de la misma manera que para los mutantes de la ruta *trans*Golgi-Endosoma. Se cultivaron las células en medio YES a 28°C, se tiñeron con el colorante Hoechst y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. Tras la observación de las células se pudo constatar que las células del mutante *vps27Δ* son ligeramente más largas que las del silvestre, que las células de *vps35Δ* son muy similares al control, aunque en ocasiones se ven algunas células de menor tamaño y mayor diámetro, y que las del mutante doble *vps27Δ vps35Δ* no



**FIGURA 9. Análisis fenotípico de *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* en condiciones basales.** Imágenes de células teñidas con Hoechst tomadas con el microscopio de fluorescencia. Barra de escala, 5μm.

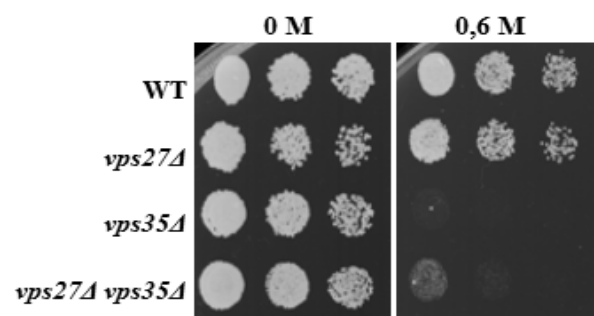
presentan alteraciones destacables en la morfología (**Figura 9**). También se pudo establecer que ninguno de los mutantes presenta alteraciones en la división nuclear ni en la división celular, ya que las células hijas contienen un núcleo, son del mismo tamaño y presentan un septo de división con morfología aparentemente normal.

## 2.2. Estudio del crecimiento y la morfología de *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* en diferentes condiciones de estrés

Dado que, aparentemente, la función de Vps27 y de Vps35 no afecta a la división ni a la morfología celular en condiciones basales, nos preguntamos si la función de estas proteínas sería más relevante en condiciones de estrés. Para contestar esta pregunta se analizó el crecimiento y la morfología celular en presencia de varios compuestos estresantes.

### 2.2.1. Respuesta ante estrés salino

Se cultivaron los mutantes en concentraciones crecientes de diferentes sales: KCl, MgCl<sub>2</sub> y NaCl. Se observó que a concentraciones elevadas de KCl (0,6 M) el crecimiento de *vps35Δ* y de *vps27Δ vps35Δ* se ve comprometido. Sin embargo, *vps27Δ* mantiene su crecimiento normal incluso a la concentración de 1 M (**Figura 10**, datos no mostrados).

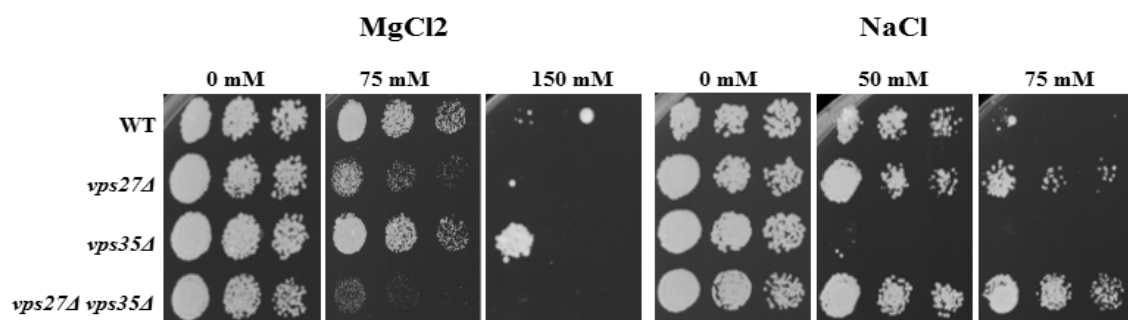


**FIGURA 10. Ensayo de gota en KCl.** 3 x 10<sup>4</sup> células y diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT, *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* en medio YES suplementado con KCl.

Como se muestra en la **Figura 11** (página siguiente), en MgCl<sub>2</sub> (75 mM) el crecimiento de *vps27Δ* está afectado. Por el contrario, *vps35Δ* es resistente, de modo que crece incluso a concentraciones de esta sal a las que no lo hace el control silvestre (150 mM). El mutante doble *vps27Δ vps35Δ* es incluso más sensible que *vps27Δ*, lo que indica una relación compleja de ambos genes en cuanto al crecimiento en presencia de esta sal.

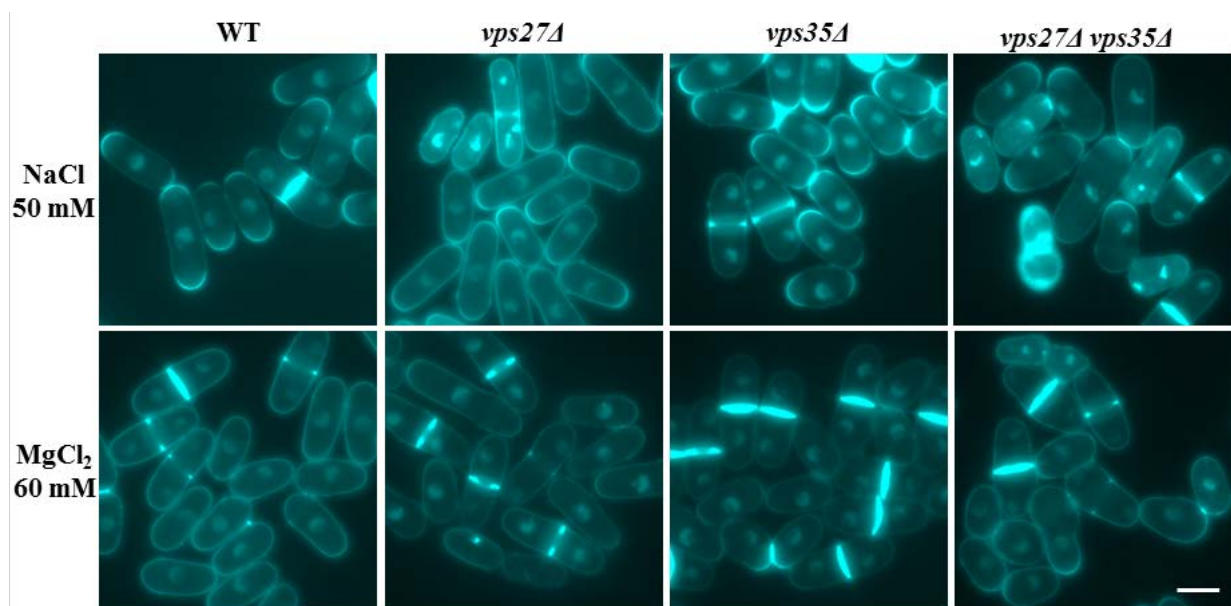
Por último, los estudios con NaCl resultan interesantes porque dan un resultado opuesto al obtenido con MgCl<sub>2</sub>. Tanto *vps27Δ* como *vps27Δ vps35Δ* presentan una resistencia muy marcada a elevadas concentraciones de la sal (75 mM), mientras que *vps35Δ* es muy sensible a la misma (**Figura 11**). A pesar de que parezca un resultado no coherente, en muchos estudios de tráfico vesicular se obtienen sensibilidades dispares de un mutante ante sales que aparentemente parecen que van a provocar una misma respuesta. No se ha podido demostrar por qué sucede esto, pero se

creo que puede haber diferentes resultados debido a que cada tipo de ión afecte en mayor o menor medida a diferentes funciones celulares y/o a la funcionalidad de los distintos compartimentos intracelulares. En este caso, además, se están analizando mutantes alterados en el tráfico desde el endosoma tardío hacia el interior de la vacuola (mutante *vps27Δ*) y en el tráfico retrógrado desde dicho endosoma hacia el Golgi. Los resultados indican que la alteración de cada uno de estos pasos, o de los dos, afecta de distinta manera al crecimiento en presencia de diferentes sales. En cualquier caso, se demuestra que tanto Vps27 como Vps35 son necesarios para el crecimiento en presencia de algunos tipos de estrés salino.



**FIGURA 11. Ensayos de gota en MgCl<sub>2</sub> y NaCl.** 3 x 10<sup>4</sup> células y diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT, *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* en medio YES suplementado con MgCl<sub>2</sub> y NaCl.

También se analizaron los mutantes mediante tinción Hoechst después de ver la viabilidad en cada una de las concentraciones. Las imágenes se pueden ver en la **Figura 12**. *vps27Δ* no tiene cambios aparentes en su morfología en ninguna de las dos condiciones analizadas. *vps35Δ* en presencia de MgCl<sub>2</sub> presenta un gran número de células septadas lo que se relaciona con problemas en la



**FIGURA 12. Análisis fenotípico de *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* con estrés salino.** Tinción de Hoechst de las estirpes indicadas cultivadas en presencia de 50 mM de NaCl o 60 mM de MgCl<sub>2</sub> durante 3 horas a 28°C. Barra de escala, 5µm.

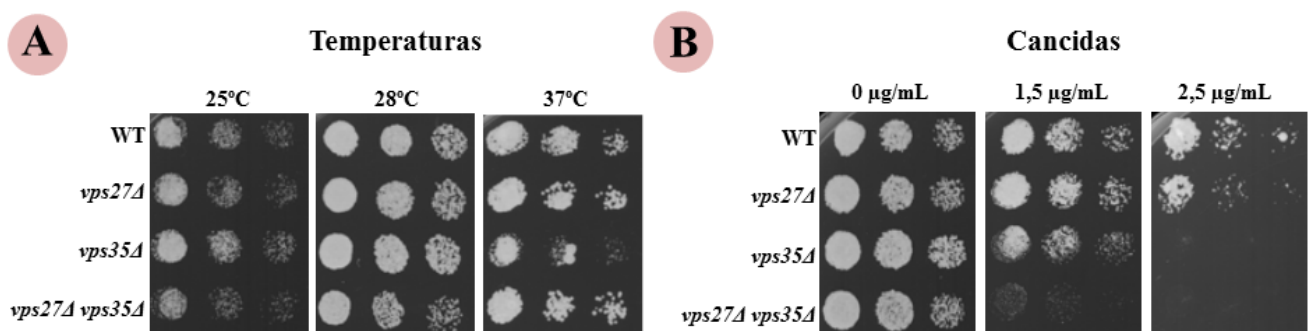
división celular. Por último, *vps27Δ vps35Δ* tiene cambios morfológicos en presencia de ambos tipos de sal, las células están engrosadas y con forma de bombilla, lo que podría estar asociado con alteraciones en la pared celular. Los defectos en la pared celular, como ya hemos citado anteriormente, hacen que las células no soporten eficientemente la turgencia interna provocando que las células sean más redondeadas.

### 2.2.2. Respuesta ante estrés térmico

Se cultivaron los mutantes en placas de YES a 25°C, 28°C, 32°C, 34°C, 35°C, 36°C y 37°C. Sólo se vio un ligero defecto en el crecimiento de *vps35Δ* a la temperatura extrema de 37°C, por lo que se puede concluir que los defectos en el ESCRT no alteran la capacidad de adaptación al estrés térmico, mientras que defectos en el retrómero lo hacen ligeramente (**Figura 13A**).

### 2.2.3. Respuesta ante fármacos antifúngicos

Se estudió el crecimiento de los distintos mutantes en presencia de Cancidas (**Figura 13B**). Como resultado se obtuvo que *vps27Δ* crece igual que el silvestre. Sin embargo, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* son sensibles a elevadas concentraciones de Cancidas (2,5 µg/mL). Puesto que el fármaco ataca únicamente a la pared celular y afecta en mayor medida a los mutantes carentes de Vps35, podemos concluir que las células que no tienen el gen *vps35<sup>+</sup>*, que codifica la proteína del retrómero Vps35, presentan alteraciones en la pared celular. Lo más probable es que el tráfico de alguna de las enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular esté alterado en ausencia del retrómero, algo que habría que analizar mediante otros estudios. El mutante *vps27Δ vps35Δ* es más sensible que *vps35Δ*, lo que demuestra que la pared celular está más alterada en ausencia de ambos genes.



**FIGURA 13. Ensayos de gota a diferentes temperaturas y en el antifúngico Cancidas.** (A)  $3 \times 10^4$  células y diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT, *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* en medio YES incubado a 25°C, 28°C y 37°C. (B)  $3 \times 10^4$  células y diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT, *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* en medio YES suplementado con Cancidas a las concentraciones indicadas.

## 2.3. Estudio morfológico de la vacuola y del compartimento prevacuolar

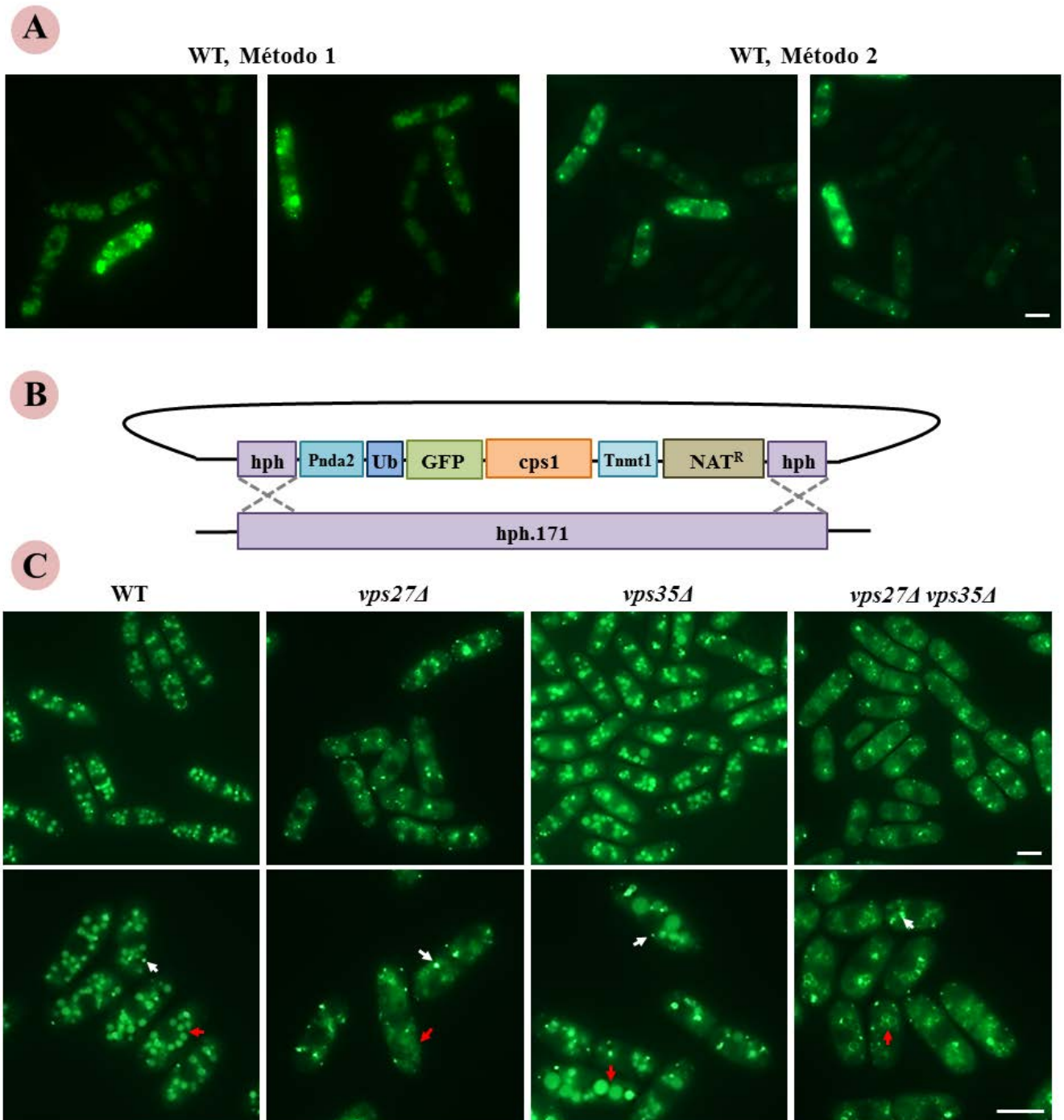
### 2.3.1. Utilización de la construcción 41xUb-GFP-Cps1

Una vez realizados los estudios generales frente a estrés se decidió realizar un estudio específico de la morfología de las vacuolas y del tráfico hacia estos orgánulos. Para ello se utilizó como marcador la carboxipeptidasa S (Cps1). Esta proteína transmembrana se ubiquitina, se reconoce por el ESCRT, entra en los cuerpos multivesiculares y llega al interior vacuolar, donde ejerce su función. Se utilizó una construcción en la que una ubiquitina se fusionó a la proteína verde GFP, que a su vez estaba fusionada a Cps1. Esta construcción se había utilizado por otros grupos de investigación para observar las vacuolas y los compartimentos prevacuolares (Takegawa et al., 2007). En primer lugar, se utilizó esta construcción en un plásmido multicopia con el gen *leu1*<sup>+</sup> como marcador de selección, en el que la expresión de *cps1*<sup>+</sup> está regulada por un promotor reprimible por tiamina (*41x*). Este plásmido se introdujo en las células de diversos mutantes por transformación. Las células se cultivaron en MM-Leu y se reinocularon 2 horas antes de la visualización en medio YES (que posee una pequeña cantidad de tiamina) para que el promotor se reprimiera levemente, de modo que no hubiera un exceso de proteína. A continuación se comprobó si se visualizaban las vacuolas y los compartimentos prevacuolares mediante microscopía de fluorescencia y se tomaron imágenes. Los resultados no fueron satisfactorios; esta herramienta no resultó ser útil porque la expresión era muy variable y difícil de controlar, de modo que estos compartimentos no se visualizaban correctamente. Se utilizó un segundo método en el que se dejaron crecer a las células reprimidas en MM-Leu+Ti, se lavaron para eliminar la vitamina, se reinocularon en MM-Leu-Ti y se incubaron durante 12-20 horas para permitir que el promotor se desreprimiera lentamente y se expresara la construcción. Sin embargo, en este segundo método tampoco se pudieron visualizar claramente ni las vacuolas ni los compartimentos prevacuolares. Utilizando estas dos aproximaciones había mucha variabilidad en el nivel de fluorescencia detectado en distintas células de un mismo cultivo. Los resultados se pueden ver en la **Figura 14A** (página 26).

### 2.3.2. Utilización del plásmido integrativo Ub-GFP-Cps1

Después de realizar los experimentos anteriores y de ver sus resultados se decidió utilizar otra estrategia, que consistió en utilizar un plásmido integrativo y poner la construcción bajo el control de un promotor constitutivo. Estas dos características de la nueva construcción eliminarían la variabilidad en la intensidad de la señal fluorescente. Se utilizó un plásmido en el que Ub-GFP-Cps1 está bajo el control del promotor de la  $\alpha$ -tubulina (*nda2*<sup>+</sup>) que permite un nivel medio de expresión (Valdivieso, resultados no publicados). La construcción lleva un gen de resistencia al

antibiótico CloNAT (marcador de selección de los transformantes de levadura), y está flanqueada por fragmentos del gen de resistencia a higromicina (HPH). Al digerir con las enzimas de restricción adecuadas se libera la construcción que, tras la transformación de la levadura, se integró en el locus *hph.171* por recombinación homóloga. Como se muestra en la **Figura 14B** (página siguiente), *hph.171* es un locus en el que el gen de resistencia a higromicina se ha incluido artificialmente en una región intergénica para la generación de cepas modificadas genéticamente. La integración de la construcción en este locus conduce a la pérdida de la resistencia a higromicina, de modo que los transformantes correctos son sensibles a higromicina y resistentes a CloNAT. Se generaron cepas *vps27Δ*, *vps35Δ* y *vps27Δ vps35Δ* con la integración. Una vez que el gen estuvo integrado, se dejaron crecer las células en medio YES y se visualizaron en el microscopio con las mismas condiciones que en el apartado anterior. En este caso, los resultados sí que fueron satisfactorios pudiéndose observar de manera uniforme las vacuolas (que se observan como múltiples estructuras circulares de tamaño medio) y los compartimentos prevacuolares (puntos pequeños con una fluorescencia más intensa que la de las vacuolas) en la estirpe silvestre (**Figura 14C**). En el mutante *vps27Δ* la carboxipeptidasa se queda acumulada en el compartimento prevacuolar. Esto reafirma la idea de que Vps27 reconoce a las proteínas ubiquitinadas en el ESCRT y por ello cuando no está no permite la entrada de Cps1 al cuerpo multivesicular, y después a la vacuola. En el mutante *vps35Δ* se ve que Cps1 llega al interior vacuolar, y se aprecia que algunas vacuolas son de mayor tamaño que en el silvestre. En el caso del mutante doble *vps27Δ vps35Δ*, Cps1 se acumula mayoritariamente en el compartimento prevacuolar, al igual que en *vps27Δ*, lo cual es de esperar ya que la actividad de Vps27 se realiza antes que la de la proteína del retrómero Vps35. En el mutante doble también se aprecia algo de fluorescencia en la membrana de la vacuola, lo que sugiere que una parte de Cps1 podría ser reciclada hacia el Golgi por el retrómero, al menos en ausencia del ESCRT.



**FIGURA 14. Visualización de la vacuola y del compartimento prevacuolar con el plásmido Ub-GFP-*cps1*.** (A) Imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia utilizando el plásmido replicativo. Método 1: Las células se dejaron crecer en MM-Leu y luego se reprimieron en las últimas dos horas en medio YES. Método 2: Las células se reprimieron en MM-Leu+Ti durante 24 horas y después se desreprimieron en MM-Leu durante 16 horas. (B) Esquema del plásmido integrativo y de su integración en el locus *hph.171* de *S. pombe*. Pnda2: promotor; Ub: ubiquitina; Tnmt1: terminador; NAT<sup>R</sup>: marcador de selección, resistencia a CloNAT. (C) Imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia utilizando el plásmido integrado. Las imágenes de la fila de abajo muestran las cepas con más aumentos. Las flechas blancas señalan los compartimentos prevacuolares y las flechas rojas señalan las vacuolas. Barra de escala, 5µm.

## DISCUSIÓN

Tanto la proteína Ent3 como Gga22 son dos adaptadores que median el transporte vesicular desde el *trans*Golgi hasta el endosoma tardío. La ausencia de ambos genes provoca morfologías aberrantes en las células, fundamentalmente en la pared celular así como defectos en la división celular. Estudios realizados por el grupo de investigación del Dr. Ribas nos muestran que mutantes con la expresión disminuida de las enzimas Bgs3 y Bgs4 dan lugar a morfologías similares a las observadas en nuestro doble mutante *ent3Δ gga22Δ*: septos curvos y cúmulos de pared (Cortés et al., 2004; Cortés et al., resultados no publicados). Esto nos indica que es probable que la falta de estos adaptadores provoque descompensación en la localización o en la cantidad de las enzimas glucán sintasas. Para corroborar esta hipótesis se comprobó la localización de la enzima Bgs4 en el mutante *ent3Δ gga22Δ* y se vio que mayoritariamente se localizaba en la vacuola. Realmente no sabemos por qué la Bgs4 se sitúa en este orgánulo puesto que el resultado esperado es que hubiera una localización en exceso en el complejo de Golgi. Es posible que la degradación de esta enzima en la vacuola se produzca por su redistribución mediante rutas alternativas realizadas por el adaptador AP-1 (que media el transporte del Golgi a la vacuola) o AP-3 (que dirige las vesículas del Golgi al endosoma temprano). Como próximas líneas de investigación, habrá que estudiar la localización de la Bgs4 en mutantes triples sin AP-1 y AP-3 para comprobar esto. También se tendrá que visualizar la localización de las otras glucán sintasas en el mutante doble *ent3Δ gga22Δ*, para confirmar si hay alguna otra enzima que tenga una disposición alterada.

Por otro lado, tanto Vps27, proteína del ESCRT, como Vps35, proteína del retrómero, son necesarias para el buen mantenimiento de la célula. Las células que carecen de estas proteínas tienen problemas para mantener su morfología ante estrés salino y también en presencia de antifúngicos. Además, mediante la visualización de las vacuolas se pudo ver que en el doble mutante *vps27Δ vps35Δ* está bloqueada la ruta del endosoma tardío a la vacuola, quedándose Cps1 acumulada en el compartimento prevacuolar y en la superficie externa de las vacuolas. En *vps27Δ* la situación es similar, lo que nos indica que Vps35 es incapaz de recuperar estas proteínas y de reciclarlas hacia el *trans*Golgi. Esto también nos confirma que la actividad de Vps27 es anterior a la de Vps35. Estos resultados reafirman los estudios realizados hasta el momento de ambas proteínas (Stewart et al., 2011; Takegawa et al., 2007). Como líneas de investigación futuras sería interesante analizar la distribución de las enzimas glucán sintasa en estos mutantes, así como la de canales y transportadores de iones, para analizar su transporte en ausencia del ESCRT y el retrómero.



## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de este trabajo fueron las siguientes:

1. Las proteínas Ent3 y Gga22 son esenciales para el mantenimiento de la morfología celular. El mutante *ent3Δ gga22Δ* altera la localización de la glucán sintasa Bgs4.
2. La proteína Vps35 participa en el mantenimiento de la pared celular en presencia de fármacos antifúngicos y en el proceso de división celular en presencia de NaCl y MgCl<sub>2</sub>.
3. La integración de la secuencia Ub-GFP-Cps1 en el genoma permite la visualización de las vacuolas y del compartimento prevacuolar con nitidez.
4. La función de la proteína del ESCRT Vps27 en el tráfico vesicular es anterior a la de Vps35. Tanto *vps27Δ* como *vps27Δ vps35Δ* tienen bloqueada la entrada de Cps1 en la vacuola, de forma que se queda acumulada en el compartimento prevacuolar y en la superficie externa de la vacuola.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a la Dra. Henar Valdivieso por acogerme en su laboratorio y haberme enseñado todo lo que he aprendido durante este período. Sin su atención no podría haber llevado a cabo este proyecto. También a mis compañeros Francisco Yanguas, Sandra Moro y Sandra Estepa por prestarme su ayuda en todo lo que he necesitado. Por último, quiero agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la ayuda en este trabajo a través de la concesión de una Beca de Colaboración.

# BIBLIOGRAFÍA

- Bhutta, M. S., B. Roy, G. W. Gould & C. J. McInerny** (2014) A complex network of interactions between mitotic kinases, phosphatases and ESCRT proteins regulates septation and membrane trafficking in *S. pombe*. *PLoS One* 9, e111789.
- Blyth, J., V. Makrantoni, R. E. Barton, C. Spanos, J. Rappsilber & A. L. Marston** (2018) Genes important for *Schizosaccharomyces pombe* meiosis identified through a functional genomics screen. *Genetics* 208, 589-603.
- Bonifacio, J. S. & B. S. Glick** (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-66.
- Burd, C. & P. J. Cullen** (2014) Retromer: a master conductor of endosome sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016774 (doi: 10.1101/cshperspect.a016774).
- Chamberland, J. P. & B. Ritter** (2017) Retromer revisited: evolving roles for retromer in endosomal sorting. *J Cell Biol* 216, 3433-3436.
- Cortés, J. C., J. Ishiguro, A. Durán & J. C. Ribas** (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, 4081-96.
- Cortés, J.C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A. & J.C. Ribas** (2004) 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., M. Konomi, I. M. Martins, J. Muñoz, M. B. Moreno, M. Osumi, A. Durán & J. C. Ribas** (2007) The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol* 65, 201-17.
- Cortés, J. C., M. Sato, J. Muñoz, M. B. Moreno, J. A. Clemente-Ramos, M. Ramos, H. Okada, M. Osumi, A. Durán & J. C. Ribas** (2012) Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol* 198, 637-56.
- Daste, F., T. Galli & D. Taresté** (2015) Structure and function of longin SNAREs. *J Cell Sci* 128, 4263-72.
- Faini, M., R. Beck, F. T. Wieland & J. A. Briggs** (2013) Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol* 23, 279-88.
- Hong, W.** (2005) SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* 1744, 493-517.
- Hoya, M., F. Yanguas, S. Moro, C. Prescianotto-Baschong, C. Doncel, N. de León, M. Curto, A. Spang & M. H. Valdivieso** (2017) Traffic through the trans-golgi network and the endosomal system requires collaboration between exomer and clathrin adaptors in fission yeast. *Genetic* 205, 673-690.
- Humbel, B. M., M. Konomi, T. Takagi, N. Kamasawa, S. A. Ishijima & M. Osumi** (2001) In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 433-44.

- 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, 181-91.
- Iwaki, T., M. Onishi, M. Ikeuchi, A. Kita, R. Sugiura, Y. Giga-Hama, Y. Fukui & K. Takegawa.** (2007). Essential roles of class E Vps proteins for sorting into multi vesicular bodies in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 153, 2753-64.
- Lemmon, S. K.** (2001) Clathrin uncoating: auxilin comes to life. *Curr Biol* 11, R49-52.
- Liu, J., X. Tang, H. Wang & M. Balasubramanian** (2000) Bgs2p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 478, 105-8.
- Lucas, M. & A. Hierro** (2017) Retromer. *Current Biol* 27, 681-701.
- Ma, Y., Jiang, W., Liu, Q., Ryuko, S. & T. Kuno** (2011) Genome-wide screening for genes associated with FK506 sensitivity in fission yeast. *PLoS One* 6, e23422.
- Manners, D.J.M., Meyer, T.** (1977) The molecular structure of some glucans from the cell wall of *S. pombe*. *Carbohydr Res* 57, 189-203.
- Martín, V., B. García, E. Carnero, A. Durán & Y. Sánchez** (2003) Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 2, 159-69.
- Moro, S.** (2018) Implicación del exómero en la respuesta a estrés de *Schizosaccharomyces pombe*. *Tesis de doctorado, Universidad de Salamanca.*
- Muñoz, J., Cortés J.C., Sipiczki, M., Ramos, M., Clemente-Ramos, J.A., Moreno, M., Martins, I., Pérez, P. & J.C. Ribas** (2013) Extracellular cell wall  $\beta(1,3)$  glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J Cell Biol* 203, 265-282.
- Onishi, M., M. Iida, T. Koga, S. Yamada, A. Hirata, T. Iwaki, K. Takegawa, Y. Fukui & H. Tachikawa** (2007) *Schizosaccharomyces pombe* Sst4p, a conserved Vps27/Hrs homolog, functions downstream of phosphatidylinositol 3-kinase Pik3p to mediate proper spore formation. *Eukaryot Cell* 6, 2343-53.
- Rusten, T. E. & H. Stenmark** (2009) How do ESCRT proteins control autophagy? *J Cell Sci* 122, 2179-83.
- Schmidt, O. & D. Teis** (2018) The ESCRT machinery. *Current Biol* 22, 116-120.
- Seaman, M. N.** (2012) The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci* 125, 4693-702.
- Seaman, M. N. J.** (2018) Retromer and the cation-independent mannose 6-phosphate receptor- Time for a trial separation? *Traffic* 19, 150-152.
- Ungermann, C. & D. Langosch** (2005) Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* 118, 3819-28.
- Wartosch, L., Bright, N.A. & P. Luzio** (2015) Lysosomes. *Current Biol* 25, 301-327.
- Wollert, T., D. Yang, X. Ren, H. H. Lee, Y. J. Im & J. H. Hurley** (2009) The ESCRT machinery at a glance. *J Cell Sci* 122, 2163-6.

