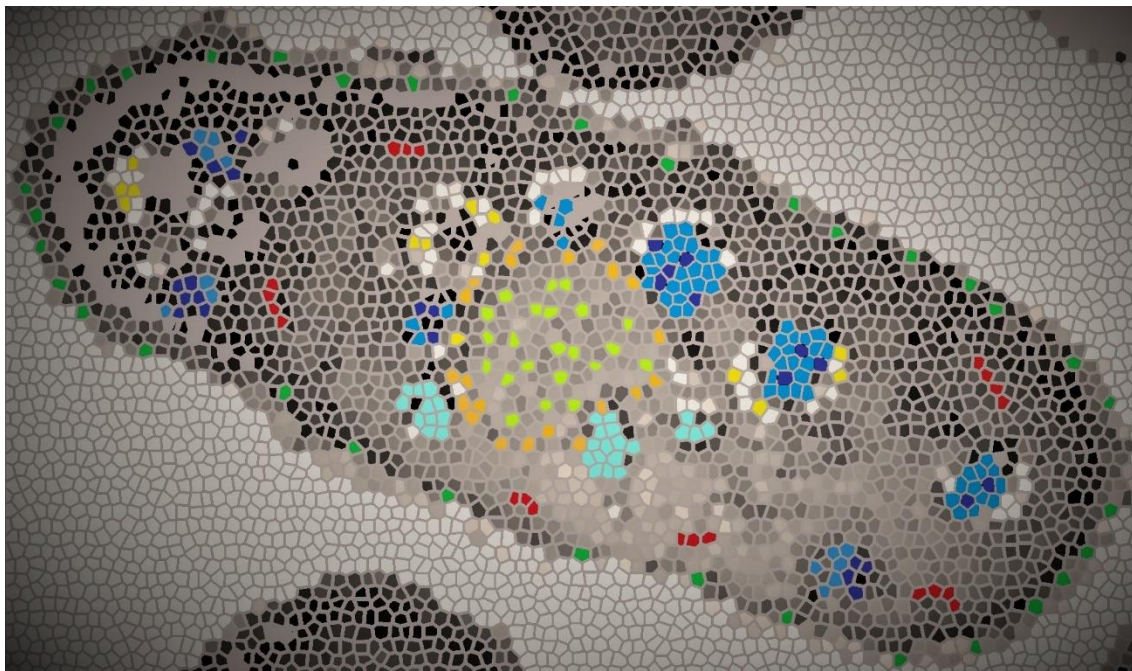


Implicación del exómero en la respuesta a estrés de Schizosaccharomyces pombe

Sandra Moro Román

2018



Departamento de Microbiología y Genética



Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica



TESIS DOCTORAL

Implicación del exómero en la respuesta a estrés de
Schizosaccharomyces pombe

Sandra Moro Román

Salamanca 2018

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de una ayuda de la Universidad de Salamanca/ Banco Santander y de una ayuda FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Gracias a la financiación del Proyecto de la Junta de Castilla y León SA073U14 y de los proyectos del MINECO BFU2013-48582-C2-2-P y BFU2017-84508-P. Gracias a la colaboración de Pilar Pérez y de Kazuhiro Shiozaki y sus laboratorios. Gracias a Y. Sánchez, S. Oliferenko, C. R. Vázquez, J. Cansado, S. Whitehall y S. Moreno por la cesión de cepas y plásmidos.

A mis padres

Abreviaturas, siglas y acrónimos

α -GS	α -Glucán Sintasa
β -GS	β -Glucán Sintasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP	Proteína Adaptadora (<i>Adaptor Polypeptide</i>)
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
BRCT	<i>Breast Cancer C-Terminal</i>
BSA	Seroalbúmina Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDRE	Elemento de respuesta a calcineurina (<i>Calcineurin Dependent Response Element</i>)
CFP	Proteína cian fluorescente (<i>Cyan Fluorescent Protein</i>)
ChAP	<i>Chs5 and Arf binding Protein</i>
CHS	<i>CHitin Synthesis</i>
CHX	Cicloheximida
CIP	Ruta de integridad celular (<i>Cell Integrity Pathway</i>)
COP	<i>Coatomer Protein</i>
DO	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
EE	Endosoma temprano (<i>Early Endosome</i>)
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EGTA	Etilenglicoltetraacético
ERES	<i>Endoplasmic Reticulum Exit Sites</i>
FN3	<i>Fibronectin type III</i>
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GDP	Guanosín Difosfato (<i>Guanosine Diphosphate</i>)
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>

GFP	Proteína verde fluorescente (<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
GGA	<u>G</u> olgi localized, <u>G</u> amma ear containing, <u>A</u> rf binding protein
GTP	<u>G</u> uanosín <u>T</u> rifostato (<u>G</u> uanosine <u>T</u> riphosphate)
HA	Epítipo procedente de la <u>h</u> em <u>a</u> glutina
kb	<u>k</u> ilo <u>b</u> ase
kDa	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
LE	Endosoma tardío (<u>L</u> ate <u>E</u> ndosome)
MAPK	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
MM	<u>M</u> edio <u>M</u> ínimo
MVB	<u>M</u> ulti <u>v</u> esicular <u>B</u> ody
NETO	<u>N</u> ew <u>E</u> nd <u>T</u> ake <u>O</u> ff
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>g</u> <u>F</u> rame
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PI (3,5) P ₂	Fosfatidilinositol (3,5) bisfosfato
PI (4,5) P ₂	Fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luoride
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylidene <u>f</u> luoride
QS	<u>Q</u> uitín <u>S</u> intasa
RE	<u>R</u> etículo <u>E</u> ndoplasmático
RIDD	<u>R</u> egulated <u>I</u> re1 mRNA <u>D</u> ependent <u>D</u> ecay
rpm	<u>r</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto
SAPK	<u>S</u> tress <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
SB	<u>S</u> ample <u>B</u> uffer

SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SGA	<i>Synthetic Genetic Array</i>
SIN	<i>Septum Initiation Network</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide -sensitive factor attachment protein receptor</i>
SPA	<i>Sporulation Agar</i>
TAE	Tris acético EDTA
TBST	<i>Tris Buffered Saline Tween 20</i>
TCA	Ácido Tricloroacético (<i>Trichloroacetic acid</i>)
tER	<i>transient Endoplasmic Reticulum</i>
TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
TM	Tunicamicina
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
TPR	<i>Tetratricopeptide Repeat</i>
UDP	Uridina difosfato (<i>Uridine diphosphate</i>)
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
vic	viable en inmunosupresor y cloruro
WT	Tipo silvestre (<i>Wild Type</i>)
YES	<i>Yeast Extract Supplemented</i>
YFP	Proteína amarilla fluorescente (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)

INTRODUCCIÓN	1
1. Las levaduras como modelo de estudio	3
2. La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
2.1 El ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	4
2.2 Ciclo morfogénético de <i>S. pombe</i> . Citocinesis y septación	5
3. La pared celular de <i>S. pombe</i>	8
3.1 Composición de la pared celular de <i>S. pombe</i>	8
3.2 Biosíntesis de la pared celular de <i>S. pombe</i>	11
3.3 Remodelación y degradación de la pared celular	13
4. El tráfico intracelular en <i>S. pombe</i>	13
4.1 Las vesículas recubiertas de clatrina y los adaptadores	16
4.2 Tráfico vesicular independiente de clatrina: El exómero	18
4.2.1 El exómero de <i>S. cerevisiae</i>	18
4.2.2 El exómero de <i>S. pombe</i>	20
4.3 El flujo iónico en el sistema endosomal	21
5. Homeostasis iónica en <i>S. pombe</i>	22
5.1 Homeostasis del potasio	22
5.2 Homeostasis del calcio	23
6. El retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas	26
6.1 Funciones generales del retículo endoplasmático. Síntesis y plegamiento de proteínas	26
6.2 La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	27
7. Las cascadas de MAPK	28
7.1 La ruta SAPK de respuesta a estrés en <i>S. pombe</i>	29
7.2 La ruta CIP de integridad de <i>S. pombe</i>	31
7.2.1 Las GTPasas Rho y la ruta de integridad	33
7.2.2 Posibles mecanosensores en <i>S. pombe</i>	34
8. Los complejos TOR	36
8.1 El complejo TORC2 de <i>S. pombe</i>	36
8.1.1 Regulación por la Rab GTPasa Ryh1	38
8.1.2 Relación entre TORC2 y la ruta de integridad	38
8.2 El complejo TORC1 en <i>S. pombe</i>	40
ANTECEDENTES Y OBJETIVO	43
RESULTADOS	47
1. Fenotipos de los mutantes del exómero en condiciones de estrés	49
1.1 <i>cfr1Δ</i> es sensible a ciertos compuestos iónicos	50
1.2 <i>cfr1Δ</i> no es sensible a estrés osmótico	51

1.3	<i>cfr1Δ</i> es sensible a cambios en la homeostasis del calcio	53
1.4	<i>cfr1Δ</i> es sensible a DTT y tunicamicina	53
1.5	<i>cfr1Δ</i> es hipersensible a higromicina	54
1.6	<i>cfr1Δ</i> no es sensible a monensina A	55
1.7	<i>cfr1Δ</i> no es sensible a H ₂ O ₂	56
2.	Análisis de la posible implicación de bombas y canales iónicos en el fenotipo de los mutantes del exómero	56
2.1	Búsqueda de interacciones mediante rastreos genéticos	56
2.2	Análisis de canales de potasio descritos	57
3.	Estudio de la posible relación entre el exómero y la ruta de la calcineurina	60
3.1	Existe interacción funcional entre el exómero y los canales de entrada de calcio en presencia de KCl	61
3.2	La sensibilidad de <i>cfr1Δ</i> al cloruro de potasio no se debe a la falta de la calcineurina	62
3.3	La ruta de la calcineurina se activa en ausencia del exómero	63
4.	Análisis de la relación entre el exómero y el estrés en el retículo endoplasmático	65
4.1	El retículo endoplasmático presenta cambios en su morfología/ organización en el mutante <i>cfr1Δ</i> tratado con KCl	65
4.2	En ausencia del exómero se secreta menos Bip1 al medio extracelular	66
4.3	Análisis del fenotipo de las cepas <i>ire1Δ</i> e <i>ire1Δ cfr1Δ</i>	67
4.4	Ire1 es necesaria para la formación de septos aberrantes en los mutantes del exómero en presencia de KCl	69
4.5	Análisis de la activación de la UPR en <i>cfr1Δ</i>	70
4.6	Análisis de la activación de la UPR en presencia de cloruro potásico	72
5.	Estudio de la ruta de respuesta a estrés	73
5.1	Fenotipos del mutante doble <i>sty1Δ cfr1Δ</i>	73
5.2	Fenotipos del mutante <i>wis1DD bch1Δ</i>	75
5.3	Activación de la ruta de estrés en ausencia del exómero	76
6.	Relación entre la ruta de integridad celular y el exómero	77
6.1	Interacción entre <i>cfr1⁺</i> y <i>pmk1⁺ /spm1⁺</i>	77
6.2	La quinasa Pmk1 es necesaria para la formación del septo engrosado en presencia de KCl	79
6.3	Activación de la ruta en ausencia del exómero	79
6.4	Relación entre el exómero y otros componentes de la ruta	82
6.5	Análisis de la activación de la ruta de integridad en mutantes del sistema endosomal tratados con KCl	86
7.	Relación entre el exómero y las rutas TOR	87
7.1	Análisis de interacciones genéticas entre mutantes de los	

complejos TORC1 o TORC2 y del exómero	88
7.2 Interacción entre el exómero y el complejo SEA	90
7.3 En la cepa <i>cfr1Δ</i> la respuesta de la ruta TORC2 a KCl está alterada	92
7.4 Interacción entre el exómero y la GTPasa Ryh1	93
7.4.1 Hay interacción génica entre <i>ryh1⁺</i> y <i>bch1⁺</i>	93
7.4.2 Ryh1 se localiza correctamente en ausencia del exómero	95
7.4.3 La eliminación de Ryh1 y del exómero afectan de distinta manera a la activación de TORC2 en respuesta a KCl	96
7.5 Un sistema endosomal dañado presenta defectos en la respuesta a cloruro de potasio	97
7.5.1. El KCl daña el sistema endosomal tardío	98
7.5.2. Existe interacción entre GGAs y el exómero en presencia de estrés	99
7.5.3. Mutantes de los adaptadores AP-1 y GGA no muestran el mismo defecto en la actividad TORC2 que los mutantes del exómero	100
7.5.4. Ppk32 no actúa en la respuesta a KCl mediada por TORC2	102
7.6 Análisis de la relación entre el cloruro de potasio, el exómero y la autofagia	103
8. Relación entre la ruta de TORC2 y la ruta de estrés en ausencia del exómero	105
9. Relación entre la ruta TORC2 y la ruta de integridad en ausencia del exómero	106
DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	129
MATERIALES Y MÉTODOS	133
1. Microorganismos utilizados	135
2. Medios de cultivo	135
2.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	135
2.2 Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	136
3. Condiciones y análisis de crecimiento	137
3.1 Condiciones de cultivo para el crecimiento de <i>E. coli</i>	137
3.2 Condiciones de cultivo para el crecimiento vegetativo de <i>S. pombe</i>	137
3.3 Ensayos de crecimiento en gota	138
3.4 Condiciones especiales de crecimiento de <i>S. pombe</i>	139
3.5 Condiciones de cultivo para la conjugación de <i>S. pombe</i>	139
4. Cruces genéticos y aislamiento de ascosporas	139
4.1 Conjugación	139
4.2 Aislamiento de ascosporas al azar	140
4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: análisis de tétradas	140

5. Procedimientos generales de biología molecular	141
5.1 Vectores utilizados	141
5.1.1 Vectores de <i>E. coli</i>	141
5.1.2 Vectores de <i>S. pombe</i>	142
5.2 Obtención del ADN	143
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	143
5.4 Manipulación de ADN	144
5.5 Secuenciación de ADN	144
5.6 Transformación	145
5.6.1 Transformación de <i>E. coli</i>	145
5.6.2 Transformación de <i>S. pombe</i>	145
5.7 Construcciones realizadas	146
5.7.1 <i>gas2</i> ⁺ fusionado al promotor y al terminador <i>nda2</i> ⁺	146
6. Análisis de proteínas	147
6.1 Obtención de extractos celulares	147
6.1.1 Obtención de extractos celulares para el análisis de proteínas de membrana	148
6.2 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	148
6.3 Inmunodetección de proteínas	149
6.4 Ensayo de <i>immunoblot</i> de colonias (<i>Dot Blot</i>)	149
6.5 Anticuerpos utilizados	150
7. Análisis de la activación de Sty1 y de Pmk1	151
8. Análisis de la actividad TORC2	152
9. Técnicas microscópicas	153
9.1 Microscopía de campo claro y de contraste de fases	153
9.2 Microscopía de fluorescencia	153
9.2.1 Fluorescencia directa con proteínas de fusión	154
9.2.2 Tinción con Hoechst 33258	154
9.3 Microscopía electrónica	155
9.4 Microscopios y equipos utilizados	155
10. Análisis bioinformático de los datos	155
11. Bases de datos utilizadas	156
ANEXO	157
BIBLIOGRAFÍA	173

Introducción

1. Las levaduras como modelo de estudio

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* son dos de las especies más comúnmente empleadas como modelos de investigación en biología molecular. Ambas especies poseen una serie de características que las convierten en excelentes organismos modelo. Son microorganismos eucariotas unicelulares que, aun estando muy separados evolutivamente de los metazoos, comparten procesos celulares con los organismos superiores. Además, está descrito que el 25% de los genes humanos causantes de enfermedades presentan un homólogo en levaduras (Bassett et al., 1996). Por estas razones, la investigación con levaduras permite el conocimiento y la comprensión de mecanismos moleculares similares a los acontecidos en cáncer, enfermedades neurodegenerativas y en otras enfermedades y trastornos humanos. Son sistemas fácilmente manejables en el laboratorio, pues cuentan con un ciclo de vida rápido y no son patógenos. La manipulación genética es sencilla, lo que permite crear cepas que no expresen determinados genes, que los expresen de manera regulada o cepas que expresen proteínas unidas a epítomos para estudios bioquímicos y de biología celular.

El genoma de ambas levaduras está secuenciado, hecho que amplía el conocimiento sobre ambos organismos; el genoma de *S. cerevisiae* se publicó en 1996 (Goffeau et al., 1996) y el de *S. pombe* se publicó en 2002 (Wood et al., 2002).

2. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

El presente trabajo se ha llevado a cabo utilizando la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Esta levadura es un hongo unicelular perteneciente a los ascomicetos. Su genoma está formado por 4.824 genes repartidos en los tres cromosomas: cromosoma I (5,7 Mb), II (4,6 Mb) y III (3,5 Mb). La información acerca de los genes se encuentra disponible en la página web: <http://www.pombase.org>.

La descripción de la levadura *S. pombe* la realizó P. Lindner en 1893 tras aislar este organismo de una cerveza en el este de África. De este descubrimiento deriva el epíteto específico *pombe* que significa cerveza en suajili. Las cepas actualmente utilizadas en el laboratorio no derivan de esa primera aislada de una cerveza, sino que proceden de la estirpe homotática h^{90} aislada por Ostewalder de un zumo de uva en 1921; a partir de esa cepa se obtuvieron las cepas de ambos tipos sexuales: h^+ y h^- (Leupold, 1950).

2.1 El ciclo de vida de *S. pombe*

Las células de *S. pombe* tienen forma cilíndrica y en condiciones normales son haploides. Su crecimiento tiene lugar de modo polarizado por extensión de los extremos y la división se produce mediante fisión cuando la célula madre alcanza el tamaño adecuado. El mecanismo de citocinesis y septación de esta levadura se describen más adelante.

En el ciclo de vida de la levadura de fisión se alternan las fases haploide y diploide en función de una serie de factores ambientales y de la interacción entre células de tipo sexual opuesto. Las células haploides son de dos tipos sexuales complementarios, h^+ o h^- . En ausencia de nitrógeno las células de tipo sexual opuesto entran en contacto, conjugan y forman un cigoto. Este cigoto es diploide pero muy inestable, de manera que rápidamente tiene lugar la división meiótica de su núcleo generándose un asca zigótica con cuatro ascosporas haploides en su interior. En el momento en el cual las condiciones ambientales vuelven a ser favorables se produce la dehiscencia del asca y la consiguiente liberación de las esporas al exterior. Las ascosporas germinan reiniciando la fase haploide del ciclo. El ciclo de vida se puede observar en la **figura 1**. Se pueden mantener los cigotos diploides en medio rico antes de que ocurra la meiosis, iniciándose un ciclo mitótico diploide, pero en el momento en el que se empobrezca el medio se producirá la formación de un asca azigótica con cuatro ascosporas haploides.

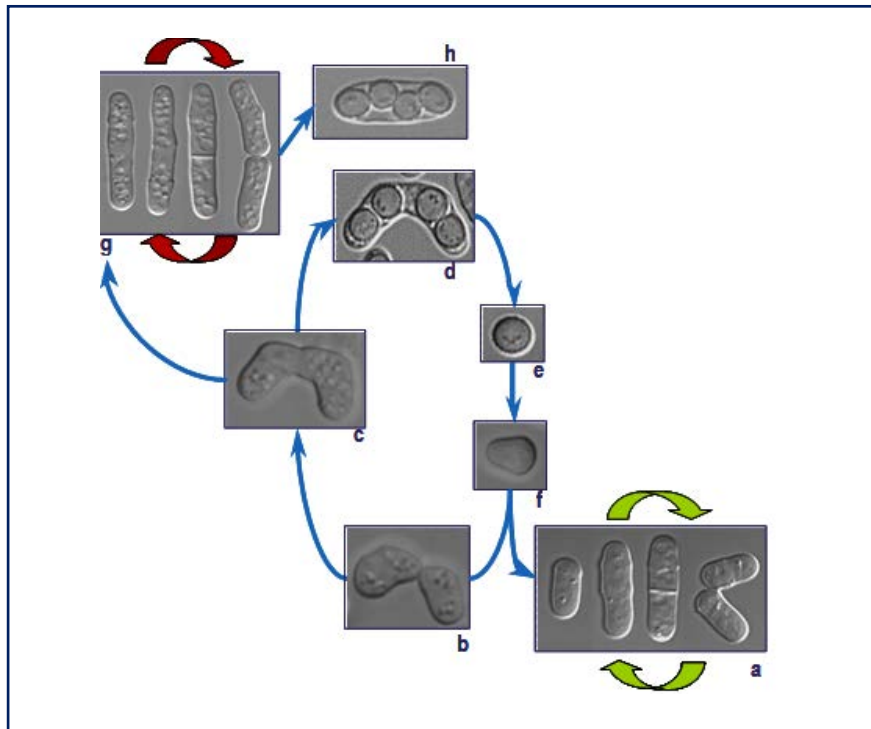


Figura 1. Ciclo de vida de *S. pombe*.

- División por fisión de las células.
- Conjugación entre células de tipo sexual opuesto.
- Formación del cigoto.
- División meiótica y formación del asca zigótica.
- Ascospora.
- Germinación de la ascospora en condiciones favorables.
- Ciclo mitótico diploide.
- Asca azigótica.

Además de las estirpes heterotálicas, h^+ y h^- , existe una estirpe homotálica h^{90} que debe su nombre a que el 90% de las células forman esporas. Las células de esta estirpe son capaces de cambiar de tipo sexual cada dos generaciones, por este motivo una sola célula origina una colonia de células que pueden conjugarse entre sí cuando las condiciones del medio son limitantes.

2.2 Ciclo morfogenético de *S. pombe*. Citocinesis y septación

Las células de *S. pombe* crecen de manera polarizada y asimétrica por extensión de los polos, manteniendo un diámetro constante equivalente a 3-4 μm a lo largo de su ciclo de vida. En el momento en el que la célula alcanza una longitud de 12-15 μm se produce la citocinesis y la formación del septo de

división; este septo será posteriormente degradado para permitir la generación de dos células hijas de 7-8 μm de longitud.

En un primer momento las células crecen por el polo viejo, con un crecimiento monopolar que tiene lugar en las fases G_1/S y parte de la fase G_2 . En un determinado momento de la fase G_2 se produce la inducción del crecimiento bipolar mediante un mecanismo denominado NETO (*New End Take Off*) (Mitchison and Nurse, 1985). Cuando se alcanza el tamaño crítico cesa el crecimiento, tiene lugar el inicio de la fase M (mitosis) y ocurre la citocinesis. Durante todo el ciclo celular son indispensables las funciones del citoesqueleto de actina y de microtúbulos para el mantenimiento de la forma celular.

La citocinesis es un proceso, regulado temporal y espacialmente, mediante el cual se reparten los componentes de la célula madre entre las dos células hijas. Este mecanismo se encuentra muy conservado, la división por fisión de *S. pombe* y su proceso de citocinesis comparten muchos elementos con los metazoos. Durante la citocinesis tienen lugar las siguientes etapas (**figura 2A**):

- Selección del sitio de división celular: el sitio de división queda determinado por la posición del núcleo en la transición entre G_2 y fase M. La proteína Mid1 promueve la acumulación de los componentes del anillo de actomiosina en la zona media celular (Sohrmann et al., 1996; Paoletti and Chang, 2000)
- Ensamblaje del anillo contráctil: una vez que Mid1 se encuentra localizada en el córtex de la zona media celular se produce el reclutamiento y ensamblaje de otras proteínas a esa zona del ecuador celular. Estas proteínas son: Myo2 (la cadena pesada de la miosina de tipo II), Cdc4 y Rlc1 (las cadenas reguladoras de la miosina) y Rng2 (Motegi et al., 2004). Posteriormente se incorporan Cdc15 (una proteína con un dominio F-BAR implicada en la curvatura de la membrana) y Cdc12 (la formina, implicada en la nucleación de la actina) (Carnahan and Gould, 2003; Kovar et al., 2003; Wu et al., 2003). A partir de ese momento se unen proteínas relacionadas con la actina, como son: la profilina, el complejo Arp2/3, la miosina Myo1 y Wsp1. Todas ellas contribuyen a la polimerización de la actina y a la compactación del anillo hasta su

maduración en el momento en el que se une Myo3 (otra miosina de tipo II). La proteína Chs2 (ver más adelante) participa en el anclaje del anillo a la membrana (Martin-Garcia et al., 2003; Martin-Garcia and Valdivieso, 2006).

- Contracción del anillo de actomiosina: este proceso ocurre al final de anafase B y depende de un complejo proteico que constituye la ruta denominada SIN (*Septum Initiation Network*) (Simanis, 2003), que permite la coordinación entre el ciclo celular y la citocinesis. El complejo SIN incluye a: Spg1, Cdc7, Cdc11, Sid4, Cdc14, Sid1, Sid2 y Bgs1, todos estos componentes funcionan en una cascada de proteínas quinasas reguladas por GTPasas (McCollum and Gould, 2001).
- Incorporación de nuevo material de membrana: con este proceso se consigue que se produzca un incremento en la superficie de membrana celular entre las células hijas. La incorporación tiene que estar coordinada con la contracción del anillo de actomiosina. Durante esta fase son muy importantes los dominios de membrana ricos en esteroides conocidos como *lipid rafts*, la formación de estos dominios de membrana depende de Cdc15, una proteína que hace de nexo entre la membrana y el anillo (Willet et al., 2015). Para la unión entre la membrana y el anillo también son necesarias: la paxillina Pxl1, Fic1, Rgf3, Rga7 y una proteína similar a Cdc15 denominada Imp2 (Demeter and Sazer, 1998; Pinar et al., 2008; Roberts-Galbraith et al., 2009; Martin-Garcia et al., 2014; Ren et al., 2015; Perez et al., 2016). Rgf3 es un GEF de Rho1 que permite la activación de las enzimas β -glucán sintasas (Bgs) y la síntesis de glucano (Arellano et al., 1996; Tajadura et al., 2004), Cdc15 permite el transporte desde el Golgi hasta la membrana de Bgs1 y Rga7 contribuye al transporte de Bgs4 hacia la membrana plasmática (Arasada and Pollard, 2014; Arasada and Pollard, 2015).
- Síntesis y degradación del septo de división: a medida que se va incorporando material de membrana es necesario que se deposite material de pared celular en el septo. La síntesis del septo la llevan a cabo las glucán-sintasas Ags1, Bgs1, Bgs3 y Bgs4, todas ellas se describen en un subapartado posterior.

Además, Bgs1 es un componente de la ruta SIN. Los procesos de tráfico vesicular (la endocitosis y la exocitosis) son muy importantes para la formación del septo.

Una vez se ha concluido la síntesis del septo tiene que producirse su degradación controlada, lo que permitirá la separación final de las dos células hijas. Son las glucanasas, Agn1 y Eng1 principalmente, las enzimas encargadas de llevar a cabo esa degradación. Para que las glucanasas se localicen correctamente es necesaria la acción de las septinas, unas proteínas que forman un anillo no contráctil en el ecuador celular, y el exocisto (Martin-Cuadrado et al., 2005).

3. La pared celular de *S. pombe*

La pared celular es una estructura rígida, externa a la membrana plasmática, que otorga protección a la célula frente a la lisis osmótica o a los daños mecánicos. Es una estructura fundamental para determinar la morfología celular puesto que, a pesar de ser rígida, es dinámica, permitiendo la adaptación a las distintas morfologías que ha de adoptar la célula a lo largo del ciclo de vida. Su dinamismo se basa en su capacidad para responder a los estímulos externos a los que están sometidas las células, manteniendo siempre la integridad celular a través de la coordinación entre el crecimiento y continuos procesos de síntesis y degradación.

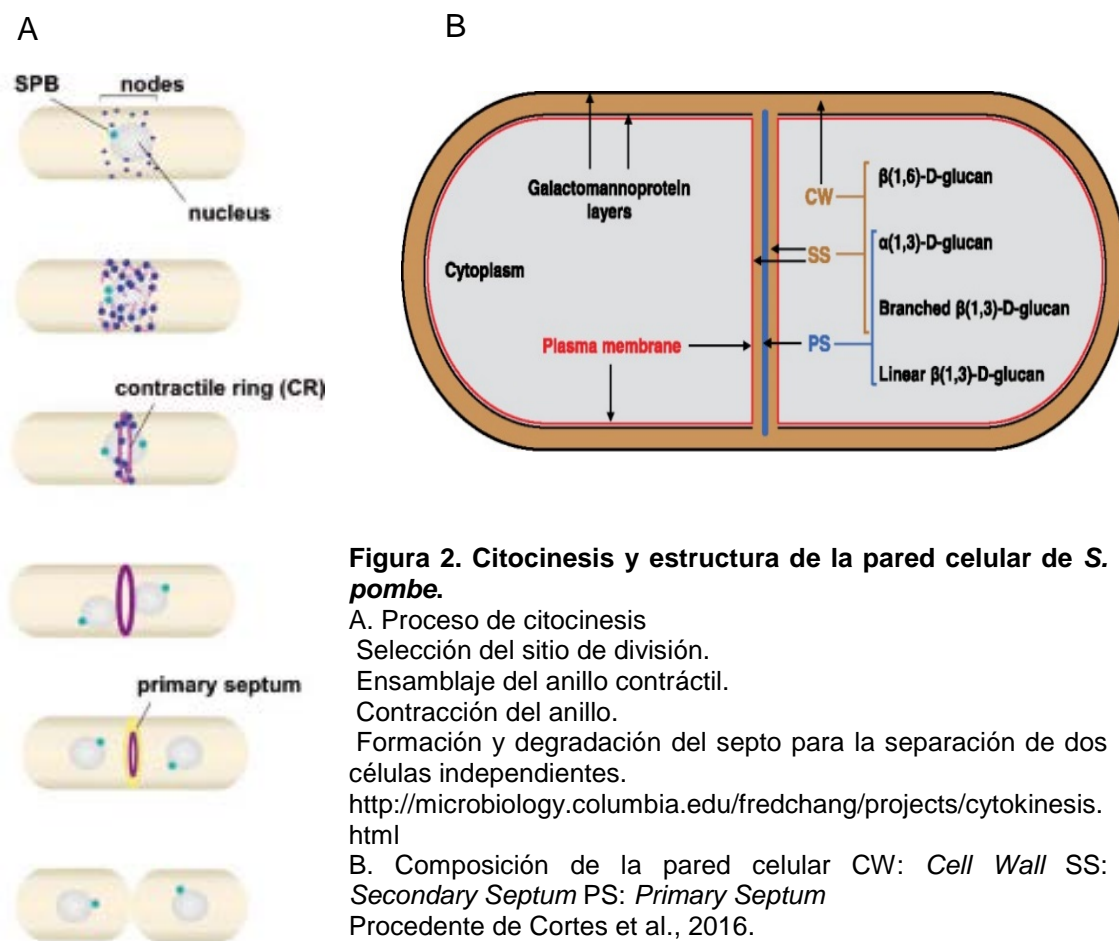
El estudio de la pared celular es muy importante por ser un elemento fundamental para la morfología y la supervivencia de las células fúngicas. Esta estructura no está presente en las células animales, por esta razón se convierte en una buena diana para fármacos antifúngicos que no provoquen daños a las células del hospedador.

3.1 Composición de la pared celular de *S. pombe*

La pared celular de la levadura de fisión se observa como una estructura trilaminar al microscopio electrónico de transmisión. Presenta una capa externa

y otra interna densa a los electrones formadas por galactomanano y una zona media menos densa a los electrones formada por glucanos (Horisberger et al., 1978; Osumi, 1998; Humbel et al., 2001) (Figura 2B)

El septo de división presenta también dos capas densas a los electrones que se corresponden con el septo secundario y una menos densa a los electrones denominada septo primario (Humbel et al., 2001; Cortes et al., 2007). El septo secundario formará la pared celular de las células hijas (Figura2B).



Los componentes de la pared celular son los siguientes:

- Glucanos: Existen cuatro tipos de glucanos en la pared celular, siendo el β -glucano el componente principal de la pared.

- $\beta(1,3)$ -glucano lineal: este glucano no presenta ramificaciones. Se creía que solo estaba presente en el septo primario, pero se ha visto que también está presente, aunque en menor cantidad, en la pared celular (Humbel et al., 2001; Cortes et al., 2007).
- $\beta(1,3)$ -glucano con ramificaciones $\beta(1,6)$: está formado por cadenas lineales de residuos de glucosa unidos mediante enlace $\beta(1,3)$ con ramificaciones laterales en $\beta(1,6)$. Es el componente mayoritario de la pared celular (Manners and Meyer, 1977).
- $\beta(1,6)$ -glucano: está formado por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1,6)$ con ramificaciones en $\beta(1,3)$. Es un componente minoritario de la pared celular (Manners and Meyer, 1977).
- α -glucano: está formado por unidades de glucosa unidas mediante enlace $\alpha(1,3)$ con una pequeña proporción de enlaces $\alpha(1,4)$. Constituye casi un tercio de la pared celular de la levadura de fisión (Manners and Meyer, 1977). La distribución de este polímero no está muy bien descrita (Sugawara et al., 2003; Grun et al., 2005).
- Galactomanano: constituye el componente glucídico de las glicoproteínas presentes en la pared celular. Representa una décima parte de la pared celular y está formado por residuos de manosa unidos en enlaces $\alpha(1,6)$ con cadenas laterales unidas mediante enlaces $\alpha(1,2)$. Se encuentra presente tanto en la capa externa como en la proximidad de la membrana plasmática (Horisberger et al., 1978).
- Quitina: la presencia de este polímero de N-acetilglucosamina en la pared celular de *S. pombe* es motivo de controversia. No ha sido posible su detección utilizando difracción de rayos X o tinción con lectina aglutinina de germen de trigo (Kreger, 1954; Horisberger et al., 1978).

3.2 Biosíntesis de la pared celular de *S. pombe*

- β -glucano: como ya se ha descrito con anterioridad este compuesto es el mayoritario en la pared celular y existen diferentes tipos de β -glucanos. Es responsable de la fuerza mecánica y del mantenimiento de la forma de las células (Cortes et al., 2002). La enzima responsable de la biosíntesis del $\beta(1,3)$ -glucano se denomina $\beta(1,3)$ -glucán sintasa [UDP-glucosa: $\beta(1,3)$ -D-glucano-3- β -D-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.34]. Esta enzima (β GS) se localiza en la membrana plasmática y emplea como sustrato UDP-glucosa. La actividad β GS está formada por una subunidad reguladora, la GTPasa Rho (Arellano et al., 1996), y una subunidad catalítica. Se han descrito cuatro isoformas de la subunidad catalítica, unas proteínas denominadas Bgs1 a Bgs4 que tienen un elevado peso molecular (>200 kDa) y numerosos dominios transmembrana. Bgs1, Bgs3 y Bgs4 se localizan en el ecuador celular (Cortes et al., 2002; Liu et al., 2002; Mulvihill et al., 2006) y en los polos de crecimiento (Cortes et al., 2005; Cortes et al., 2007). También se encuentran en estructuras intracelulares que se observan como puntos dispersos por el citoplasma, puntos que seguramente se correspondan con estructuras membranosas implicadas en su transporte a la membrana plasmática.

Bgs1 sintetiza el $\beta(1,3)$ -glucano lineal del septo primario (Humbel et al., 2001; Cortes et al., 2002) y tiene un papel importante en el proceso de citocinesis. Cuando la expresión del gen *bgs1⁺* se reprime las células no son capaces de degradar el septo y aparecen células encadenadas (Cortes et al., 2007). Bgs2 es necesaria para el proceso de esporulación, pero no tiene un papel destacado en el crecimiento vegetativo (Liu et al., 2000; Martin et al., 2000). Bgs3 es importante para la viabilidad celular y para la polaridad, aunque su función concreta se desconoce (Martin et al., 2003). Bgs4 es necesaria para el mantenimiento de la integridad celular tanto en el crecimiento polarizado como en la citocinesis. Sintetiza el glucano de la pared celular y del septo secundario y es la responsable de la mayor parte de actividad β GS *in vitro*, además es necesaria para acoplar el crecimiento del septo con la contracción del anillo de actomiosina y con la formación de nueva membrana plasmática,

para la completa formación del septo primario y para la formación del septo secundario (Cortes et al., 2005; Munoz et al., 2013).

- α -glucano: la síntesis de este componente se lleva a cabo por la α -glucán sintasa (α GS). El gen *ags1⁺/mok1⁺* codifica una proteína integral de membrana de alto peso molecular homóloga a proteínas implicadas en la síntesis de α -glucano, por esta razón se considera un componente de la actividad α GS (Hochstenbach et al., 1998; Katayama et al., 1999). Ags1 se localiza en los sitios de crecimiento activo (polos y septo) y también en el anillo de actomiosina, coincidiendo con Bgs1. Ags1 es necesaria para la correcta formación del septo primario y la síntesis del septo secundario; su ausencia provoca problemas en la integridad del septo, así como problemas en la separación final de las dos células hijas (Cortes et al., 2012). Existen otros cuatro genes implicados en la síntesis del α -glucano de las ascosporas (Garcia et al., 2006).
- Galactomanano y manoproteínas: las proteínas son glicosiladas en el retículo endoplasmático (RE) y en el Golgi para, posteriormente, ser secretadas a la pared celular y quedar unidas a la membrana o a la matriz de glucanos de la pared celular (Gemmill and Trimble, 1999). Se han descrito varios genes implicados en la formación de estos compuestos: las galactosiltransferasas *gma12⁺* y *gmh3⁺* (Chappell and Warren, 1989; Yoko-o et al., 1998), y las manosiltransferasas *och1⁺* (Yoko-o et al., 2001), *oma1⁺*, *oma2⁺* y *oma4⁺* (Tanaka et al., 2005; Willer et al., 2005).
- Quitina: no existen cantidades detectables de quitina en la pared celular de *S. pombe*; sin embargo, sí existen genes similares a los genes *CHS* (*CHitin Synthesis*), los que codifican las enzimas con actividad quitín-sintasa (QS) y sus reguladores.

Chs1: es una auténtica QS necesaria para la esporulación (Arellano et al., 2000). Chs2 carece de actividad catalítica pero ayuda a mantener la integridad del anillo contráctil de actomiosina durante la contracción (Martin-Garcia et al., 2003; Martin-Garcia and Valdivieso, 2006). Cfh1, Cfh2, Cfh3 y Cfh4 son proteínas similares a Chs4 de *S. cerevisiae*; Cfh3 es necesaria para

la estabilidad de Bgs1 en el septo, principalmente en condiciones de estrés producido por KCl (Sharifmoghadam and Valdivieso, 2009; Sharifmoghadam et al., 2012); Cfr1 es similar a Chs5 de *S. cerevisiae* y Bch1 es similar a las ChAPs de *S. cerevisiae* (Hoya et al., 2017); estas dos proteínas conforman el exómero de *S. pombe*, objeto de estudio de este trabajo y que se describirá en apartados posteriores de esta Introducción.

3.3 Remodelación y degradación de la pared celular

La pared celular tiene que sufrir cambios a lo largo del ciclo de vida de la levadura, por esta razón es un elemento muy dinámico que requiere de procesos de degradación y remodelación continuos.

La glucanasa Exg2 y las $\beta(1,3)$ -glucanosiltransferasas Gas1 y Gas2 se localizan en los polos celulares para degradar la pared y mantener la integridad celular durante el crecimiento vegetativo (de Medina-Redondo et al., 2010; Duenas-Santero et al., 2010). Las endoglucanasas Eng1 y Agn1 degradan el septo para completar la separación celular (Dekker et al., 2004; Duenas-Santero et al., 2010).

Una vez son sintetizadas, todas las enzimas implicadas en la síntesis, degradación y remodelación de la pared celular deben ser transportadas hasta la membrana plasmática para que puedan ejercer su función. Este transporte se lleva a cabo por los mecanismos de tráfico intracelular a través del sistema de endomembranas.

4. El tráfico intracelular en *S. pombe*

El sistema de endomembranas de las células eucariotas está formado por un conjunto de orgánulos: el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, el sistema endosomal y los lisosomas (en células animales) o las vacuolas (en plantas y levaduras). En la **figura 3A** se muestra un esquema general del sistema de endomembranas, sobre el que distintos organismos han sufrido algunas adaptaciones (Scott et al., 2014). En general, el sistema de

endomembranas y los mecanismos de tráfico intracelular de *S. pombe* están poco caracterizados, por lo que a continuación se describe el sistema general, mencionándose aquellos aspectos conocidos en la levadura de fisión.

En un principio, las proteínas sintetizadas deben ser transferidas al retículo endoplasmático. La translocación puede ocurrir de dos modos distintos: co-traducciona l o post-traducciona l (Zimmermann et al., 2011). En el retículo endoplasmático tiene lugar la maduración y el procesamiento de las proteínas. Una vez han adquirido el plegamiento proteico adecuado tiene lugar la salida de las proteínas a través de los lugares conocidos como ERES (*Endoplasmic Reticulum Exit Sites*), sitios libres de ribosomas del retículo endoplasmático de donde emergen las vesículas COPII.

Las vesículas COPII tienen como destino el aparato de Golgi, orgánulo por el que pasan un tercio de las proteínas sintetizadas en la célula. Tradicionalmente, el aparato de Golgi se ha dividido en *cis*, medial, *trans* y el TGN (*Trans-Golgi Network*) (Farquhar, 1997). El tráfico retrógrado entre los distintos compartimentos y hacia el retículo ocurre en vesículas COPI. En el modelo más aceptado en la actualidad se produce la maduración de cada cisterna pasando esta de ser *cis* a *trans* a medida que adquiere distintas GTPasas Rab y Arf y fosfolípidos. En los distintos compartimentos tienen lugar distintos procesos, desde la modificación del estado de glicosilación de las proteínas hasta la formación de vesículas para la distribución hacia los distintos orgánulos celulares (Day et al., 2013; Guo et al., 2014; Papanikou and Glick, 2014). El TGN se ha considerado como el principal centro de distribución de proteínas y lípidos de la célula (formándose microdominios especializados), aunque algunos resultados recientes indican que la distribución de proteínas podría iniciarse en el *cis* Golgi (Chen et al., 2017).

Para la formación de las vesículas son necesarios una serie de pasos: concentración de las proteínas cargo en la zona específica de la membrana del orgánulo donador, gemación de la vesícula, transporte de la vesícula a través del citoesqueleto y reconocimiento de la vesícula en el orgánulo aceptor. Para cada uno de estos pasos son necesarios una serie de componentes: las GTPasas pequeñas de las familias Rab, Arf y Rho, las cubiertas vesiculares y

los adaptadores, el citoesqueleto y los factores amarra (*tethers*) y de anclaje (*docking*, constituidos por los SNAREs).

Desde el TGN las proteínas llegan en vesículas a los endosomas, dentro del sistema endosomal se habla de endosomas tempranos (EEs) y endosomas tardíos (LEs). Además, las proteínas pueden llegar a los endosomas a través de la endocitosis.

La identidad de cada endosoma viene marcada por las GTPasas capaces de activarse en él y los fosfoinosítidos que se encuentran presentes (según las quinasas y fosfatasas presentes en cada estadio de maduración de los endosomas) (Behnia and Munro, 2005; Daboussi et al., 2012; Guo et al., 2014). A lo largo de la maduración de los endosomas se va produciendo el cambio de su contenido iónico y del pH, que se va acidificando hasta alcanzar el valor más bajo en la vacuola. Desde los endosomas las proteínas pueden ir a la membrana plasmática, volver al TGN o ser enviadas a la vacuola para su degradación. Es necesario un exhaustivo control espacio-temporal que marque el destino de cada molécula cargo.

Estudios recientes ponen en duda que la compartimentalización de los distintos orgánulos membranosos sea tan clara, así, en el caso de la levadura de gemación *S. cerevisiae*, donde el aparato de Golgi es de tipo vesicular y no presenta cisternas, la división entre TGN y endosomas tempranos se ha puesto en duda (Day et al., 2018). En el caso de *S. pombe*, donde el aparato de Golgi presenta cisternas (Ayscough et al., 1993), la presencia de fosfatidilinositol-3-fosfato (propio de endosomas tempranos en otros organismos), se detecta en estructuras adyacentes a las vacuolas (Hoya et al., 2017).

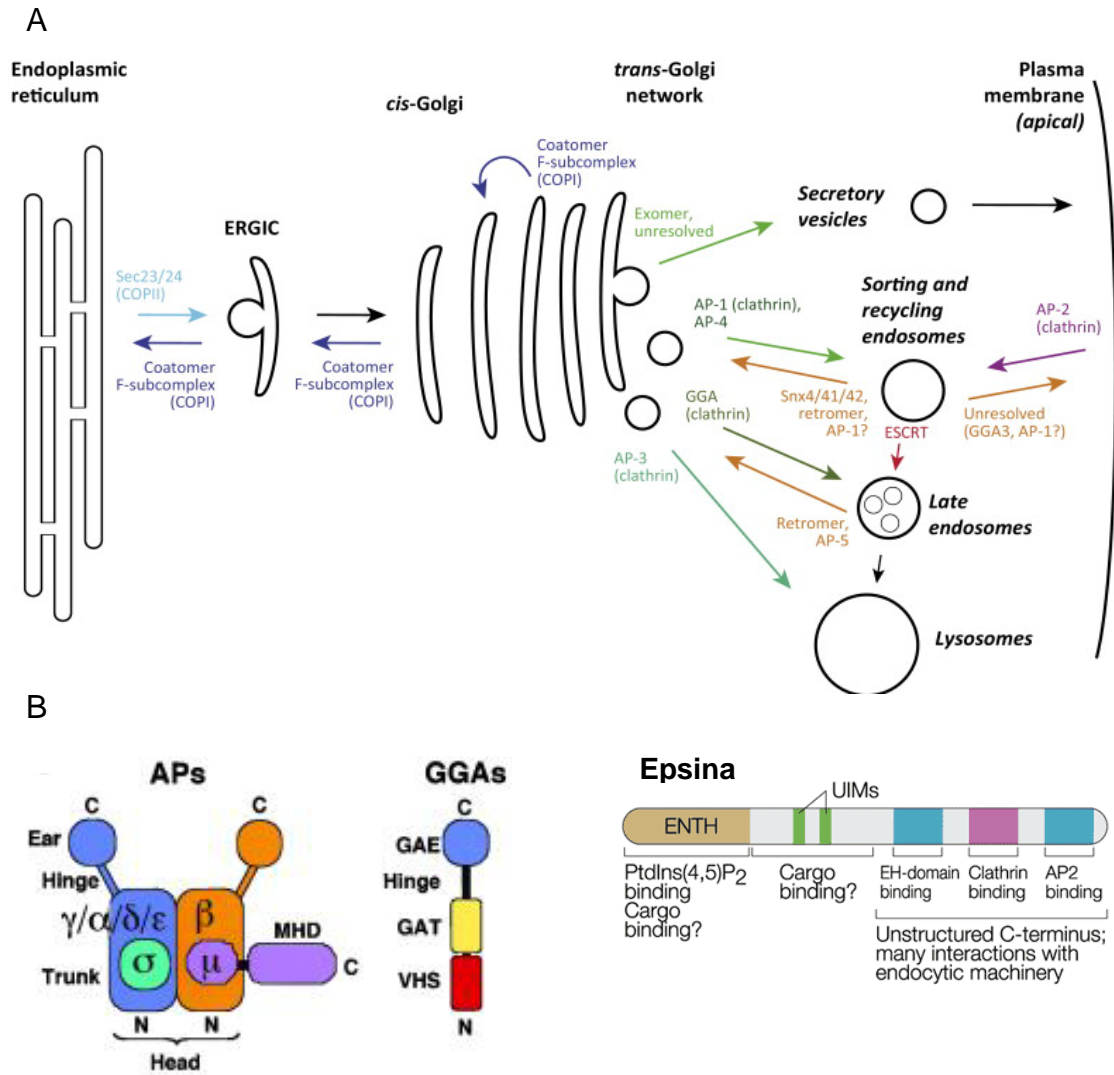


Figura 3. Tráfico vesicular y adaptadores de clatrina.

A. Esquema general del tráfico vesicular procedente de Paczkowski et al., 2015. Los distintos tipos de vesículas, según los adaptadores y las cubiertas presentes, participan en el tráfico entre diferentes orgánulos subcelulares.

B. Estructuras de los adaptadores de clatrina: complejos APs, GGAs y epsinas. Procedentes de Boehm and Bonifacino, 2001 y Wendland et al., 2002.

4.1 Las vesículas recubiertas de clatrina y los adaptadores

Las vesículas que median el tráfico entre los distintos orgánulos pueden estar recubiertas o no por clatrina. Si las vesículas presentan una cubierta de clatrina necesitan unas proteínas o complejos denominados adaptadores, por carecer la clatrina de sitios de unión a las membranas y a los cargos. Los adaptadores conocidos se muestran en la **figura 3B**, y son:

- Complejos adaptadores APs: son heterotetrámeros formados por dos subunidades mayores denominadas adaptinas, una subunidad mediana y una subunidad pequeña (Boehm and Bonifacino, 2001). Las distintas subunidades tienen la capacidad de unirse a la clatrina y a las moléculas cargo (Paczkowski et al., 2015).

El complejo AP-1 participa en el tráfico entre el TGN y los endosomas (Boehm and Bonifacino, 2001); AP-2 participa en la endocitosis, actuando entre la membrana plasmática y los endosomas, y AP-3 en el transporte entre el TGN y las vacuolas (Boehm and Bonifacino, 2001).

De todos los complejos AP para el presente trabajo es interesante el complejo AP-1. En el caso de *S. pombe*, se ha descrito que la pérdida de *apm1+* (Apm1, es la que media la interacción con el cargo) causa múltiples fenotipos: sensibilidad al inmunosupresor FK506, letalidad sintética con el mutante de la calcineurina, sensibilidad a cloruros de magnesio y potasio, aparición de estructuras membranosas conocidas como cuerpos de Berkeley, defectos en septación, sensibilidad a β -glucanasas, problemas en la fusión de las vacuolas y reducción de la secreción (Kita et al., 2004; Ma et al., 2009).

La proteína reguladora Sip1 media la interacción entre la GTPasa Rho3 (implicada en secreción) y el complejo AP-1 (Apm1). La delección de cada uno de esos tres genes provoca fenotipos muy similares (Kita et al., 2011; Yu et al., 2012; Yu et al., 2013).

- Los GGAs (*Golgi-localized, Gamma-ear containing, Arf-binding proteins*): son proteínas monoméricas que participan en el tráfico entre el TGN y los endosomas, aunque su función exacta no está bien caracterizada. En *S. pombe* existen dos, Gga21 y Gga22. Los GGAs están formados por un dominio VHS (Vps27, Hrs, STAM), un dominio GAT (GGA and TOM) y un dominio GAE (*Gamma-Adaptin Ear*). Revisado por Boehm y Bonifacino (Boehm and Bonifacino, 2001).

- Las epsinas: son proteínas monoméricas que participan en el tráfico entre el TGN y los endosomas. Presentan un dominio ENTH (*Epsin N-terminal Homology*), necesario para la unión al cargo y al fosfoinosítido, y un dominio largo que se une a otros adaptadores de clatrina (Ford et al., 2002; Owen et al., 2004). En *S. pombe* existen dos epsinas: Ent1, implicada en endocitosis, y Ent3, que se localiza en el Golgi pero que aún no está bien caracterizada.

4.2 Tráfico vesicular independiente de clatrina: El exómero

4.2.1 El exómero de *S. cerevisiae*

El exómero es un complejo proteico que media el tráfico de ciertas proteínas entre el TGN y la membrana plasmática. Este complejo fue descrito en la levadura de gemación *S. cerevisiae*; en un principio fue considerado como una nueva cubierta por su capacidad de unirse a membranas *in vitro*, pero, posteriormente, fue considerado un adaptador por no ser capaz de deformar las membranas por sí mismo (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006) En la actualidad se considera que posee características tanto de cubierta como de adaptador, tras descubrirse que alguno de sus componentes sí tiene la capacidad de vesicular membranas (Paczkowski and Fromme, 2014).

El exómero es un heterotetrámero formado por dos copias de la proteína Chs5 y dos miembros de la familia de proteínas denominadas ChAPs (*Chs5 and Arf1 binding proteins*) formada por Chs6, Bch1, Bch2 y Bud7. Las ChAPs determinan la especificidad de cargo, Chs6 es capaz de unirse directamente a las membranas (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006; Paczkowski et al., 2012; Rockenbauch et al., 2012). El exómero tiene, además, la capacidad de unirse a Arf1, para iniciar la formación del complejo, y a otros adaptadores, como AP-1, pero no a la clatrina (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006, Paczkowski and Fromme, 2014). **Figura 4.**

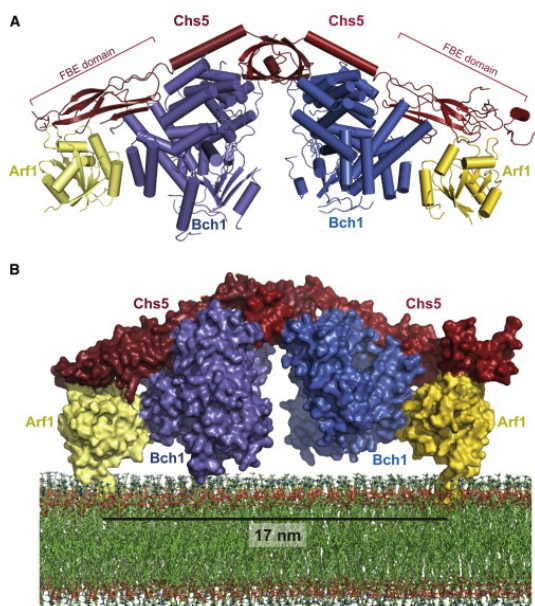


Figura 4. Estructura del exómero.

Unión de Chs5, la ChAP (Bch1) y Arf1. Procedente de Paczkowski and Fromme, 2014.

Chs5 presenta en la zona N-terminal dos motivos, FN3 (*FibroNectin type III*) y BRCT (*BReast Cancer C-Terminal*), que constituyen el módulo FBE, necesario y suficiente para que la proteína Chs5 se localice en el TGN y lleve a cabo su función (Martin-Garcia et al., 2011). La presencia de estos motivos es llamativa puesto que el motivo FN3 es característico de proteínas implicadas en el proceso de unión a la superficie celular y es raro encontrarlo en levaduras (Bateman and Chothia, 1996), mientras que el motivo BRCT se encuentra en proteínas nucleares participando en procesos de respuesta a daño en el ADN (Huyton et al., 2000).

Las ChAPs poseen una estructura con cinco dominios denominados TPR (*Tetratricopeptide Repeats*), estos dominios son necesarios para interacciones proteína-proteína y en cada repetición tienen 34 aminoácidos (Blatch and Lassel, 1999; Zhang et al., 2010b). Los dominios TPR1-4 son necesarios para la interacción con Chs5 y con el resto de las ChAPs y para la localización en el Golgi, mientras que el TPR5 es necesario para el reclutamiento eficiente de las ChAPs en el TGN (Rockenbauch et al., 2012).

Las principales proteínas cargo descritas para el exómero de *S. cerevisiae* son: la quitín-sintasa Chs3 (la enzima encargada de la síntesis de quitina en el anillo del cuello formado entre las células madre e hija y en la pared celular, cuya localización está regulada en respuesta al ciclo celular y a señales de estrés) (Santos et al., 1997; Santos and Snyder, 1997; Valdivia and Schekman, 2003), Fus1 (una proteína de membrana necesaria para la fusión

celular cuya localización responde a feromonas) (Santos et al., 1997; Santos and Snyder, 1997; Barfield et al., 2009) y la proteína con similitud a priones Pin2 que forma agregados en condiciones de estrés, interacciona con varios componentes de la ruta de integridad y su endocitosis se ve alterada si se interfiere en la señalización de las MAPKs Hog1 y Slt2 (Tarasov et al., 2008; Schlecht et al., 2012; Ritz et al., 2014). Recientemente se ha descrito la implicación del exómero en la polarización de la ATPasa Ena1, que media el transporte de Na⁺ y Li⁺, para permitir la supervivencia a estrés iónico (Anton et al., 2017)

4.2.2 El exómero de *S. pombe*

En *S. pombe* existe una proteína que presenta similitud con Chs5, denominada Cfr1 (*Chs five related*), que está localizada en el TGN y en cuya estructura se encuentra también el módulo FBE (Cartagena-Lirola et al., 2006; Martin-Garcia et al., 2011; Hoya et al., 2017). Además, existe una proteína con similitud a las ChAPs que posee dominios TPR y a la que se ha denominado Bch1 (Hoya et al., 2017).

Las proteínas Cfr1 y Bch1 forman un complejo, que constituye la forma más sencilla de exómero (Hoya et al., 2017). La ausencia de cualquiera de las subunidades o de ambas tiene un fenotipo similar: un ligero defecto en el proceso de fusión celular durante la conjugación, pequeñas alteraciones en la síntesis del glucano de la pared celular, crecimiento alterado en algunas situaciones de estrés y defectos en la citocinesis en presencia de KCl. A pesar de esta variedad de fenotipos, ninguna de las proteínas analizadas queda retenida en el Golgi/ TGN en los mutantes (Hoya et al., 2017). Esto, junto con los hechos de que la ausencia del exómero provoca ligeros defectos morfológicos en el Golgi, de que la ausencia conjunta del exómero y *apm1*⁺ produce defectos severos en la morfología/organización del Golgi y de los endosomas tempranos, y de que la ausencia conjunta del exómero y los GGAs produce alteraciones en el sistema endosomal tardío, ha llevado a concluir que el exómero tendría una función general en la organización del Golgi y/o los endosomas (Hoya et al., 2017).

4.3 El flujo iónico en el sistema endosomal

Además de su papel en el transporte vesicular, Golgi, endosomas y vacuolas están implicados en el establecimiento y mantenimiento de gradientes iónicos y de pH a lo largo del sistema endosomal. El carácter iónico de los endosomas varía considerablemente a lo largo de la ruta endocítica, tal y como se observa en la **figura 5**. Esto se debe a que en los distintos orgánulos existen transportadores iónicos que permiten que haya diferencias en el contenido iónico de los diversos compartimentos que componen el sistema endosomal, y también que haya diferencias entre los orgánulos y el citoplasma. Hay varios mecanismos que permiten la localización específica de los transportadores en los distintos compartimentos. Algunos datos apuntan a una influencia recíproca entre el papel de estos orgánulos en el tráfico intracelular y en el mantenimiento del pH y la concentración de iones. Así, los mecanismos de tráfico vesicular participan en la localización de los transportadores iónicos y, a su vez, en la generación de microambientes con ciertas características de pH y concentración de iones. Estos microambientes favorecen la generación de microdominios de membrana que facilitan el ensamblaje de proteínas necesarias para el transporte vesicular. La regulación iónica y del pH de cada uno de los orgánulos es muy importante para que sean capaces de llevar a cabo su función; alteraciones en la localización de transportadores que conlleven modificaciones en el contenido iónico ocasionan numerosas enfermedades humanas (Dong et al., 2010; Scott and Gruenberg, 2010).

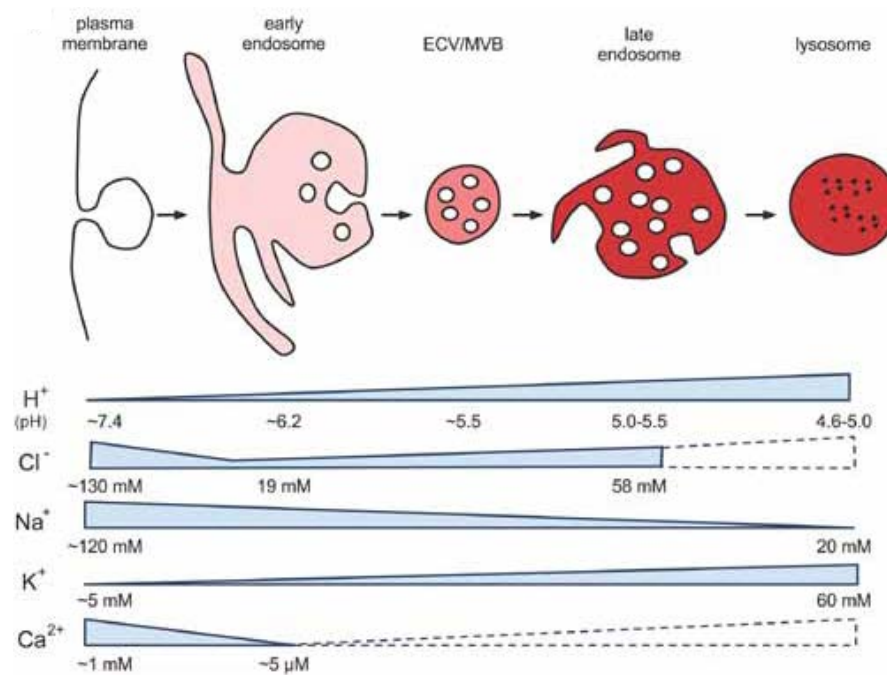


Figura 5. Flujo iónico en el sistema endosomal.

Oscilaciones en la concentración de distintos iones entre los diferentes orgánulos subcelulares y modificaciones del pH a lo largo del sistema endosomal hasta alcanzar el valor más ácido en el lisosoma/ vacuola. Scott and Gruenberg, 2010.

En los dos siguientes apartados se describen los mecanismos que regulan la homeostasis del potasio y del calcio en *S. pombe*.

5. Homeostasis iónica en *S. pombe*

5.1 Homeostasis del potasio

De todos los cationes presentes en las células el potasio es el más abundante. El potasio es muy importante para el establecimiento del pH intracelular y del potencial de membrana, de manera que el mantenimiento de la homeostasis de este ion representa un factor fundamental para la célula.

La entrada de potasio en las células de *S. pombe* se produce mayoritariamente a través de los canales Trk1 y Trk2 (**figura 6A**). La delección de ambos canales provoca una mayor necesidad de potasio para el crecimiento de las células, así como sensibilidad a higromicina B o a pH ácido, debido a la

modificación del potencial de membrana que se produce en ausencia de ambos canales (Calero et al., 2000; Calero and Ramos, 2003).

La salida de potasio de las células de esta levadura tiene lugar a través de Cta3 (**figura 6A**), una bomba de calcio dependiente de ATP (similar a la ATPasa Ena1 de *S. cerevisiae*). El gen *cta3+* se induce en presencia de cationes como el sodio o el potasio de un modo dependiente de las funciones de Wis1, Sty1 y Atf1 (Nishikawa et al., 1999), todas ellas proteínas de la ruta de respuesta a estrés de la que se hablará en otro apartado de la Introducción. La regulación de *cta3+* en presencia de estrés está regulada a nivel de la transcripción de una manera positiva a través de Sty1 y del factor Atf1 y negativa a través de los represores Tup11 y Tup12. Los represores Tup aseguran que no se produzca la inducción de *cta3+* en presencia de formas de estrés inapropiadas, como es el caso del estrés oxidativo (un tipo de estrés que también se media por la ruta de Sty1) (Greenall et al., 2002).

5.2 Homeostasis del calcio

El calcio es un ion muy importante para el correcto funcionamiento celular, esto convierte a la homeostasis del calcio en un proceso muy importante para funciones celulares básicas, como son: el metabolismo, la síntesis, la modificación, el plegamiento y la secreción de proteínas, la progresión a través del ciclo celular o la apoptosis.

El RE es un reservorio de calcio intracelular, desde el que sale hacia el citoplasma, donde desempeña funciones importantes como señalizador, en determinadas circunstancias. Dentro del retículo endoplasmático existen chaperonas dependientes de calcio, como son la calnexina o la calreticulina, que ayudan al plegamiento correcto de las proteínas (Corbett and Michalak, 2000).

En el citoplasma, la calcineurina es una proteína regulada por calcio con funciones necesarias para la citocinesis y para la homeostasis iónica. Se trata de una serín-treonín-fosfatasa de tipo 2B regulada por Ca^{2+} /calmodulina. En *S. pombe* la subunidad catalítica de esta fosfatasa está codificada por el gen *ppb1+*, este gen no es esencial pero su ausencia provoca cierto retraso en la

citocinesis y la aparición de células ramificadas (Yoshida et al., 1994). Además, se sabe que Ppb1 tiene un papel antagonista en la homeostasis del cloruro al de la quinasa de la ruta de integridad celular Pmk1/Spm1 (ver más adelante) (Toda et al., 1996; Sugiura et al., 1998; Sugiura et al., 1999). Existe otra subunidad de la calcineurina, la subunidad reguladora Cnb1, que ejerce su función al interactuar con el dominio C-terminal de la subunidad Ppb1.

La entrada de calcio a las células de *S. pombe* tiene lugar a través de los canales Cch1 y Yam8 (**figura 6B**), cuya apertura y cierre están regulados por la quinasa Pmk1 y por la fosfatasa calcineurina. Por un lado, ciertos cloruros provocan daño en la pared celular y, además, conducen a la fosforilación de Cch1/ Yam8 por la quinasa Pmk1. Esta fosforilación provoca la apertura de los canales y el incremento del calcio intracelular, lo que conlleva la activación de la calcineurina. Por otro lado, la fosfatasa calcineurina desfosforila a los canales provocando su cierre (Deng et al., 2006; Ma et al., 2011).

Además, la calcineurina también puede activarse por otras vías independientes de los canales Cch1-Yam8, al salir calcio de los orgánulos hacia el citoplasma, y por parte de otros agentes, no causantes de daños en la pared celular.

La calcineurina activada desfosforila a ciertos factores, como es el caso de Prz1. Este factor de transcripción al estar desfosforilado viaja al núcleo donde ejerce funciones en la regulación de numerosos genes (**figura 6B**). El promotor de *prz1*⁺ y de otros genes que responden a calcio tienen un elemento de respuesta a calcineurina (CDRE) que funciona en la homeostasis del calcio, pero no en la del cloruro (Hirayama et al., 2003). Entre los numerosos genes encontrados en un rastreo masivo que son regulados por Prz1 se encuentra Cfr1, el componente del exómero de *S. pombe* (Chatfield-Reed et al., 2016).

En resumen, se puede decir que en *S. pombe* existen dos vías de activación de la calcineurina: una en la que participa Prz1 regulando numerosos genes, que es más importante para la homeostasis del calcio, y otra en la que participan Cch1-Yam8 y la ruta de integridad, que sería más importante para la homeostasis del cloruro y la regulación de los niveles intracelulares de calcio (Deng et al., 2006; Ma et al., 2011).

La función en la citocinesis y en la exocitosis de la calcineurina está relacionada con las funciones de la 1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa Its3 (Zhang et al., 2000) y de la Rab GTPasa Ypt3 (Cheng et al., 2002).

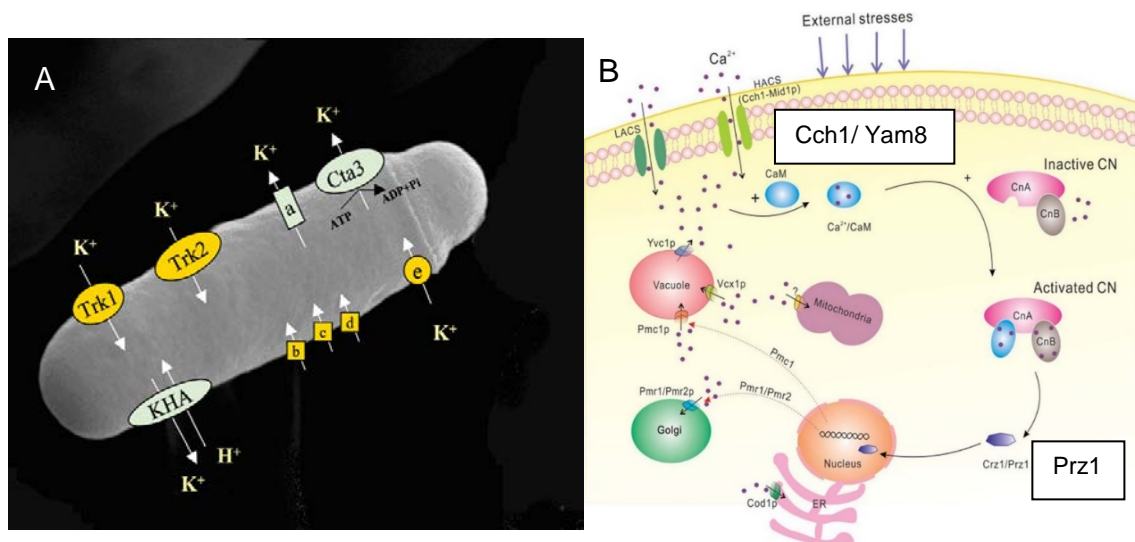


Figura 6. Transporte de iones.

A. La entrada de potasio en las células de *S. pombe* se produce a través de Trk1 y Trk2 y la salida a través de la bomba denominada Cta3. Posiblemente existan otros mecanismos de entrada y salida de K⁺. Figura procedente de Calero and Ramos., 2003.

B. Ruta de la calcineurina.

El calcio entra a la célula desde el exterior a través de los canales Cch1 y Yam8. El calcio activa a la fosfatasa calcineurina (CN), promoviendo la respuesta transcripcional a través de Prz1. Modificado de Liu et al., 2015

Alteraciones en los mecanismos de tráfico intracelular y de homeostasis iónica pueden producir estrés a las células. A continuación, se mencionan las rutas de respuesta a estrés analizadas en este trabajo en relación con el papel del exómero en la levadura de fisión.

6. El retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas

6.1 Funciones generales del retículo endoplasmático. Síntesis y plegamiento de proteínas

El retículo endoplasmático es un orgánulo muy importante para la síntesis de lípidos y proteínas. Además, el RE establece contactos con el resto de los orgánulos celulares y con la membrana plasmática, a través de los cuales pasan moléculas de distinto carácter, motivos por los cuales cambios en su funcionamiento impactan en el funcionamiento del resto de la célula.

El RE se puede dividir en: RE rugoso, que participa en la síntesis de proteínas, y RE liso, que es importante para la homeostasis del calcio, la respuesta a ciertos compuestos y la síntesis de lípidos (Levine and Rabouille, 2005). En el RE se pueden distinguir dominios especializados (los sitios transitorios, tER o ERES), de donde emergen las vesículas COPII con destino al Golgi.

Dentro del retículo se encuentran algunas proteínas residentes, como es el caso de las chaperonas, como es Bip1. Las chaperonas ayudan al correcto plegamiento de las proteínas recién sintetizadas antes de su salida hacia los distintos orgánulos celulares. Otras chaperonas del RE son la calnexina y la calreticulina, estas proteínas dependientes de calcio funcionan en un ciclo de reglicosilación (ciclo de la calnexina/ calreticulina) que permite que las proteínas consigan su estado de glicosilación adecuado; la enzima que participa en la reglicosilación se denomina UDP-glucosa: glucoprotein glucosil transferasa, Gpt1 (Fanchiotti et al., 1998)

Si a pesar de la acción de las chaperonas y del ciclo de reglicosilación las proteínas no adquieren la configuración adecuada, estas quedan retenidas en el RE. La acumulación de proteínas en el retículo produce un estrés que conduce a la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). En un principio se consideró a la UPR necesaria solamente para condiciones de estrés, pero en la actualidad se sabe que también es muy importante en

condiciones normales de crecimiento; de hecho, la UPR juega un papel importante en el proceso de citocinesis (Bicknell et al., 2007).

6.2 La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE es percibida por el sensor denominado Ire1, una quinasa transmembrana con funciones de endoribonucleasa. El dominio luminal de Ire1 tiene la capacidad de unirse a las proteínas mal plegadas y está normalmente unido a la chaperona Bip1, mientras que el dominio citosólico presenta las funciones quinasa y RNAsa. La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE hace que Bip1 se libere de Ire1, lo que induce la dimerización y auto-transfosforilación del sensor. Finalmente, la actividad endonucleasa de Ire1 reconoce y procesa los mensajeros diana mediante un proceso denominado RIDD (*Regulated Ire1-Dependent Decay*) (**figura 7**), mediante el que ocurre el procesamiento y la degradación de ARNs mensajeros, para evitar una excesiva carga proteica en el retículo (Kimmig et al., 2012; Wu et al., 2014). Entre los mensajeros procesados se encuentran los de las siguientes proteínas:

- Bip1, el corte producido en su ARN mensajero estabiliza a la proteína para que pueda llevar a cabo su función de chaperona y ayudar a aliviar el estrés por proteínas mal plegadas.
- Gas2, un enzima de la pared celular cuyo mensajero es degradado al activarse la UPR (Kimmig et al., 2012).
- También hay sitios de corte identificados en otras enzimas de pared, como Bgs3, Agn1, Eng1, otras proteínas de la familia Gas, etcétera (Guydosh et al., 2017).

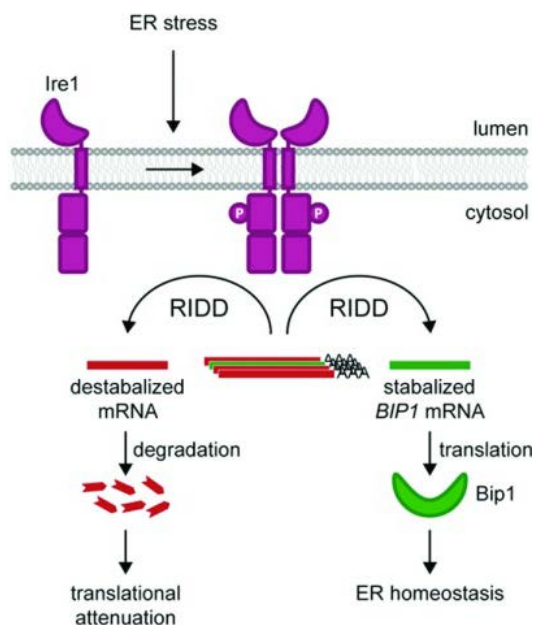


Figura 7. Activación de la UPR.

El sensor Ire1 está localizado en la membrana del retículo endoplasmático, cuando este sensor detecta la presencia de proteínas mal plegadas se activa el mecanismo denominado RIDD. Mediante este proceso algunos mensajeros son degradados mientras que otros son estabilizados. Figura procedente de Wu et al., 2014.

7. Las cascadas de MAPK

Las células en general, y los organismos unicelulares en particular, están muy expuestas a una gran variedad de estímulos ambientales, por lo que han desarrollado mecanismos para detectar y responder rápidamente a las variaciones en dichos estímulos. La fosforilación y desfosforilación de proteínas son mecanismos de respuesta rápida y reversible frente a los estímulos externos. Los procesos más conocidos de fosforilación de proteínas en respuesta a estímulos implican la actividad de las denominadas cascadas de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). En estas cascadas se produce la fosforilación secuencial de una serie de quinasas, que resulta en la inducción transcripcional de algunos genes por la fosforilación de factores de transcripción específicos. La transmisión de la señal se modula, además, por la actividad de fosfatasa que desfosforilan las MAPK. Las rutas de MAPK están muy conservadas en la evolución.

En *S. pombe* existen tres cascadas de MAPK diferentes, una de ellas es necesaria para la conjugación, otra media la respuesta a estrés (SAPK, *Stress-Activated Protein Kinase*) y otra es necesaria para el mantenimiento de la integridad celular (CIP, *Cell Integrity Pathway*) (Perez and Cansado, 2010).

7.1 La ruta SAPK de respuesta a estrés en *S. pombe*

La ruta SAPK de *S. pombe* (**figura 8**), al igual que su homóloga en metazoos (p38), participa en la respuesta a un amplio abanico de estímulos (estrés oxidativo, térmico, osmótico, nutricional...).

Los distintos estímulos son detectados en la membrana plasmática por un sistema muy similar al sistema de dos componentes bacteriano. Los sensores de estrés descritos en la levadura de fisión son Mak1, Mak2 y Mak3; estos sensores transmiten la señal al sistema de dos componentes formado por Mpr1 y Mcs4. Mpr1 actúa como un fosfo-transmisor gracias a su histidina de la posición 221 (Nguyen et al., 2000), mientras que el receptor de la fosforilación es Mcs4, un inhibidor de la catástrofe mitótica (Shiozaki et al., 1997).

Desde el sistema de dos componentes se transmite la señal al módulo de MAPK. En primer lugar actúan las MAPKKK o MEKK, de las que están descritas dos: Wak1/Wis4 y Win1 (un regulador mitótico. Ogden and Fantès, 1986). Se sabe que ninguna de ellas es necesaria para la señalización en presencia de estrés térmico ni en respuesta a un bajo contenido de glucosa en el medio de cultivo (Shiozaki et al., 1998; Zhou et al., 2010). Las MAPKKK fosforilan a la MAKK Wis1 en la serina 469 y en la treonina 473. (Shieh et al., 1998a; Shieh et al., 1998b). La MAPKK (o MEK) Wis1 es un iniciador de la mitosis (Shiozaki and Russell, 1995) que se localiza en el citoplasma y que fosforila a la MAPK Sty1/ Spc1 en la tirosina de la posición 173 y en la treonina situada en la posición 171. Sty1, homóloga de Hog1 de *S. cerevisiae*, viaja del citoplasma hacia el núcleo cuando es fosforilada para continuar con la señalización de la ruta; se sabe que la fosforilación única en la treonina 171 puede llevar a cabo funciones en estrés osmótico, pero no en respuesta a estrés oxidativo (Vazquez et al., 2015).

En el núcleo Sty1 fosforila al factor de transcripción Atf1 (Wilkinson et al., 1996), un factor que en su estructura presenta un dominio b-ZIP. Atf1 es capaz de dimerizar con otro factor denominado Pcr1 (Lawrence et al., 2007). La acción de Atf1 estimula la transcripción de una gran cantidad de genes, como son los de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, de la catalasa o de una

fosfatasa de la ruta (Pyp2) (Wilkinson et al., 1996). Los genes activados permiten cambios metabólicos para crecer en presencia de los distintos tipos de estrés. La ruta de estrés también promueve la transcripción de *cta3+*, importante para la homeostasis iónica (Nishikawa et al., 1999).

Las fosfatasas Pyp2, Pyp1 y Ptc1, Ptc2 y Ptc3 desfosforilan a Sty1, apagando la activación de la ruta. El hecho de que las fosfatasas se expresen al activarse la ruta conlleva un mecanismo de *feedback* negativo (Millar et al., 1995; Shiozaki and Russell, 1995; Degols et al., 1996; Wilkinson et al., 1996; Madrid et al., 2007).

Las deleciones de *sty1+*, de *wis1+* o de *atf1+* provocan sensibilidad a distintos tipos de estrés (osmótico, oxidativo, etcétera; los mismos que activan la ruta); sin embargo, a diferencia de las otras deleciones, la de *atf1+*, no provoca parada en G₂/M (Wilkinson et al., 1996). Por tanto, la señalización en mitosis y ciclo celular de la cascada tiene lugar a través de otro factor diferente.

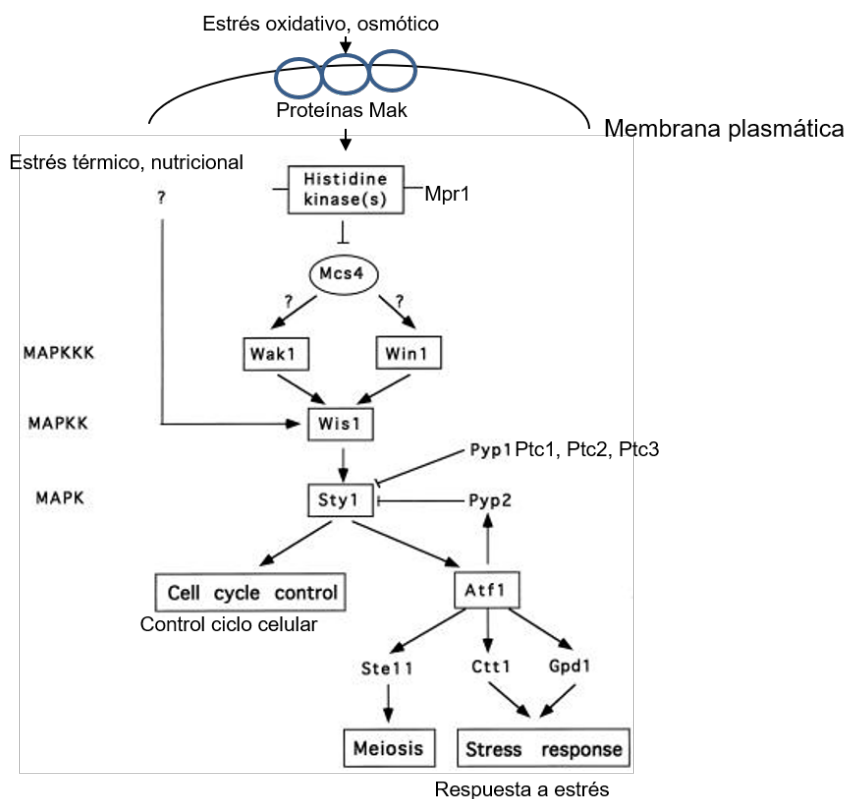


Figura 8. Ruta de respuesta a estrés.

El estrés es detectado a través de las proteínas Mak, transmitido por el sistema de dos componentes hacia el módulo de MAPK y, finalmente, tras la cascada de MAPK, tiene lugar un cambio transcripcional a través de Atf1 y de algún factor desconocido.

La ruta es inhibida por parte de Pyp1, Pyp2 y Ptc1, Ptc2 y Ptc3.

Modificado de Shieh et al., 1998.

7.2 La ruta CIP de integridad de *S. pombe*

En la levadura de fisión existe una cascada de MAPK que participa en el mantenimiento de la integridad celular y que, aunque tiene algunos aspectos en común con la ruta de integridad de la pared celular de *S. cerevisiae*, mediada por Slt2/Mpk1, no es totalmente equivalente a la misma. En *S. pombe* esta ruta responde a una gran variedad de estímulos (**figura 9**), la cascada se activa en presencia de estrés hiperosmótico, hipoosmótico, oxidativo, térmico, nutricional (bajada en la concentración de glucosa en el medio de cultivo) y en respuesta a daños en la pared celular. En la cascada participan tres quinasas: Mkh1 (MAPKKK), Skh1/Pek1 (MAPKK) y Pmk1/Spm1 (MAPK) (Toda et al., 1996; Sengar et al., 1997; Sugiura et al., 1999; Loewith et al., 2000; Madrid et al., 2006).

La MAPK de la ruta es Pmk1/Spm1, una proteína de 422 aminoácidos y un peso molecular de 48 kDa que presenta homología con Slt2 (la MAPK de la levadura de gemación). La delección de *pmk1*⁺ provoca la aparición de los siguientes fenotipos: sensibilidad a cloruro de potasio, sensibilidad al tratamiento con β -glucanasa, defectos en septación y aparición de un porcentaje de células encadenadas (Toda et al., 1996; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997). La quinasa Pmk1 tiene funciones en el mantenimiento de la morfología celular, en la citocinesis, en la viabilidad celular y en la homeostasis iónica.

La localización de Pmk1 varía a lo largo del ciclo celular con independencia de su estado de fosforilación; puede encontrarse en el citoplasma, en el núcleo, en el huso mitótico o en el septo de división (Madrid et al., 2006). Su fosforilación es más acusada en la mitosis y, principalmente, durante la citocinesis (Madrid et al., 2007); además, también se fosforila en presencia de los estímulos capaces de activar la ruta de integridad. La fosforilación de Pmk1 ocurre en la treonina 186 y en la tirosina 188 y la encargada de fosforilarla es la MAPKK Skh1/Pek1. La MEK Skh1/Pek1 es capaz de unirse a Pmk1 y fosforilarla. Si Pek1 está fosforilada se une a Pmk1, la fosforila y la activa; sin embargo, si Pek1 está desfosforilada también se

puede unir a Pmk1, pero en este caso la inhibe. La delección de *pek1*⁺ provoca fenotipos muy similares a la de *pmk1*⁺ (Sugiura et al., 1999). La fosforilación de Skh1/Pek1 la realiza la MAPKKK (MEKK) Mkh1. La delección de esta quinasa presenta los mismos fenotipos que la eliminación de las otras dos (Sengar et al., 1997; Loewith et al., 2000). Las tres quinasas forman un complejo ternario, gracias a la mediación de Pek1 (Loewith et al., 2000), este complejo se forma en el citoplasma porque tanto Pek1 como Mkh1 solo se localizan en el citoplasma y en el septo (Madrid et al., 2006).

Cuando Pmk1 se encuentra fosforilada y activa es capaz de fosforilar a algunas proteínas para llevar a cabo cambios en la célula. Entre las proteínas fosforiladas por Pmk1 se encuentra Atf1, un factor de transcripción que también es fosforilado por la quinasa Sty1; entre los genes afectados por Atf1 se encuentra *its8*⁺, una enzima que participa en la síntesis del GPI (Takada et al., 2007). Otra proteína fosforilada por Pmk1 es Nrd1, que participa en la regulación de los ARN mensajeros de la miosina de tipo II y, por tanto, en la regulación de la citocinesis (Sato et al., 2009). La quinasa Pmk1 asociada a membranas también puede llevar a cabo funciones como la homeostasis del cloruro o la separación celular (Sanchez-Mir et al., 2012).

Una inhibidora de la ruta es la fosfatasa Pmp1/Dsp1. Esta fosfatasa desfosforila a la quinasa Pmk1 y tiene funciones compartidas con la calcineurina (Sugiura et al., 1998). Otras fosfatasas que actúan en la ruta son las serín-treonín fosfatasas Ptc1 y Ptc3 y las tirosín fosfatasas Pyp1 y Pyp2, estas fosfatasas también actúan en la ruta de estrés de Sty1; de hecho, se expresan al activarse la cascada de MAPK de Sty1, existiendo cierto papel antagónico entre ambas rutas (**figura 10A**) (Madrid et al., 2006; Madrid et al., 2007; Takada et al., 2007).

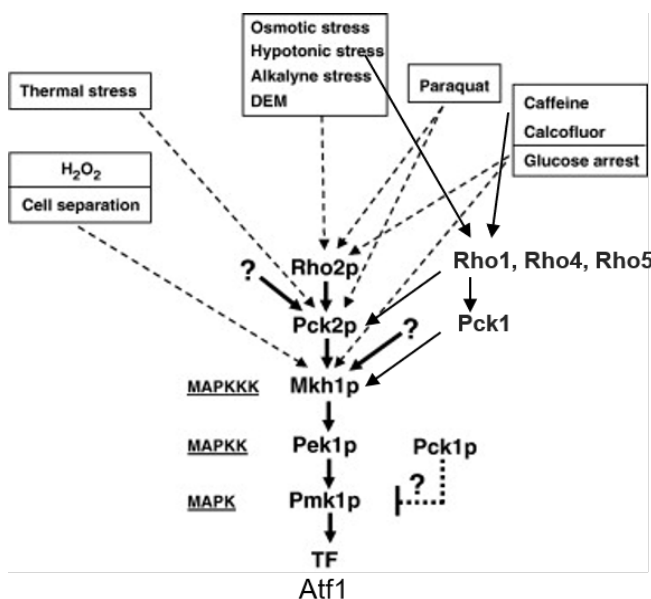


Figura 9. Ruta de integridad.
 Los diferentes tipos de estrés activan la ruta de integridad por distintas vías, a través de las proteínas Rho o de las Pck. La señal se transmite al módulo de MAPK y finalmente se producen cambios transcripcionales. Los inhibidores de la ruta son: Pck1, Pmp1, Pek1 no fosforilada, las Ptcs y los Pyps. Esquema modificado de Barba et al., 2008.

7.2.1 Las GTPasas Rho y la ruta de integridad

Las GTPasas Rho funcionan como interruptores moleculares. En su forma activa se encuentran unidas a GTP, mientras que en su forma inactiva se encuentran unidas a GDP. Las proteínas activadoras de las Rho son los GEF, que median en el intercambio de GDP por GTP; las proteínas inhibidoras son las GAP, que potencian la actividad GTPásica intrínseca de las Rho.

Las proteínas Rho están muy conservadas en la evolución y son muy importantes para la regulación del citoesqueleto, para la morfogénesis y para el crecimiento. En la levadura de fisión existen seis proteínas de la familia Rho: Rho1-2-3-4-5 y Cdc42. Cdc42 no participa en la ruta de integridad (Madrid et al., 2006).

Rho1 es esencial, regula la síntesis de la pared celular a través de las quinasas Pck1 y Pck2, organiza el citoesqueleto de actina y participa en la respuesta celular a estrés (Arellano et al., 1996; Nakano et al., 1997; Sanchez-Mir et al., 2014). Sus GEF conocidos son Rgf1, Rgf2 y Rgf3, y sus GAP son Rga1, Rga5 y Rga8. Rgf1 y Rho1 son necesarias para la activación de la ruta de integridad en presencia de estrés hiperosmótico/hipoósmótico o de daños en la pared celular; pero no en presencia de estrés térmico, oxidativo o deprivación de glucosa (García et al., 2009). Una disminución en la función de

Rho1 provoca daños celulares que activan a la ruta de integridad, siendo esto perjudicial para las células (Viana et al., 2013).

Rho2 no es esencial pero también participa en la síntesis de pared celular a través de Pck2. Entre los GAP de Rho2 se encuentran Rga2, Rga4 y Rga7. Rho2 participa en la activación de la ruta de integridad a través de Pck2, esta activación se ve inhibida por la acción de las GAP de Rho2. La palmitoilación de Rho2 es importante para su función en la ruta de integridad (Calonge et al., 2000; Barba et al., 2008; Villar-Tajadura et al., 2008; Cansado et al., 2010; Soto et al., 2010; Sanchez-Mir et al., 2014a).

Rho4 y Rho5 también están implicados en la activación de la ruta de integridad a través de Pck1/ Pck2 (Doi et al., 2015).

La principal vía de activación de la cascada en presencia de múltiples estímulos se inicia en el módulo Rho2-Pck2; sin embargo, en respuesta a ciertos estímulos este módulo no es necesario (estrés oxidativo, térmico). En presencia de estrés oxidativo puede que exista un mecanismo específico, en presencia de estrés térmico la señalización se transmite desde Pck2. Rho1 y Pck1/ Pck2 participan en la activación de la ruta en respuesta a daños en la pared celular (Sanchez-Mir et al., 2014b); sin embargo, Pck1 regula negativamente la actividad basal de Pmk1, aun sin unirse a ninguno de los componentes de la cascada de MAPK. Todos estos datos apuntan a que la regulación de la cascada es compleja, tanto a nivel basal como en presencia de estímulos que la activen (Barba et al., 2008).

7.2.2 Posibles mecanosensores en *S. pombe*

En la levadura de gemación existen un conjunto de mecanosensores, presentes en la membrana plasmática, que detectan daños en la pared celular y participan en la activación de la ruta de Slt2/Mpk1. En *S. pombe* hay varias proteínas con similitud de secuencia a los mecanosensores de *S. cerevisiae*: Mtl1, Mtl2 y Wsc1. De ellos, los más caracterizados son Wsc1 y Mtl2. Wsc1 se localiza en la membrana plasmática y en el interior de la célula y Mtl2 se localiza en la membrana plasmática, principalmente en septo y polos (Cruz et al., 2013).

Ambas proteínas participan en la integridad de la pared celular a través de la GTPasa Rho1, pero no a través de la cascada de Pmk1. La delección de *wsc1+* o de *mtl2+* no afecta a la fosforilación de Pmk1 y además no produce fenotipo *vic* (viable en presencia de inmunosupresor y cloruro) (Cruz et al., 2013). El fenotipo *vic* es característico de las delecciones de los componentes de la ruta de integridad y procede de la función antagónica entre esta ruta y la de la calcineurina en la homeostasis del cloruro (figura 10B); en ausencia de función de la calcineurina (con el inmunosupresor FK506) las células son sensibles a cloruro, pero esta sensibilidad se suprime al eliminarse la activación de la ruta de integridad (Sugiura et al., 1998; Sugiura et al., 1999).

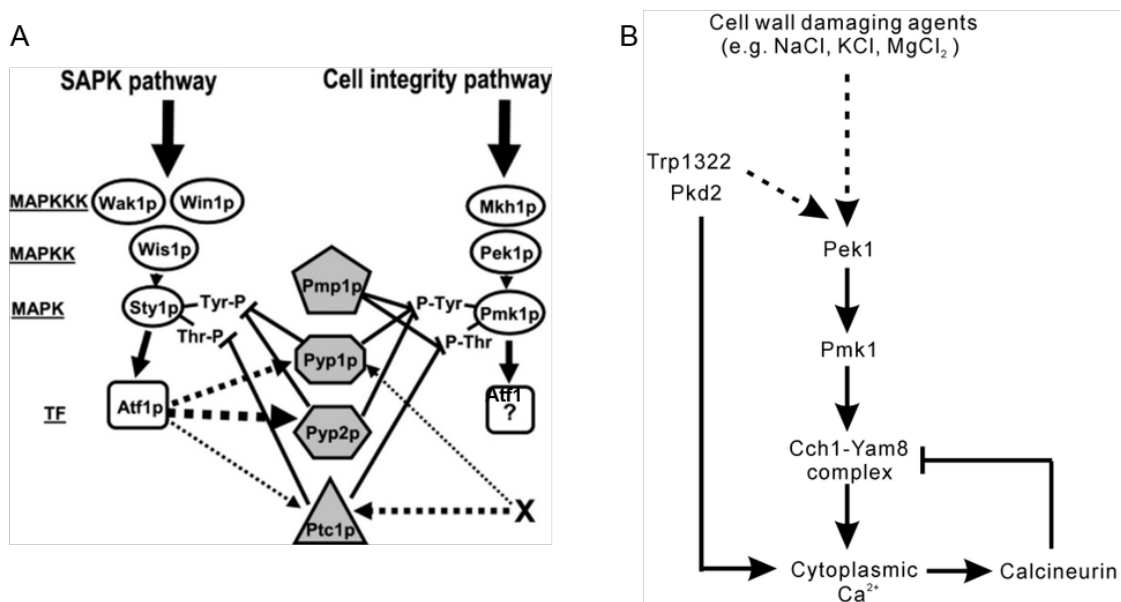


Figura 10. Interacciones entre rutas.

A. Relación entre la ruta de integridad y la ruta de estrés, las fosfatasas Pyp2, Pyp1 y Ptc1 son comunes para ambas rutas, además esas fosfatasas se expresan al activarse la ruta SAPK. Modificado de Madrid et al., 2007.

B. Relación entre la ruta de la calcineurina y la ruta de integridad. En presencia de estrés, la ruta de integridad fosforila a los canales Cch1 y Yam8 promoviendo la entrada de calcio. El calcio activa a la calcineurina, que a su vez inhibe la apertura de los canales. Esquema procedente de Ma et al., 2011.

8. Los complejos TOR

Las rutas en las que participan los complejos TOR están muy conservadas en la evolución. En estas rutas participan las denominadas quinasas de la familia TOR (*Target Of Rapamycin*), que están relacionadas con las fosfoinosítido-quinasas. Los complejos TOR median la transducción de señales desde el medio externo hacia el interior de la célula, permitiendo la coordinación del crecimiento y la división celular con la disponibilidad de nutrientes. Cada vez se encuentran más conexiones entre estas rutas de señalización y otros mecanismos de señalización celular. Además, su alteración está asociada al envejecimiento y al desarrollo de algunas enfermedades (Laplane and Sabatini, 2012). En mamíferos existen dos complejos TOR que comparten la misma quinasa: TORC1 y TORC2. TORC1 está formado por Raptor (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*) y por mLST8 (*mammalian Lethal with SEC Thirteen 8*). TORC2 está formado por Rictor (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), Sin1 (*SAPK-Interacting 1*) y mLST8. Revisado por Shimobayashi (Shimobayashi and Hall, 2014).

En *S. pombe* existen dos quinasas: Tor1 y Tor2. Estas quinasas forman parte de dos complejos: TORC2 y TORC1.

8.1 El complejo TORC2 de *S. pombe*

Este complejo está formado por la quinasa Tor1 y las siguientes proteínas: Sin1, Ste20 (Rictor) y Wat1 (Matsuo et al., 2003; Hayashi et al., 2007; Otsubo and Yamamoto, 2008) (Figura 11A).

El complejo TORC2 participa en el desarrollo sexual, en el crecimiento en condiciones de estrés, en la toma de aminoácidos y en la adaptación a la bajada de glucosa en el medio de cultivo (Kawai et al., 2001; Weisman and Choder, 2001; Weisman et al., 2007; Cohen et al., 2014). El complejo se activa cuando hay una bajada en los niveles de nitrógeno, permitiendo la parada en G₁ y el comienzo del ciclo sexual, regula la adaptación a condiciones de estrés para permitir el crecimiento y además promueve la transcripción de permeasas

de aminoácidos. Las células *tor1Δ* son incapaces de pararse en G₁ en respuesta a la escasez de nitrógeno en el medio, por lo que en estas condiciones son estériles (Weisman and Choder, 2001). *tor1Δ* es sensible a frío, estrés osmótico y oxidativo. Además, la delección de cualquiera de los componentes del complejo provoca sensibilidad a cloruro de potasio (Ikeda et al., 2008). El complejo TORC2 colabora con las miosinas en el mantenimiento de la integridad del anillo de actomiosina para que este no se duplique durante su contracción; el complejo TORC2 colabora con el acoplamiento entre la estabilidad de la actina y los cambios en crecimiento y división de las células, acoplamiento necesario para sobrevivir a estrés medioambiental (Baker et al., 2016). Cuando TORC2 se ve inhibida se produce un incremento de la fosforilación de Sty1 que, a través de las quinasas Polo y Cdc2, conduce a un aceleramiento en la entrada en mitosis (Petersen and Nurse, 2007).

La quinasa Tor1 fosforila a la quinasa Gad8, una serín-treonín-quinasa de la familia AGC (Matsuo et al., 2003), en la serina 527 y en la serina 546. La fosforilación de Gad8 en la serina 546 sirve como marcador para conocer la actividad de la ruta TORC2. Gad8 también es fosforilada por la PDK1 Ksg1 en la treonina 387, lo que contribuye también a su activación de un modo independiente de la ruta TORC2.

Cuando las células están expuestas a cloruro de sodio, de potasio o de calcio se produce una bajada en la cantidad de Gad8 fosforilada en la serina 546. También se produce una disminución en la cantidad de Gad8 fosforilada en condiciones de crecimiento en un medio con bajo contenido de glucosa, lo que confiere un mecanismo de adaptación de las células a estas condiciones de crecimiento (Cohen et al., 2014).

Un mecanismo de regulación de la ruta consiste en que cuando Gad8 fosforila a Tor1 en la treonina 1972 se produce su inhibición, es decir existe un mecanismo de auto-regulación de la ruta (Halova et al., 2013).

8.1.1 Regulación por la Rab GTPasa Ryh1

Otro mecanismo de regulación de la ruta está mediado por la GTPasa de la familia Rab denominada Ryh1. Esta proteína se localiza en el Golgi y es activada por el GEF Sat4/ Ric1 (Tatebe et al., 2010).

La delección de *ryh1*⁺ provoca fenotipos similares a los de la delección de los componentes del complejo TORC2: sensibilidad a cloruro de potasio y a cloruro de calcio. Además, en su ausencia no hay apenas fosforilación de Gad8 al igual que si faltan los componentes del complejo TORC2. La delección de la GTPasa no provoca la deslocalización de Gad8, por lo que se ha propuesto que la función de Ryh1 es la de facilitar que Tor1 se una a Gad8. En el mutante *ryh1*Δ existen problemas en la integridad de las vacuolas, las vacuolas están fragmentadas y son más pequeñas que en una cepa silvestre; estos defectos son los responsables de la sensibilidad a estrés osmótico y también están presentes en los mutantes de TORC2 y en el mutante *gad8*Δ. El papel de Ryh1 en señalización a través de TOR es independiente de su función en el tráfico intracelular, donde participa en el reciclaje desde el endosoma al Golgi o en el transporte desde el Golgi a la membrana plasmática (Tatebe et al., 2010).

Ryh1 también participa en la activación de TORC2 en respuesta a glucosa, a pesar de que la delección de *ryh1*⁺ no provoque alteración del crecimiento en presencia de una concentración baja de glucosa (Hatano et al., 2015).

8.1.2 Relación entre TORC2 y la ruta de integridad

Se ha encontrado una relación entre las rutas de señalización mediadas por TORC2 y Pmk1/Spm1 (**Figura 11B**) (Madrid et al., 2016). Por un lado, la quinasa Tor1 participa en la activación de Pmk1 en respuesta a daños en la pared celular o a una bajada en los niveles de glucosa del medio de cultivo, por este motivo existe una menor fosforilación de Pmk1 cuando las células son tratadas con Caspofungina o con bajo contenido de glucosa en los mutantes *tor1*Δ y *gad8*Δ (Madrid et al., 2016). La función de TORC2 como activadora de la ruta de integridad está mediada por la quinasa Gad8, pero también participa

TORC1 en la activación de Pmk1. Por otro lado, tanto Tor1, como Gad8 o como Ryh1 parecen tener cierto papel en el transporte o en el anclaje a la membrana plasmática de las proteínas Rho1 y Rho2, que tienen una función positiva en la ruta de integridad. Además, TORC2 regula la síntesis de Pck2 para activar la ruta de integridad en presencia de daños en la pared celular o en ausencia de glucosa (Madrid et al., 2015).

Respecto a Ryh1, la GTPasa tiene la capacidad de activar a la ruta de integridad, de un modo independiente de su función como activadora de TORC2. Esta función activadora es importante en presencia de estrés osmótico y está relacionada con el papel de Ryh1 en el transporte intracelular a través de Its3 (una fosfoinosítido-quinasa). Por otro lado, la función de Ryh1 en coordinación con el complejo TORC2 como activadores de la ruta de integridad es más importante en respuesta a daños en la pared celular o en falta de glucosa.

Por su parte, Pmk1 regula la integridad y actúa como un regulador de las oscilaciones en la señalización TORC2-Gad8 en respuesta a varios estímulos, inhibiendo a Ryh1 y con ello a TORC2. De este modo, optimiza la respuesta a través de Ryh1-Tor1-Gad8 a dichos estímulos (Madrid et al., 2016).

Por último, cabe destacar que tanto TORC2 como la ruta de integridad son necesarias para una respuesta coordinada a estrés.

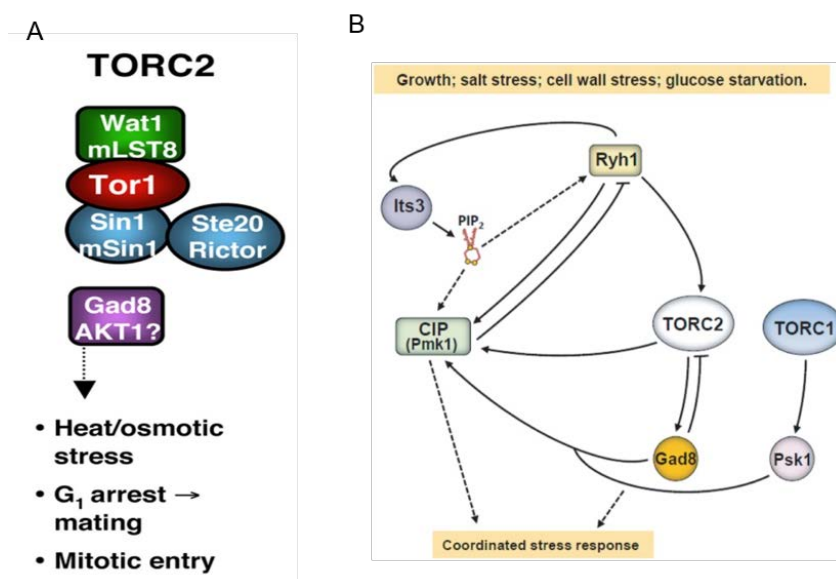


Figura 11. El complejo TORC2 de *S. pombe*.

A. Esquema de los componentes de TORC2, procedente de Hartmuth and Petersen, 2009.

B. Relación entre TORC2, la GTPasa Ryh1 y la ruta de integridad, procedente de Madrid et al., 2016.

8.2 El complejo TORC1 en *S. pombe*

El complejo TORC1 está formado por la quinasa Tor2, que es esencial, el homólogo de RAPTOR Mip1 y Wat1 (**figura 12A**).

Los mutantes con la actividad Tor2 reducida presentan un fenotipo conocido como “siempre sin nitrógeno”, en contraste con los mutantes *tor1Δ* que, como se ha mencionado, no responden a la carencia de este elemento y por lo tanto tienen un fenotipo “siempre con nitrógeno”. El complejo TORC1 facilita los procesos anabólicos e inhibe los procesos catabólicos, como la autofagia; cuando el complejo está inactivo se activa la autofagia y se inhiben los procesos anabólicos. En ausencia de nitrógeno las células inician la diferenciación sexual, diferenciación que está reprimida por el complejo TORC1 en condiciones normales (Weisman et al., 2007).

La principal diana del complejo TORC1 es la S6 quinasa Psk1, de la familia de las AGC quinasas, que participa en la formación de los ribosomas según la disponibilidad nutricional; Rps6 no es una diana exclusiva de este complejo y de Psk1, también se fosforila por el complejo TORC2 en la adaptación a daños en la pared celular o en bajada de glucosa (Du et al., 2012). Otras dianas del complejo TORC1 son: Sck1 y Sck2, que actúan para controlar el crecimiento y el tamaño celular; Maf1, para la regulación de la transcripción, y Atg13 para la inhibición de la autofagia. La autofagia se estimula cuando Atg13 no es fosforilada por el complejo TORC1 (Revisado por Otsubo. Otsubo et al., 2017) (**figura 12B**).

Además del complejo TORC1 anteriormente descrito existe otra modalidad, formada por los mismos componentes, pero que ejerce su acción a través de la quinasa Gad8 (al igual que el complejo TORC2) que participa en el control del estrés nutricional en la interfase entre G₂ y M (Hartmuth and Petersen, 2009) (**Figura 12A**).

La actividad del complejo TORC1 está regulada, en ciertas circunstancias, por Ppk32. Ppk32, perteneciente a la familia SCYL de pseudo-quinzas, es necesaria para el crecimiento en presencia de brefeldina A, posiblemente debido a una función ejercida en el Golgi, donde se localiza. Los niveles de Ppk32 están regulados por los complejos TORC, TORC2 inhibe su

degradación mientras que TORC1 la promueve (Kowalczyk and Petersen, 2016).

Otro regulador de TORC1 es el complejo SEA (**figura 12C**), que está descrito en *S. cerevisiae* asociado a la vacuola regulando la actividad TORC1. El complejo está formado por dos subcomplejos, uno activador denominado SEACAT, formado por Sea2, Sea3, Sea4, Sec13 (componente también de la nucleoporina y del complejo COPII) y Seh1. El otro, SEACIT, está formado por Npr2, Npr3 y Sea1. Npr2 y Npr3 inhiben a TORC1 cuando hay bajos niveles de aminoácidos (Neklesa and Davis, 2009; Algret et al., 2014). En la levadura de fisión, *S. pombe*, existen proteínas homólogas a los componentes del complejo SEA, que aún no se han caracterizado.

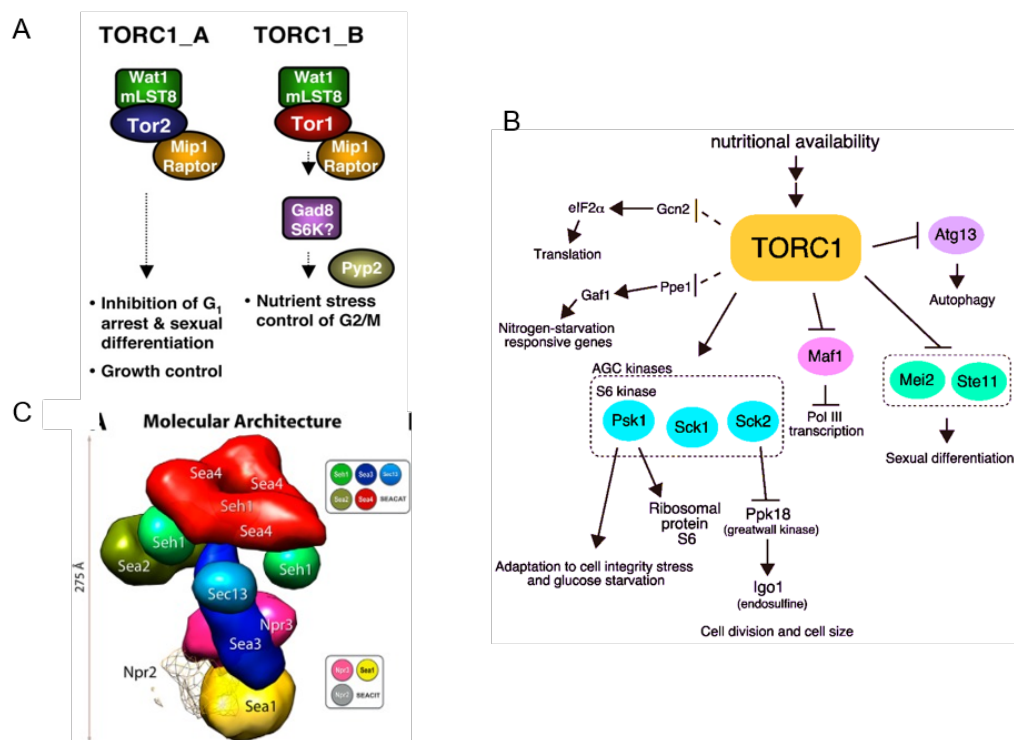


Figura 12. Complejos TORC1.

A. Componentes de los dos tipos de complejos TORC1 presentes en la levadura de fisión. Figura procedente de Hartmuth and Petersen, 2009.

B. Principales dianas del complejo TORC1, figura procedente de Otsubo et al., 2017.

C. Complejo SEA de *S. cerevisiae*. Algret et al., 2014.

Introducción Antecedentes y objetivo

Antecedentes

En un trabajo anterior del laboratorio se había descubierto que en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* las proteínas Cfr1 y Bch1 constituyen la forma más sencilla posible de un exómero, formado por un equivalente a Chs5 y una única ChAP (Hoya et al., 2017). Además, se demostró que este exómero mínimo es funcional.

La proteína Cfr1 interacciona físicamente con algunos de los adaptadores de clatrina (los complejos AP-1 y AP-2 y los GGAs), y el gen *cfr1⁺* interacciona genéticamente con *apm1⁺*, *gga21⁺* y *gga22⁺*. La colaboración entre Cfr1 y el complejo AP-1 es necesaria para que la morfología e integridad del *Trans-Golgi Network* y de los endosomas tempranos sean correctas, mientras que la colaboración entre los GGAs y el exómero es necesaria para el mantenimiento del sistema prevacuolar y de las vacuolas (Hoya et al., 2017).

De acuerdo con una función del exómero en varios pasos del tráfico vesicular, y no con el transporte de una proteína en concreto, la falta del exómero presenta una serie de fenotipos, no muy exacerbados, que en principio no parecen estar directamente relacionados entre sí: alteraciones en la morfología del aparato de Golgi, defectos en el tráfico de la carboxipeptidasa o una mala distribución de la sinaptobrevina.

Además de los fenotipos mencionados anteriormente, los mutantes del exómero (*cfr1 Δ* , *bch1 Δ* y *cfr1 Δ bch1 Δ*) son sensibles a Caspofungina, un antifúngico que afecta a la pared celular, y presentan una cantidad reducida de los niveles de β (1,3)-glucano (que se ve compensada con un incremento en la cantidad de α -glucano). Los mutantes del exómero presentan, también, una ligera disminución del crecimiento a 37°C o en medio mínimo. Cabe destacar una clara sensibilidad a cloruro de potasio, de modo que los mutantes tienen un crecimiento ralentizado en presencia de KCl a 0,6 M y son incapaces de crecer a una concentración de 1 M de la sal. El KCl no solo provoca defectos en el crecimiento, sino que tratamientos largos (de dieciséis horas) con esta sal (a una concentración de 0,6 M y a una temperatura de 25°C) provocan la

aparición de un septo mal formado con engrosamientos (**figura 13**) (Hoya et al., 2017).

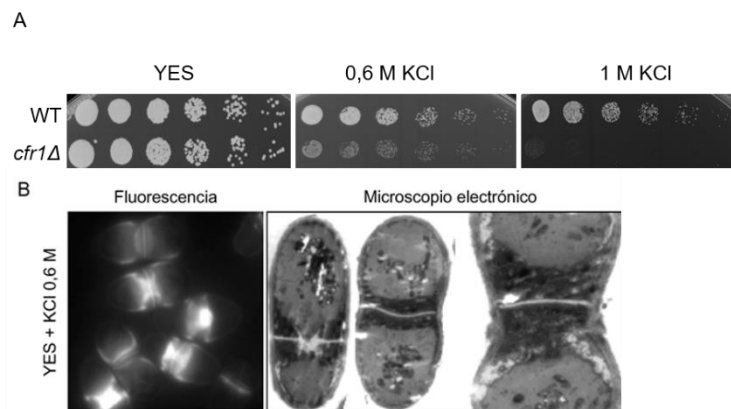


Figura 13. Fenotipos de los mutantes del exómero en presencia de KCl.

A. Sensibilidad a cloruro de potasio. Ensayo de crecimiento en gota en placas de YES con KCl.

B. Defecto en septación de la cepa *cfr1Δ* tras 16 horas de tratamiento con KCl.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral, que se fijaron en base a los fenotipos observados en los mutantes del exómero de *S. pombe* en respuesta al estrés producido por cloruro de potasio, fueron los siguientes:

Objetivo principal:

Conocer el papel del exómero de *Schizosaccharomyces pombe* en la respuesta a estrés.

Objetivos específicos:

- Caracterizar el defecto de los mutantes *cfr1Δ* y *bch1Δ* en la citocinesis y en la sensibilidad a estrés en presencia de compuestos inductores de estrés, en particular de KCl.
- Averiguar la relación entre el exómero y las rutas de respuesta a estrés.
- Buscar proteínas que colaboren con el exómero en el proceso de citocinesis y en la respuesta a estrés.

Introducción Antecedentes y objetivo Resultados

1. Fenotipos de los mutantes del exómero en condiciones de estrés

Ya se ha mencionado en Antecedentes y objetivo que los mutantes del exómero, *cfr1Δ* y *bch1Δ*, presentan un defecto en el crecimiento en placas de YES con cloruro potásico. Además, esta sal provoca la aparición de septos aberrantes en los mutantes del exómero tratados durante dieciséis horas. Para caracterizar más el efecto del KCl en estas condiciones se realizó un ensayo de viabilidad para comprobar si tras el tratamiento con cloruro de potasio las células eran capaces de crecer en medio YES. Se incubaron las células de las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* con cloruro potásico 0,6 M durante dieciséis horas y, pasado ese tiempo, se inocularon seis diluciones seriadas de los cultivos de cada cepa, tratados y sin tratar con la sal, en placas de YES que se incubaron durante dos días a 32°C. El crecimiento de ambas cepas se comparó con el de los mismos cultivos inmediatamente antes de añadir el KCl. En la **figura 14** se observa que la cepa *cfr1Δ* tratada durante dieciséis horas solo presenta un ligero descenso en el número de colonias respecto a las que tiene la cepa silvestre tratada de igual modo. Este resultado demuestra que solo algunas células pierden la viabilidad, e indica que el KCl a 0,6 M provoca un retraso o una parada del crecimiento celular. Esto se correspondería con el menor tamaño de las colonias de los mutantes en placas suplementadas con este compuesto, comparada con el tamaño de las colonias de la cepa silvestre o con las del mutante sin tratar (**figura 13**).

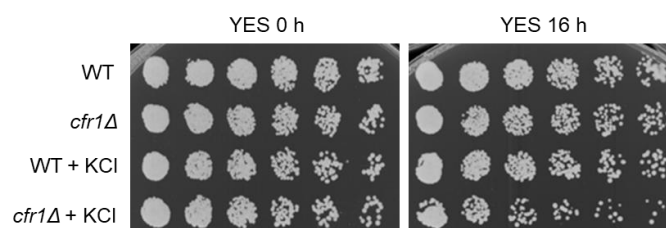


Figura 14. Ensayo de viabilidad.

La imagen muestra el crecimiento de las cepas WT y *cfr1Δ* antes y después de ser tratadas o no con 0,6 M de cloruro de potasio durante 16 horas. En las placas se inocularon diluciones seriadas 1:4 de cada cepa en cada condición. Las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

Con el objeto de conocer si los mutantes del exómero son también sensibles a otros compuestos y si el defecto de septación es exclusivo o no del cloruro de potasio, se realizaron los experimentos detallados a continuación.

1.1 *cfr1Δ* es sensible a ciertos compuestos iónicos

Los defectos en crecimiento y septación provocados por el cloruro potásico en el mutante *cfr1Δ* pueden ser consecuencia de daños producidos por el ion potasio, por el ion cloro o por la combinación de ambos. Por este motivo se analizó la sensibilidad y la aparición de problemas de septación en presencia de otros cloruros y otras sales de potasio.

En primer lugar, se realizaron ensayos de crecimiento en gota de las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* en placas de YES suplementadas con cloruro de sodio y con cloruro de magnesio y se incubaron las placas durante dos días a 32°C, la temperatura óptima de crecimiento para *S. pombe*. Como se observa en la **figura 15A** el mutante *cfr1Δ* es ligeramente sensible a 0,15 M de cloruro de sodio y a 0,15 M de cloruro de magnesio (resultados ya publicados. [Hoya et al., 2017](#)); sin embargo, un tratamiento prolongado con estos cloruros no provoca un defecto en la septación como el observado tras el tratamiento con KCl (**figura 15B**).

Los resultados anteriores podrían indicar que el mutante del exómero es sensible a los cloruros. Sin embargo, cuando se analizó el crecimiento en presencia de cloruro de litio se observó que el mutante *cfr1Δ* crece algo mejor que el silvestre en placas de YES suplementadas con una concentración de 2 mM de cloruro de litio (**figura 15A**). Este resultado indica que *cfr1Δ* solamente es sensible a algunos cloruros. Cabe destacar que tampoco se produjo la aparición de septos engrosados tras tratar las células con cloruro de litio durante tiempos prolongados, en las mismas condiciones en las que aparece el defecto de septación con cloruro de potasio (**figura 15B**).

Respecto a otras sales de potasio, se eligió el acetato de potasio. Las placas con acetato de potasio a distintas concentraciones se incubaron a 32°C durante dos días. Como se observa en la **figura 15A** el mutante *cfr1Δ* es muy sensible a este compuesto, las concentraciones empleadas son muy bajas porque la cepa silvestre es sensible a concentraciones más altas. Se comprobó

que la sensibilidad no se debe a la acidificación del medio, puesto que los cultivos en medio YES con acetato de potasio no presentan mayor acidez que los cultivos en medio YES (medidas realizadas con tiras comerciales y con pHímetro). En la cepa *cfr1Δ* el tratamiento con acetato de potasio provoca la aparición de múltiples células encadenadas, un fenotipo indicativo de un defecto en la separación de las células hijas. Sin embargo, no produce el defecto en la morfología de los septos observado en presencia de cloruro de potasio (**figura 15B**).

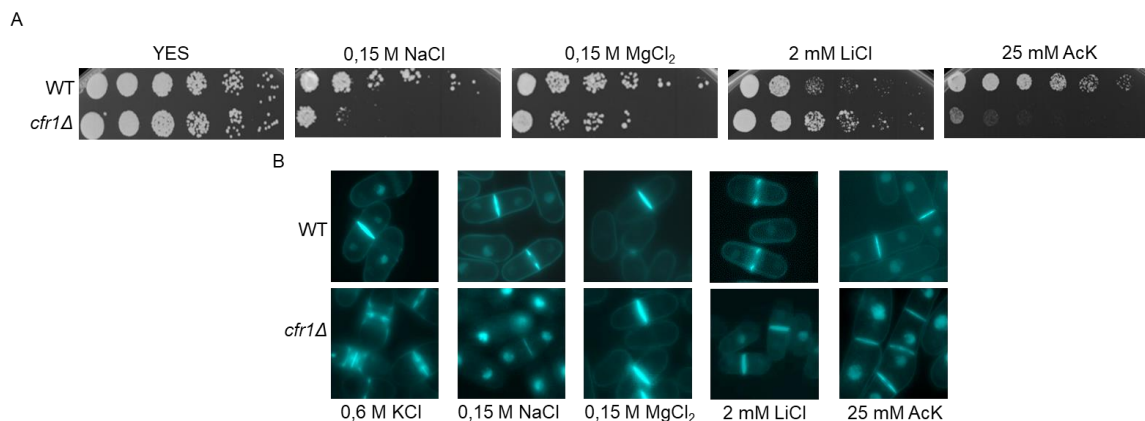


Figura 15. Fenotipos del mutante *cfr1Δ* en presencia de compuestos iónicos.

A. Análisis del crecimiento en presencia de NaCl, MgCl₂, LiCl y acetato de potasio. Ensayo de gota en placas de medio YES con los compuestos que se indican, inoculando diluciones seriadas (1:4) de cada cepa (WT y mutante *cfr1Δ*). Las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

B. Tinción con Hoechst de las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* tras ser tratadas con los distintos compuestos durante 16 horas a 25°C.

En resumen, el mutante *cfr1Δ* es sensible a varios compuestos iónicos, entre los que se encuentran sales de potasio y cloruros. La sensibilidad a estos compuestos no va acompañada por la aparición de septos aberrantes, defecto que parece ser característico del cloruro de potasio y que puede estar relacionado con un crecimiento retardado de *cfr1Δ* en placas con KCl.

1.2 *cfr1Δ* no es sensible a estrés osmótico

El cloruro de potasio, y el resto de las sales empleadas, puede estar provocando estrés osmótico y estrés iónico. Con el fin de discernir a qué tipo de

estrés es sensible el mutante *cfr1Δ* se empleó sorbitol, un agente no iónico que incrementa la osmolaridad del medio.

En la **figura 16A** se observa que el mutante del exómero es capaz de crecer perfectamente en presencia de 1,2 M de sorbitol, igual que una cepa silvestre. Además, el sorbitol no provoca ningún tipo de defecto en la septación (**figura 16B**).

El sorbitol es un estabilizador osmótico, debido a esto es capaz de permitir el crecimiento de cepas que tengan problemas en la pared celular al impedir que se produzca la lisis celular. Dado que en trabajos anteriores del laboratorio (Hoya et al., 2017) se había descrito que los mutantes del exómero presentan defectos en la pared celular, si la sensibilidad de *cfr1Δ* al cloruro de potasio se debiera a defectos en la pared el sorbitol podría corregir el crecimiento retardado en KCl. Con el fin de discernir si este es el caso se realizaron ensayos de gota en placas con cloruro de potasio más sorbitol. Como se observa en la **figura 16A** el sorbitol no soluciona los problemas de crecimiento en KCl y, por tanto, parece que estos no se deben a los defectos en la pared celular de *cfr1Δ*.

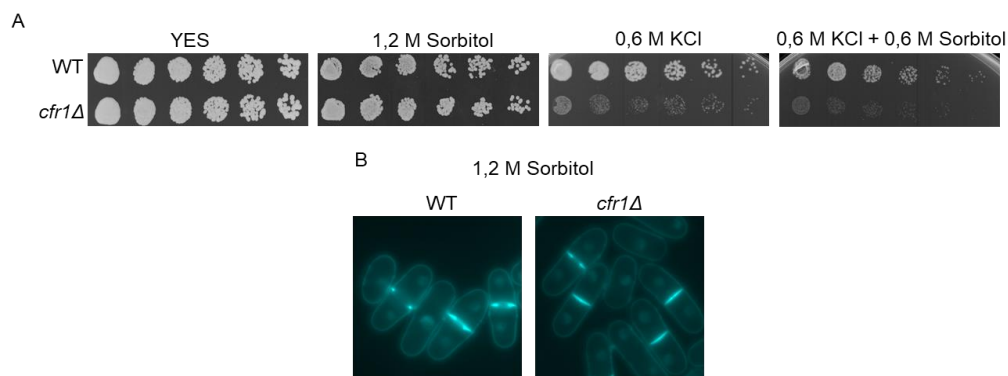


Figura 16. Crecimiento y septación en presencia de sorbitol.

A. Ensayo de crecimiento en gota, empleando diluciones seriadas (1:4) de cada cepa (WT y *cfr1Δ*), en placas de YES con los distintos compuestos. Placas incubadas durante dos días a 32°C.

B. Tinción con Hoechst de las cepas silvestre y *cfr1Δ* tratadas con sorbitol durante 16 horas a 25°C.

Resumiendo, el mutante *cfr1Δ* es sensible a estrés iónico y no a estrés osmótico. Además, la sensibilidad de los mutantes del exómero a KCl no parece deberse a defectos en pared celular que alteren la integridad celular.

1.3 *cfr1Δ* es sensible a cambios en la homeostasis del calcio

Conocida la sensibilidad del mutante del exómero a compuestos iónicos se decidió emplear más compuestos relacionados con este tipo de estrés. El cloruro de calcio provoca sensibilidad al mutante *cfr1Δ*, como se observa en la **figura 17A**; curiosamente el EGTA, un compuesto quelante de iones bivalentes, también inhibe el crecimiento del mutante. Estos resultados indican que el mutante *cfr1Δ* es sensible a variaciones en la concentración de calcio, y posiblemente de ion magnesio (puesto que también es quelado por el EGTA), y por este motivo cambios en la homeostasis de estos iones provocan defectos en su crecimiento.

En un apartado posterior de esta memoria se profundiza en el estudio de la ruta de respuesta a calcio en los mutantes del exómero.

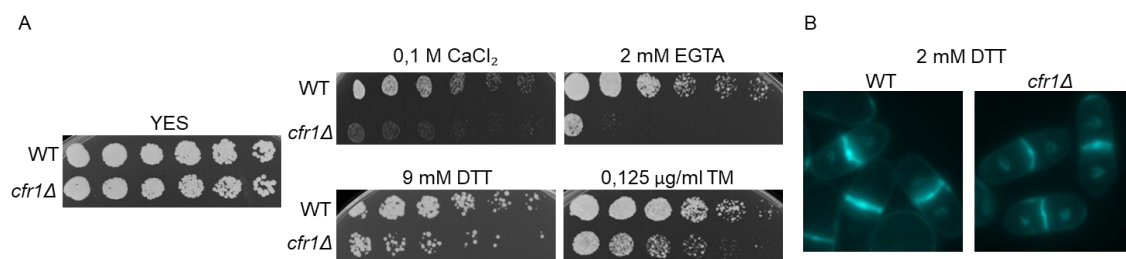


Figura 17. Análisis del crecimiento ante cambios de la homeostasis del calcio y en presencia de inductores de la UPR. Fenotipo de septación en presencia de DTT.

A. Ensayo de crecimiento en gota de las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* en placas de YES con los compuestos indicados. Las placas se incubaron durante dos días a 32°C. Se utilizaron diluciones seriadas (1:4) de cada cepa.

B. Fenotipo de septación en DTT. Las células de la cepa silvestre y del mutante *cfr1Δ* fueron tratadas durante dieciséis horas con 2 mM de DTT y posteriormente fueron teñidas con Hoechst para visualizar los núcleos y, de manera inespecífica, los septos en el microscopio de fluorescencia.

1.4 *cfr1Δ* es sensible a DTT y tunicamicina

El DTT y la tunicamicina son dos agentes que se utilizan para analizar si un mutante es sensible a estrés. Estos compuestos alteran el crecimiento de mutantes con defectos en la pared celular y, además, provocan estrés en el retículo endoplasmático, por lo que se emplean como inductores de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, en sus siglas en inglés). El DTT es un agente

reductor que provoca estrés en el retículo endoplasmático al impedir la formación de puentes disulfuro (Kimmig et al., 2012). La tunicamicina evita la N-glicosilación de las proteínas, provocando también estrés en el retículo endoplasmático.

En la **figura 17A** se observa que el mutante *cfr1Δ* es ligeramente sensible a ambos compuestos. Este resultado podría deberse a una potenciación de los ligeros daños en la pared celular del mutante *cfr1Δ* (Hoya et al., 2017), puesto que pueden interferir con la síntesis de las manoproteínas; pero también podría indicar que en ausencia del exómero las células son más sensibles al estrés en el retículo endoplasmático o presentan defectos en la UPR, tema que se aborda posteriormente en esta memoria. Para evitar la oxidación del DTT las placas se prepararon un día antes de su empleo, la incubación de las placas con ambos compuestos se realizó a 32°C durante un par de días.

También se observó que el DTT provoca un defecto en septación, tanto a las células silvestres como a las de los mutantes del exómero; este defecto consiste en que, en presencia de DTT, los septos tienen un engrosamiento en su parte central, observable en la **figura 17B**. Este es un defecto diferente al producido por KCl.

1.5 *cfr1Δ* es hipersensible a higromicina

La higromicina B es un antibiótico aminoglicosídico, obtenido de *Streptomyces hygroscopicus*, que inhibe la traducción. Además, inhibe el crecimiento de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con defectos en glicosilación a una concentración de 50 µg/ml (Ali et al., 2004) y a mutantes con problemas en el tráfico hacia las vacuolas a concentraciones aún más bajas.

Existen mutantes de *S. cerevisiae* hipersensibles a higromicina B (*hhy mutants*), muchos de los cuales tienen afectado el tráfico en la interfaz Golgi-endosoma tardío, sin que se conozca la razón para esta sensibilidad (Banuelos et al., 2010). En la **figura 18** se observa que el mutante *cfr1Δ* de *S. pombe* es sensible a bajas concentraciones de higromicina B, resultado que refuerza los obtenidos previamente en el laboratorio que indicaban que el exómero de *S. pombe* es requerido para el tráfico entre el *Trans-Golgi Network* y los endosomas (Hoya et al., 2017).

La sensibilidad del mutante del exómero a la higromicina B no está relacionada con la inhibición de la traducción que provoca este compuesto porque, como se observa en la **figura 18**, el mutante *cfr1Δ* no es más sensible que la cepa silvestre a cicloheximida, un potente inhibidor de la traducción al que tampoco son sensibles muchos de los mutantes *hhy* de *S. cerevisiae*. (Ejzykowicz et al., 2016).

En resumen, el mutante *cfr1Δ* es sensible a higromicina, un fenotipo relacionado con fallos en la interfaz TGN-endosomas tardíos y con la regulación de la respuesta TORC1 de *S. cerevisiae* (Ejzykowicz et al., 2016).

1.6 *cfr1Δ* no es sensible a monensina A

La monensina A es un antibiótico ionóforo obtenido de *Streptomyces cinnamonensis*. Este compuesto interfiere con los intercambios Na^+/H^+ y K^+/H^+ y en *S. cerevisiae* se utiliza como un indicador de defectos en la funcionalidad de las vacuolas porque interfiere en el mantenimiento del pH ácido de estas (Gustavsson et al., 2008).

El mutante *cfr1Δ* no es sensible a monensina A, como se ve en la **figura 18**. Este resultado, junto con el hecho de que no se encontraron diferencias entre el mutante del exómero y el silvestre ni en el crecimiento en medio YES tamponado a distintos pHs ni en la tinción de las vacuolas con quinacrina (resultados recientes del laboratorio), indica que el mutante *cfr1Δ* no tiene un defecto en la regulación del pH que provoque sensibilidad a compuestos que lo modifiquen.

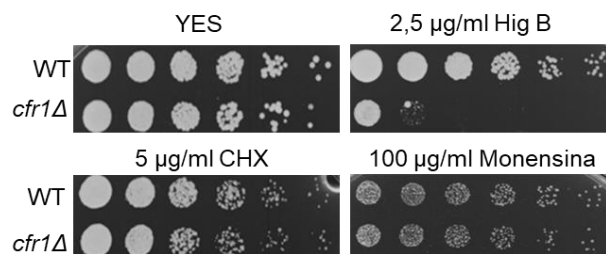


Figura 18. Análisis del crecimiento en presencia de inhibidores de la traducción y de monensina A.

Ensayo de crecimiento en gota de las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* en placas de YES con los compuestos indicados, se inocularon diluciones seriadas (1:4) de cada cepa. Las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

1.7 *cfr1Δ* no es sensible a H₂O₂

Algunos mutantes, como *sty1Δ*, son sensibles a estrés iónico y además a estrés oxidativo. Por lo tanto, para completar el análisis del fenotipo de los mutantes carentes del exómero, se analizó si el mutante *cfr1Δ* era sensible a estrés oxidativo, empleando el mutante *sty1Δ* como control. En la **figura 19** se observa que el mutante *cfr1Δ* no es sensible a agua oxigenada, agente causante de estrés oxidativo ampliamente utilizado en la literatura. Dado que el agua oxigenada es muy inestable, las placas empleadas para este experimento se hicieron el día antes de su utilización.

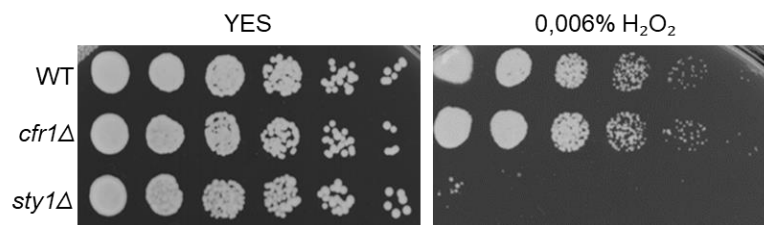


Figura 19. Análisis del crecimiento en presencia de estrés oxidativo.

Ensayo de crecimiento en gota de las cepas silvestre y mutantes *cfr1Δ* y *sty1Δ* en placa de YES con H₂O₂. Se emplearon diluciones seriadas (1:4) de cada cepa y las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

2. Análisis de la posible implicación de bombas y canales iónicos en el fenotipo de los mutantes del exómero

2.1 Búsqueda de interacciones mediante rastreos genéticos

En el apartado 1 de la sección de resultados se ha descrito la sensibilidad del mutante *cfr1Δ* al estrés iónico. Una de las causas de este fenotipo podría ser que en ausencia del exómero, un complejo implicado en el transporte de proteínas, algún canal o bomba iónica no esté localizado correctamente. Con el objetivo de buscar genes que interactúen con el exómero en la respuesta a estrés, en el laboratorio se han llevado a cabo diferentes tipos de rastreos genéticos. En un ensayo de complementación del fenotipo de sensibilidad a KCl de *cfr1Δ* con una genoteca multicopia solo se obtuvo resultado positivo con un plásmido que poseía el gen *cfr1+*. En rastreos de dos híbridos utilizando tanto

Cfr1 como Bch1 como cebos, no se obtuvo ninguna proteína que pudiera ser un cargo potencial del exómero; una posible explicación podría ser que los cargos serían proteínas transmembrana, difíciles de detectar por este método. En un análisis proteómico diseñado para buscar proteínas que se asocian físicamente con Cfr1 tampoco se encontró ningún posible canal o bomba iónica, a pesar de que las muestras se extrajeron con detergentes.

Con el fin de identificar genes relacionados funcionalmente con *cfr1*⁺ y *bch1*⁺ se realizaron los rastreos de interacciones génicas (SGA, de *Synthetic Genetic Array*) que se describen en el Anexo de esta memoria. En estos rastreos se buscaron mutantes que crecieran peor que los mutantes del exómero en placas de YES incubadas a 28°C. Entre los resultados obtenidos se encontró interacción génica, no muy reproducible, con algunos mutantes en canales iónicos que no están bien caracterizados. En un intento de afinar estos resultados, se identificaron en la colección de mutantes nulos de Bioneer aquellos carentes de genes correspondientes a potenciales canales/bombas iónicas y se analizó su crecimiento en presencia de distintas concentraciones de KCl y MgCl₂. Si el fenotipo de sensibilidad de los mutantes carentes del exómero se debiera a que un canal/bomba iónica no llega a su lugar de actuación, se esperaría que el mutante carente de dicha proteína presentara el mismo patrón de sensibilidades que *cfr1*Δ. Aunque algunos mutantes son sensibles a KCl o a MgCl₂ (**figura SI**, en el Anexo), ninguno se comportó como el mutante del exómero. El mutante *spac1635.01*Δ (carente del gen que codifica un canal selectivo de aniones dependiente de voltaje, que se localiza en la membrana externa de la mitocondria) es ligeramente sensible a KCl y a MgCl₂. Aunque este dato podría ser interesante, el hecho de que este mutante sea sensible a estrés oxidativo (H₂O₂) (Pombase.org) y *cfr1*Δ no, *a priori* descarta a este canal como un cargo del exómero. Por lo tanto, no se continuó con su estudio.

2.2 Análisis de canales de potasio descritos

Un hecho que se ha de tener en cuenta es que en *S. pombe* muchos canales iónicos no están caracterizados; de entre los que sí están descritos se decidió realizar experimentos con canales de potasio porque el mutante *cfr1*Δ es

sensible a cloruro de potasio y a acetato de potasio. Se procedió a analizar si la delección de alguno de los canales de potasio provoca fenotipos similares a los del mutante del exómero en presencia de distintos compuestos.

Como se puede apreciar en la **figura 20**, la delección del canal de entrada de potasio *trk2*⁺ no provoca sensibilidad a cloruro de potasio, acetato de potasio, cloruro de magnesio o higromicina B, en contrapunto con la delección del exómero; si bien está descrito que el mutante con la delección de los dos canales *trk* sí es sensible a higromicina B, esa cepa no es sensible a altas concentraciones de potasio (de hecho, a lo que es sensible es a bajas concentraciones de potasio) (Calero et al., 2000; Calero and Ramos, 2003). Si la sensibilidad del mutante del exómero a compuestos de potasio se debiera a una mayor entrada de K⁺ a través del canal Trk2, el mutante *trk2Δ cfr1Δ* no sería sensible a estos compuestos y, sin embargo, sí lo es, aunque menos sensible que *cfr1Δ* a acetato de potasio. Por tanto, parece que la sensibilidad a KCl no se debe a la acción de Trk2, pero la sensibilidad a acetato de potasio si se corrige en parte si el potasio no puede entrar a través de Trk2. También se corrige la sensibilidad a cloruro de magnesio y a higromicina B (**figura 20**).

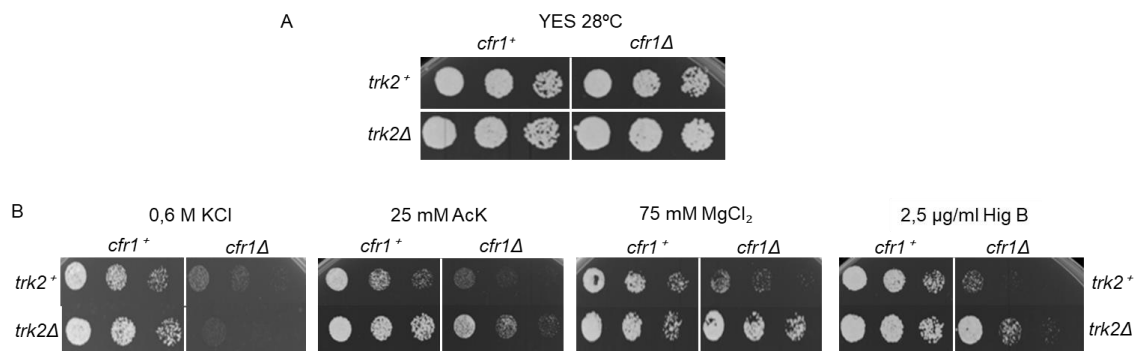


Figura 20. Análisis del crecimiento de las cepas que carecen de *trk2*⁺.

A. Ensayo de crecimiento en gota de las cepas silvestre, *cfr1Δ*, *trk2Δ* y *trk2Δ cfr1Δ* a 28°C.

B. Ensayo de crecimiento en gota de las cepas silvestre, *cfr1Δ*, *trk2Δ* y *trk2Δ cfr1Δ* a 28°C en presencia de distintos compuestos químicos.

Se incubaron tres diluciones seriadas 1:4 de células de cada cepa en las distintas placas durante dos días.

Cta3 es una bomba de exporte de potasio que está sometida a la regulación por los genes *tup*. Además, la delección de los genes *tup* provoca sensibilidad a compuestos iónicos, pero no a estrés osmótico (Greenall et al.,

2002), a semejanza de lo que ocurre con la delección del exómero. Por ello cabía la posibilidad de que el exómero podría estar regulando la función del canal Cta3.

La delección conjunta de la bomba de salida de potasio *cta3⁺* y sus reguladores negativos *tup11⁺* y *tup12⁺* provoca unas sensibilidades a cloruro de potasio y a higromicina B ligeramente más reducidas que las del mutante *cfr1Δ* (aunque dentro del mismo entorno de concentraciones) (**figura 21A**). En la **figura 21A** se observa que, a pesar de no haber interacción génica entre *bch1⁺* y *cta3⁺* y sus reguladores en cuanto al crecimiento a distintas temperaturas, sí existe una ligera interacción génica entre el exómero y el canal *cta3⁺* en presencia de cloruro de potasio y de higromicina B. Estos resultados pueden estar indicando que el exómero y Cta3 (junto a la acción de sus reguladores negativos) están llevando a cabo funciones paralelas en el mismo proceso, proceso que al fallar provoca sensibilidad a cloruro de potasio y a higromicina B.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que el exómero es importante para garantizar la localización polarizada de Ena1 (homólogo de Cta3) (Anton et al., 2017). Para determinar si Cta3 es un cargo del exómero, se analizó la localización y la cantidad de Cta3 con y sin cloruro de potasio en las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ*. Como se puede observar en la **figura 21B**, la localización de Cta3 es similar en las células del silvestre y del mutante *cfr1Δ*; observándose en la superficie celular, principalmente en la zona del ecuador celular donde se forma el septo. Este resultado indica que Cta3 se localiza de manera correcta tanto en el silvestre como en el mutante *cfr1Δ* sin y con KCl.

Para resumir los resultados del apartado 2: los canales iónicos descritos no parecen ser un cargo del exómero. Aunque hay cierta relación entre el exómero y Cta3, la sensibilidad a KCl no se debe a un defecto en la localización de Cta3. De igual manera, aunque la sensibilidad a acetato de potasio y a cloruro de magnesio se corrige eliminando Trk2 esto no ocurre en presencia de KCl. Estos resultados son una fuerte indicación de que ni Cta3 ni Trk2 son cargos únicos del exómero.

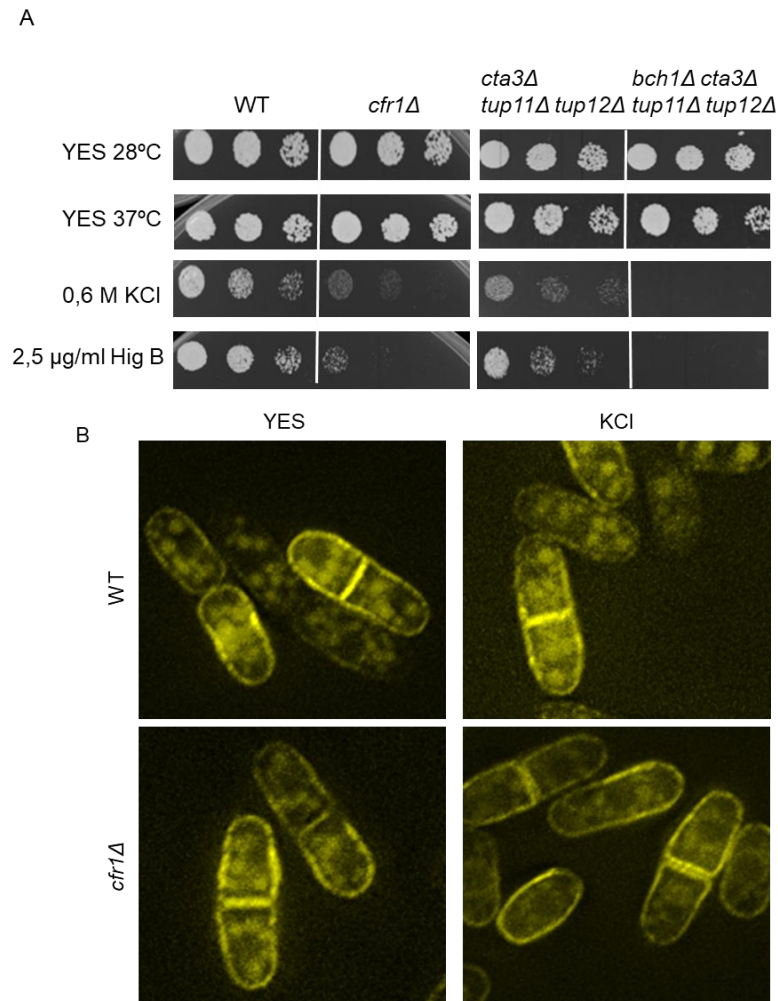


Figura 21. Análisis de la relación funcional entre Cta3 y el exómero.

A. Ensayo de gota utilizando tres diluciones seriadas 1:4 de células de cada cepa, placas incubadas durante dos días en los medios y temperaturas indicadas. Las placas con los compuestos se incubaron a 28°C.

B. Localización de Cta3. Proyección máxima de tres planos realizados con un sistema DeltaVision. Se utilizaron las cepas WT y *cfr1*Δ, tratadas y sin tratar durante una hora con 0,6 M de KCl.

3. Estudio de la posible relación entre el exómero y la ruta de la calcineurina

Las células cuentan con varias rutas de señalización que promueven una respuesta adaptativa para garantizar su supervivencia en condiciones de estrés. Por lo tanto, es posible que los mutantes del exómero sean sensibles a estrés por tener defectos en alguna de estas rutas. En el subapartado 1.3 de Resultados se ha descrito la sensibilidad de los mutantes del exómero a cambios en la

homeostasis del calcio. Una posible explicación de estos resultados sería que el exómero tuviera una función en la ruta del calcio mediada por la fosfatasa calcineurina. La calcineurina es una fosfatasa de la que se conoce su implicación tanto en la citocinesis de la levadura de fisión como en la homeostasis del calcio o de los cloruros. Además, la regulación de los niveles de calcio es necesaria para la supervivencia en presencia de estrés celular (como es el estrés osmótico, iónico. [Ma et al., 2011](#)).

3.1 Existe interacción funcional entre el exómero y los canales de entrada de calcio en presencia de KCl

La entrada de calcio a las células tiene lugar a través de los canales Cch1 y Yam8. Además, estos canales provocan la subida de la concentración de ion calcio intracelular en presencia de ciertos cloruros ([Ma et al., 2011](#)). Se quiso analizar la relación funcional entre estos canales y el exómero.

En primer lugar, se analizó el crecimiento de las deleciones de ambos canales (cepas *cch1Δ* y *yam8Δ*) en cloruro de potasio, comparándolo con el crecimiento de *cfr1Δ*. Los mutantes carentes de los canales son muy sensibles a cloruro de potasio, incluso a concentraciones a las que apenas es sensible el mutante del exómero, como se ve en la **figura 22**. Esto concuerda con que Cch1 y Yam8 tienen funciones beneficiosas en presencia de cloruro de potasio que les hace necesarios para crecer en presencia de esta sal.

A continuación, se analizó el crecimiento de los mutantes dobles, aquellos que no tienen uno u otro canal y tampoco el exómero. Los mutantes dobles crecen aún peor que cualquiera de los mutantes simples en presencia de la sal, como se puede observar en la **figura 22**. Esto indica que en presencia de estrés iónico existe interacción génica entre el exómero y los canales de entrada de calcio y que quizás tengan funciones paralelas en el control de la homeostasis iónica. Este resultado sugiere que estos canales no serían cargos del exómero.

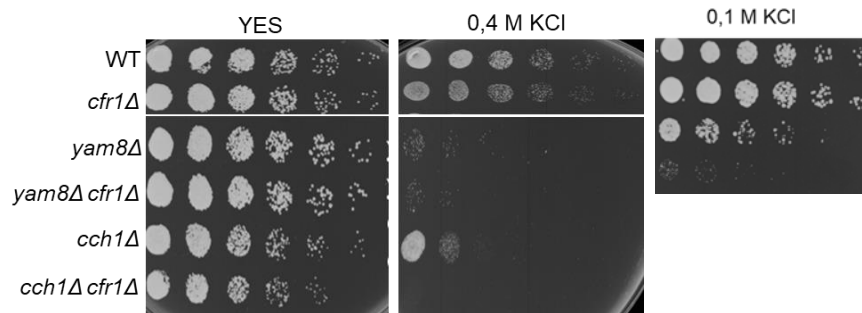


Figura 22. Análisis del crecimiento de las cepas sin los canales Yam8 o Cch1.

Ensayo de gota inoculando diluciones seriadas 1:4 de cada cepa que se dejaron crecer durante dos días a 32°C en los medios indicados.

3.2 La sensibilidad de *cfr1Δ* al cloruro de potasio no se debe a la falta de la calcineurina

Una vez que el calcio se encuentra dentro de la célula se produce su unión a la fosfatasa calcineurina, lo que provoca la activación de la ruta de la calcineurina para la regulación de la homeostasis del calcio (Liu et al., 2015). La fosfatasa calcineurina consta de dos subunidades, una catalítica (Ppb1) y una reguladora (Cnb1). La delección de *ppb1+* provoca sensibilidad a cloruros de potasio, sodio y magnesio, pero no a sorbitol (Ma et al., 2011), fenotipos similares a los de *cfr1Δ*. La falta de la subunidad reguladora Cnb1 provoca algo menos de sensibilidad a KCl. El mutante doble *ppb1Δ cfr1Δ* crece peor en presencia de cloruro de potasio que los mutantes sencillos (**figura 23A**), lo que apunta a que la calcineurina y el exómero participan en vías diferentes en respuesta a esta sal.

El resultado anterior indica que, en principio, la sensibilidad del mutante del exómero no se debería a la falta de la actividad de la calcineurina. Para saber si esto era así se sobre-expresaron, bajo el control del promotor *nmt1+3X*, tanto la subunidad catalítica de la calcineurina *ppb1+*, como una variante mutada de este gen, carente del dominio C-terminal (ΔCT), que codifica una forma constitutivamente activa e independiente de Cnb1. Como se observa en la **figura 23B** ninguna de las sobreexpresiones corrige el defecto de crecimiento en presencia de cloruro de potasio del mutante *cfr1Δ*. Este resultado indica que, o bien la ausencia de la calcineurina no es el motivo de la sensibilidad a cloruro de

potasio en ausencia de Cfr1, y ambas proteínas tienen funciones diferentes en respuesta a esta sal, o bien la calcineurina no puede llevar a cabo sus funciones en ausencia del exómero. Para conocer cuál de las dos posibilidades está ocurriendo se analizó la activación de esta ruta en ausencia del exómero.

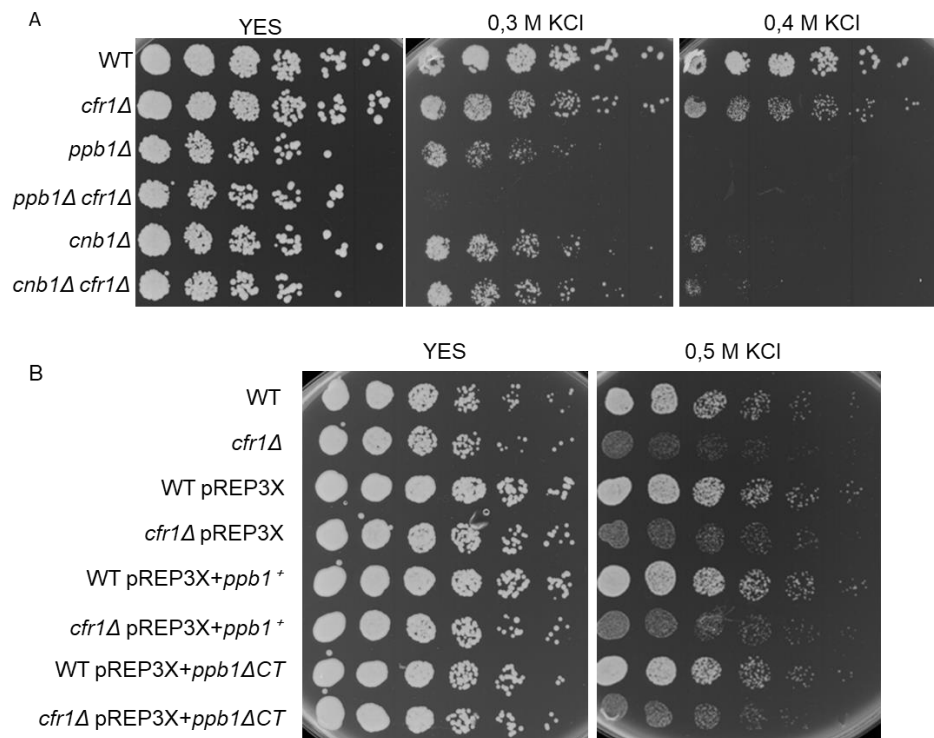


Figura 23. Análisis del crecimiento de las cepas mutantes de la calcineurina.

A. Ensayo de gota. Se inocularon diluciones seriadas 1:4 de las cepas sin la subunidad Ppb1 o sin la subunidad Cnb1 de la calcineurina. Las placas se incubaron dos días a 32°C.

B. Ensayo de gota en el que se inocularon diluciones seriadas 1:4 de cada cepa que se dejaron crecer durante dos días a 32°C en los medios indicados.

pREP3X es el vector vacío, pREP3x+*ppb1*⁺ es la sobreexpresión de la subunidad catalítica (Ppb1) de la calcineurina y pREP3x+ *ppb1*ΔCT es la sobreexpresión de la subunidad catalítica sin su dominio C-terminal, es decir sin regulación por parte de la subunidad reguladora.

3.3 La ruta de la calcineurina se activa en ausencia del exómero

La activación de la ruta de la calcineurina se puede analizar mediante *Western Blot* usando una construcción que consta de la GFP bajo el control del promotor de *prz1*⁺, es decir, un promotor de respuesta a calcineurina (pCDRE). Por tanto, cuando la ruta se activa se produce un incremento en la cantidad de GFP. Utilizando esa construcción se vio que el mutante *cfr1*Δ responde de igual modo que la cepa silvestre a la activación de la ruta con cloruro de calcio, ya que

se produce un incremento similar de la cantidad de GFP tras tratar las células con 0,15 M de la sal durante una hora (**figura 24**). Por tanto, no parece que haya defectos en la activación en ausencia del exómero, lo que demuestra que la sensibilidad a cloruro de calcio del mutante no se debe a fallos en la activación de esta ruta.

Para saber si el cloruro de potasio activa la ruta y si lo hace de un modo diferente en las estirpes silvestre y *cfr1Δ* se realizó un experimento similar al anterior tratando las células con cloruro de potasio. Tras numerosas repeticiones, no se observó un incremento significativo en la cantidad de GFP ni en la cepa silvestre ni en el mutante del exómero tras tratar las células con KCl (**figura 24**).

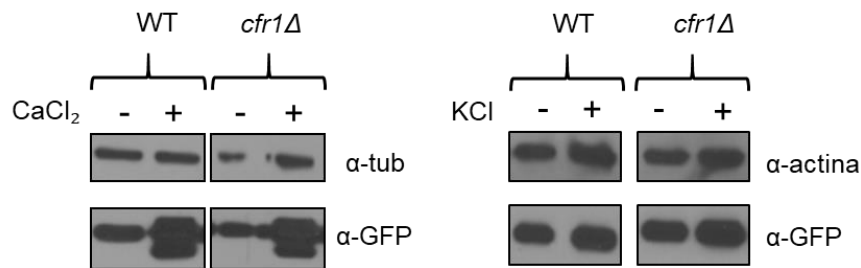


Figura 24. Activación de la calcineurina visualizada mediante *Western Blot*.

En la línea denominada α-GFP se muestra la cantidad de GFP en las cepas WT y *cfr1Δ* transformadas con la construcción pCDRE-GFP e incubadas sin (-) y con (+) cloruro cálcico 0,15 M o cloruro potásico 0,6 M durante una hora a 32°C.

En la línea denominada α-tub o α-actina se muestra el control de carga.

Todo este conjunto de resultados parece indicar que las funciones del exómero y de la ruta de la calcineurina en presencia de altas concentraciones de cloruro de potasio son distintas. La ruta de la calcineurina se activa perfectamente en ausencia del exómero al tratar con calcio las células, y el exómero se localiza perfectamente en presencia de calcio y de EGTA (no mostrado), por lo que parece que ambos complejos no son interdependientes y simplemente ambos tienen funciones tanto en respuesta a estrés iónico como en la citocinesis. Además, la sensibilidad del mutante *cfr1Δ* a cloruro de calcio no se debe a fallos en la ruta de la calcineurina.

4. Análisis de la relación entre el exómero y el estrés en el retículo endoplasmático

El mutante *cfr1Δ* es ligeramente sensible a DTT y a tunicamicina, como se ha descrito en el subapartado 1.4. Estos dos compuestos pueden interferir con la síntesis de la pared celular y, además, son agentes causantes de estrés en el retículo endoplasmático e inductores de la respuesta a proteínas mal plegadas. Por otro lado, la UPR es un mecanismo homeostático que se induce de manera preventiva en algunas situaciones que requieren un incremento en la síntesis de proteínas, como es la citocinesis (Bicknell et al., 2007). Además, en los rastreos de dos híbridos realizados en el laboratorio se identificó a Get3 usando Bch1 como cebo. Finalmente, en el experimento de proteómica realizado en el laboratorio para identificar proteínas que interaccionan físicamente con Cfr1 se identificaron todos los componentes de COPII, una cubierta vesicular que facilita el transporte entre el RE y el Golgi. Todos estos datos sugieren que puede haber cierta interacción funcional entre el exómero y el RE. Con el fin de averiguar si había alguna relación entre la sensibilidad a KCl de los mutantes, el RE y la UPR se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

4.1 El retículo endoplasmático presenta cambios en su morfología/ organización en el mutante *cfr1Δ* tratado con KCl

Con el fin de observar la morfología del RE se visualizó Bip1 unida a GFP. Bip1 es una chaperona soluble que reside en este orgánulo y participa en la UPR. La localización de Bip1 en todo el retículo endoplasmático permite observar tanto el retículo cortical, cercano a la membrana plasmática, como el retículo perinuclear.

Como se muestra en la **figura 25A**, la morfología del RE del mutante *cfr1Δ* no es aparentemente diferente de la del silvestre en ausencia de estrés. Tampoco hay cambios detectables en la morfología de este orgánulo en presencia de cloruro potásico en las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* cuando el tratamiento con cloruro de potasio es breve (una hora, dos horas; no mostrado). Sin embargo, a tiempos largos de tratamiento (a partir de siete horas de

incubación a 28°C), aparece una mayor continuidad de Bip1-GFP en la zona próxima a la membrana plasmática en el mutante *cfr1Δ*, como se observa en la **figura 25A**. Cabe mencionar que en células tumorales existe una mayor cantidad de BiP1/GRP178 en la superficie celular (Zhang et al., 2010), lo que indica que este cambio en la localización de la chaperona puede ser una respuesta general a estrés. En cualquier caso, ese cambio no es específico de Bip1, puesto que también se observó cambio en el RE utilizando los marcadores Tts1 (una proteína del retículo con cuatro dominios transmembrana) o Sec24 (un componente de COPII que se encuentra localizado en los EREs) (**figura 25A**).

4.2 En ausencia del exómero se secreta menos Bip1 al medio extracelular

La mayor cantidad de Bip1 visualizada en la proximidad de la membrana plasmática hace pensar que se podría estar secretando una mayor cantidad de esta proteína al medio extracelular, hecho que es fácilmente analizable observando por *Dot-Blot* de colonias la cantidad de Bip1 excretada y retenida en filtros de nitrocelulosa.

Este experimento se realizó empleando placas de YES, o de YES suplementado con 0,6 M de cloruro de potasio, y dejando las células crecer y secretar proteínas al medio extracelular durante treinta horas a 28°C, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Como se ve en la **figura 25B**, en la membrana procedente de la placa de YES o de la placa de YES con cloruro de potasio se observa que el mutante *cfr1Δ* excreta menos Bip1-HA que la cepa silvestre. También se observa que el tratamiento con cloruro potásico incrementa la secreción de Bip1 en ambas cepas. El incremento inducido es proporcional al nivel basal, de modo que *cfr1Δ* tratado con KCl excreta menos Bip-HA que el silvestre tratado.

Este resultado indica que en ausencia del exómero hay una menor secreción de Bip1. Además, el KCl aumenta la secreción, al menos la de Bip1, hacia el medio extracelular. Finalmente, este resultado indica que la redistribución de Bip1 hacia zonas del retículo próximas a la membrana plasmática en el mutante *cfr1Δ* tratado con KCl no se correlaciona con un

aumento en la secreción de Bip1, sino más bien con una disminución en su secreción.

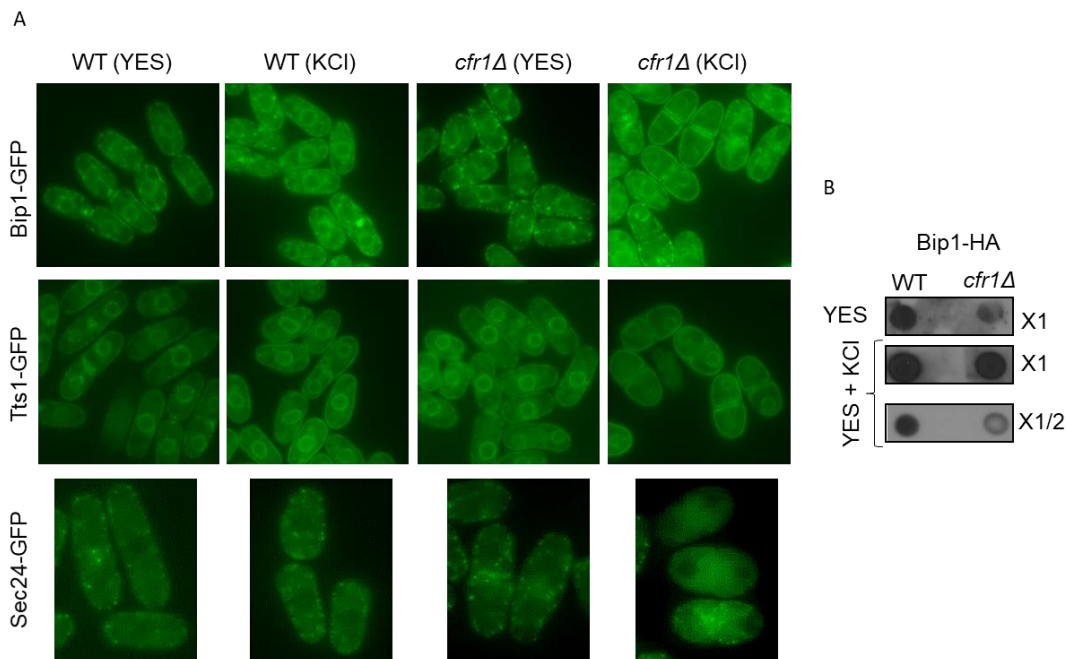


Figura 25. Morfología del retículo endoplasmático. Secreción de Bip1-HA.

A. Observación de Bip1-GFP, Tts1-GFP y Sec24-GFP en las cepas WT y *cfr1Δ* incubadas sin/ con tratamiento largo (7h) con KCl.

B. *Dot-Blot* de las cepas WT y *cfr1Δ* en medio YES y YES con KCl. Se empleó el anticuerpo α -HA.

La línea superior muestra el resultado en medio YES, la línea del medio el resultado en YES+0,6 M KCl, con la misma exposición de la película al revelar que en el caso de YES, y por último la línea inferior muestra la membrana de YES+KCl menos expuesta, para apreciar las diferencias entre las dos cepas.

4.3 Análisis del fenotipo de las cepas *ire1Δ* e *ire1Δ cfr1Δ*

El mutante *cfr1Δ* es ligeramente sensible a DTT y tunicamicina, dos agentes inductores de la respuesta a proteínas mal plegadas. La delección de *ire1+* es también sensible a estos compuestos. Ire1 es una proteína sensora-quinasa que participa en la UPR. Para profundizar en el análisis de la relación funcional entre el exómero y esta ruta de respuesta a estrés, se comparó el fenotipo de sensibilidad a estos compuestos de las cepas silvestre, *cfr1Δ*, *ire1Δ* e *ire1Δ cfr1Δ*. En la **figura 26** se observa que la cepa *cfr1Δ* es igual de sensible a DTT y menos a tunicamicina que la cepa *ire1Δ*. La cepa *ire1Δ cfr1Δ* presenta un crecimiento intermedio entre *ire1Δ* y *cfr1Δ* en presencia de tunicamicina, este

resultado parece indicar que Cfr1 tiene una función contraria a la de Ire1 en presencia de este compuesto.

Posteriormente, se analizó el crecimiento de los mutantes de la UPR en presencia de compuestos iónicos. Como se observa en la **figura 26**, *ire1Δ* e *ire1Δ cfr1Δ* son igual de sensibles que *cfr1Δ* a cloruro de sodio; *ire1Δ* en el caso del cloruro de magnesio y de compuestos de potasio se comporta como la cepa silvestre. Mientras que el mutante doble se comporta como *cfr1Δ* en cloruro de magnesio y de potasio; en acetato de potasio el mutante doble es resistente, como el silvestre, lo que indica que *ire1Δ* suprime la sensibilidad de *cfr1Δ* a este compuesto.

Estos resultados indican que la relación entre las funciones de Ire1 y del exómero es compleja, de manera que la UPR y el exómero parece que tienen funciones antagónicas en presencia de ciertos compuestos y que podrían compartir funciones en presencia de otros compuestos. Por otro lado, Ire1 no es necesaria para crecer en compuestos de potasio ni en cloruro de magnesio, lo que sugiere, *a priori*, que una alteración en la UPR no sería la razón por la que los mutantes del exómero son sensibles a estrés iónico.

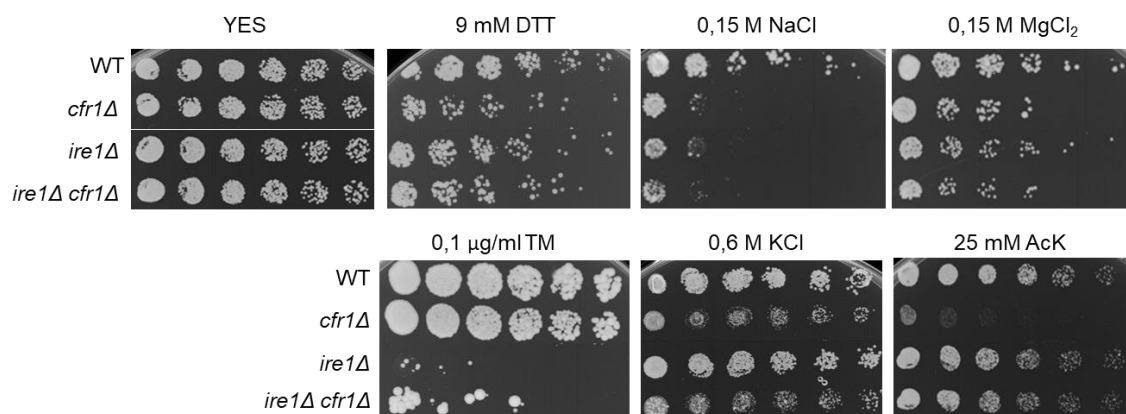


Figura 26. Interacciones génicas entre *cfr1*⁺ e *ire1*⁺.

Ensayo de crecimiento en gota en presencia de los compuestos indicados de las cepas WT, *cfr1Δ*, *ire1Δ* e *ire1Δ cfr1Δ*. De cada cepa se inocularon diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

4.4 Ire1 es necesaria para la formación de septos aberrantes en los mutantes del exómero en presencia de KCl

Se quiso conocer si la función de Ire1 es necesaria para que se produzca el defecto en la formación del septo que se observa en *cfr1Δ* en presencia de cloruro de potasio tras tratamientos prolongados. En la **figura 27** se observa que el mutante *ire1Δ* no presenta ningún defecto en la septación. En el caso del mutante *cfr1Δ* el porcentaje de células con septos aberrantes es del 48%, mientras que en el mutante doble *ire1Δ cfr1Δ* este porcentaje es de solo un 2% de las células. Este resultado indica que la formación del septo aberrante requiere la presencia de Ire1, con una función que puede ser dependiente o independiente de la UPR.

Para discernir entre esas dos posibilidades, se analizó el fenotipo de septación en otros mutantes relacionados con la UPR. Los mutantes elegidos fueron *gas2Δ* y *gpt1Δ*. *gas2⁺* es una diana de Ire1, su ARN sufre un procesamiento cuando se activa la UPR (Kimmig et al., 2012); *gpt1⁺* participa en el ciclo de la calnexina/ calreticulina (Fanchiotti et al., 1998) y, por lo tanto, en la corrección de fallos en el plegamiento de proteínas y su disfunción dispara la UPR. Además, se analizó la morfología de los septos en los mutantes dobles *gas2Δ cfr1Δ* y *gpt1Δ cfr1Δ*. Al contrario de lo que ocurre en el caso de *ire1Δ cfr1Δ*, estos mutantes dobles presentan el septo engrosado característico de *cfr1Δ* (**figura 27**). Por tanto, puede que la función de Ire1 como sensor de la UPR no esté implicada en la formación del septo engrosado.

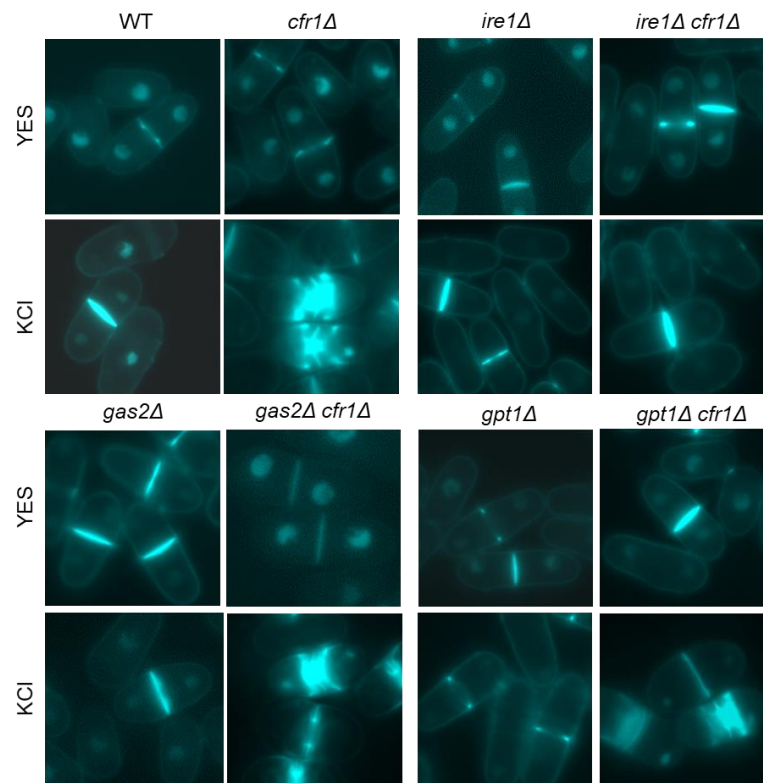


Figura 27. Análisis de la morfología de los septos en presencia de KCl.

Tinción con Hoechst de las cepas silvestre, mutante *cfr1Δ* y mutantes de la UPR tras ser tratadas con cloruro potásico durante 16 horas a 25°C.

4.5 Análisis de la activación de la UPR en *cfr1Δ*

En *S. pombe*, cuando tiene lugar la activación de la UPR se produce un proceso denominado RIDD, por el cual ciertos mensajeros son procesados de modo que sufran cortes en regiones específicas. Uno de los mensajeros degradados es el de *gas2*⁺ (Kimmig et al., 2012). Para analizar si en el mutante *cfr1Δ* existen fallos en la activación de la UPR se realizó una construcción que consta de la ORF de *gas2*⁺ fusionada a la GFP, bajo el control del promotor y del terminador de *nda2*⁺, que codifica la α -tubulina. Las células se trataron durante una hora y media con tunicamicina a una concentración de 1 μ g/ml a 30°C y se observó la cantidad de GFP mediante *Western Blot*.

En la **figura 28A** se observa cómo en una cepa silvestre, al activarse la UPR en presencia de tunicamicina, se produce un descenso en la cantidad de Gas2-GFP, debido a la degradación del mensajero. Además, se detecta una banda de menor tamaño, que posiblemente se corresponda con la forma no

glicosilada de la proteína tras el tratamiento con tunicamicina (debido a que esta droga inhibe la N-glicosilación). En una cepa *ire1Δ* el nivel basal de Gas2 es mayor que en el control; este resultado estaría de acuerdo con la existencia de un nivel basal de actividad de la UPR en el silvestre sin tratar, que no existiría en el mutante carente del sensor-quinasa Ire1. En respuesta a tunicamicina no se produce el descenso en la cantidad total de Gas2-GFP en este mutante, aunque tras el tratamiento con la droga la mayor parte de la proteína se observa en la banda de menor tamaño. La cepa *cfr1Δ* se comporta como la cepa silvestre, aunque parece que hay una menor cantidad de Gas2 incluso en condiciones basales que podría estar diciendo que la UPR está más activa (**figura 28A**).

Por tanto, parece que en *cfr1Δ* la UPR se activa en respuesta a tunicamicina. Habría que analizar en más profundidad si en este mutante la UPR se activa más que en una cepa silvestre, hecho que podría dar también lugar a un menor crecimiento en presencia de los compuestos inductores de la UPR y a que la cepa *ire1Δ cfr1Δ* crezca de manera intermedia respecto a los dos parentales.

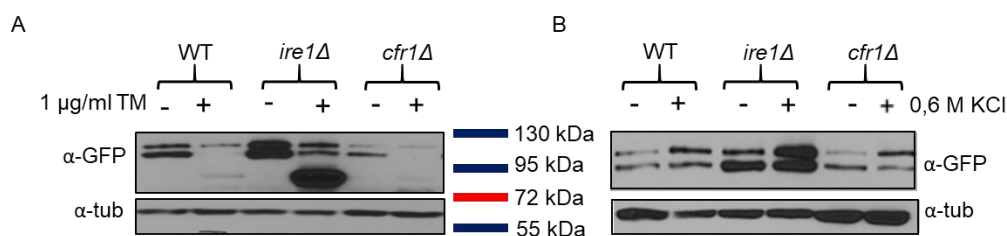


Figura 28. Análisis de la activación de la UPR.

La activación de la ruta de respuesta a estrés en el retículo se observa mediante *Western Blot* visualizando la cantidad de Gas2-GFP. La proteína Gas2 está bajo el control del promotor y el terminador de la tubulina. La carga total de cada muestra se observa como cantidad de tubulina presente.

A. *Western Blot* de las cepas tratadas con (+) y sin (-) tunicamicina (1 μg/ml), un agente inductor de la UPR. Se muestra el patrón para conocer el tamaño de cada banda.

B. *Western Blot* de las cepas tratadas con (+) y sin (-) 0,6 M de cloruro potásico.

4.6 Análisis de la activación de la UPR en presencia de cloruro potásico

Para analizar la activación de la UPR en presencia de la sal se recurrió a la misma construcción descrita en el subapartado anterior y se utilizaron las mismas cepas. En esta ocasión las células se trataron con 0,6 M de cloruro de potasio durante una hora y media a 30°C. Como se puede observar en la **figura 28B**, en la cepa silvestre no se produce una disminución de la cantidad de Gas2-GFP en presencia de cloruro potásico, lo que descarta *a priori* que el KCl active la UPR. De hecho, se aprecia un aumento en la cantidad de Gas2-GFP, lo que podría indicar una inhibición del nivel basal de la ruta. Sin embargo, dado que en la cepa *ire1Δ* también se produce un incremento en la cantidad de Gas2-GFP en las células tratadas, cabe pensar que este efecto sería independiente de la activación de la UPR (o que se debe a una función de Ire1 independiente de la UPR), dado que en *ire1Δ* no hay señalización de UPR ni RIDD. Respecto al mutante *cfr1Δ* tratado con KCl, el resultado indica que el comportamiento es similar al de la cepa silvestre (**figura 28B**). También se produce un incremento en la cantidad de Gas2 cuando su gen está expresado bajo el control de su propio promotor en la cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* tratadas con KCl (no mostrado). En cualquier caso, será necesario realizar más experimentos para confirmar estos datos.

El conjunto de resultados de este apartado 4 indica que la relación entre el exómero y la respuesta a estrés originada en el retículo endoplasmático es compleja, y no parece que el fenotipo de *cfr1Δ* en respuesta a KCl se deba, al menos exclusivamente, a una alteración en la respuesta al estrés en el RE.

5. Estudio de la ruta de respuesta a estrés

Esta ruta responde a distintos tipos de estrés, tanto a estrés térmico, como oxidativo u osmótico. El mutante *sty1Δ*, al que le falta la MAPK de la ruta, es sensible a compuestos a los que también lo es el mutante *cfr1Δ*, como por ejemplo a KCl. Por esta razón se quiso conocer si existe relación funcional entre esta ruta de respuesta a estrés y el exómero. Para averiguarlo se analizó si hay interacción genética entre mutantes de la ruta y mutantes *cfr1Δ* o *bch1Δ*, y si la activación de la ruta está alterada en ausencia del exómero.

5.1 Fenotipos del mutante doble *sty1Δ cfr1Δ*

Con el fin de conocer si existe interacción génica entre *cfr1+* y *sty1+*, se analizó el crecimiento de la cepa carente de ambos genes respecto al crecimiento de las cepas parentales en presencia de distintos tipos de estrés. El mutante doble *sty1Δ cfr1Δ* crece a temperaturas elevadas, esto indica que no existe interacción génica entre ambos genes con respecto al estrés térmico (no mostrado).

A continuación, se analizó la capacidad de crecimiento de *sty1Δ cfr1Δ* en presencia de compuestos iónicos a los que son sensibles las cepas parentales. Los ensayos de gota se realizaron en placas de medio YES con los distintos compuestos e incubadas a 32°C, una temperatura en la que el mutante doble es capaz de crecer. En presencia de cloruro de potasio es más sensible el mutante *sty1Δ* que el mutante *cfr1Δ*; el mutante doble resultó ser aún más sensible que el mutante sencillo *sty1Δ* (**figura 29A**).

En presencia de acetato de potasio el mutante *sty1Δ* es capaz de crecer; sin embargo, el mutante doble es incapaz de crecer a concentraciones en las que *cfr1Δ* crece ligeramente (**figura 29A**). Este resultado está indicando que la necesidad de Sty1 para crecer en presencia de acetato de potasio solo ocurre en ausencia del exómero. Posiblemente la ruta de estrés no sea la ruta primordial para permitir el crecimiento en este compuesto, pero en ausencia del exómero

se haga necesaria para garantizar una ligera supervivencia de los mutantes carentes del exómero en presencia de esta sal.

En presencia de cloruro de sodio *sty1Δ* es más sensible que el mutante del exómero y el mutante doble *sty1Δ cfr1Δ* es más sensible que cualquiera de los mutantes sencillos (**figura 29A**). Este resultado indica que para la supervivencia en presencia de cloruro de sodio son necesarias tanto la función del exómero como de Sty1, que actuarían en paralelo.

El cloruro de magnesio no provoca grandes defectos de crecimiento al mutante *sty1Δ* en comparación con la cepa silvestre, pero sí al mutante *cfr1Δ*. El mutante doble presenta un crecimiento ligeramente mejor que el mutante sencillo *sty1Δ* y notablemente mejor que el mutante del exómero (**figura 29A**). El hecho de que la delección de *sty1⁺* suprima parcialmente a *cfr1Δ* indica que la activación de la ruta de estrés en los mutantes del exómero es perjudicial en presencia de esta sal.

Estos resultados indican que la relación funcional entre el exómero y Sty1 depende del compuesto que produce el estrés. En cloruro de sodio y de potasio ambos son necesarios para el crecimiento y actúan en paralelo.

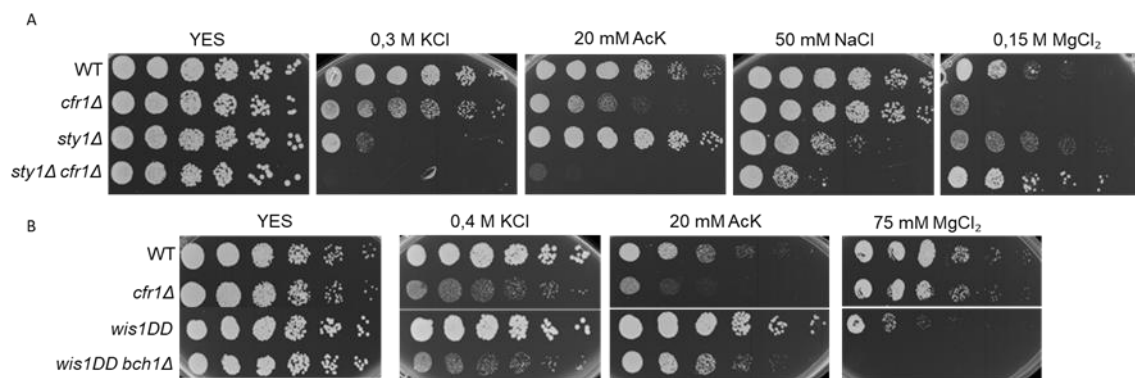


Figura 29. Interacciones genéticas entre *cfr1⁺/bch1⁺* y la ruta de respuesta a estrés.

A. Ensayo de crecimiento en gota de las cepas WT, *cfr1Δ*, *sty1Δ* y *sty1Δ cfr1Δ*. De cada cepa se inocularon seis concentraciones, las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

B. Ensayo de crecimiento en gota de las cepas WT, *cfr1Δ*, *wis1DD* y *wis1DD bch1Δ*. De cada cepa se inocularon seis concentraciones, las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

5.2 Fenotipos del mutante *wis1DD bch1Δ*

Para completar los resultados del subapartado anterior se analizó el crecimiento de cepas *wis1DD*, que expresan una forma constitutivamente activa de la quinasa Wis1, la MAPKK de la ruta de estrés que lleva a cabo la fosforilación de Sty1. Estas cepas permitirían saber si la activación de Sty1 es perjudicial en ausencia del exómero (lo que explicaría la mejoría en el crecimiento en cloruro de magnesio del mutante doble respecto al mutante sencillo *cfr1Δ*), o si la activación constitutiva de la ruta es capaz de suprimir alguno de los fenotipos de *cfr1Δ*, lo que situaría a la ruta por “debajo” del exómero, en una ruta funcional común de respuesta a estrés.

Los resultados obtenidos mostraron que en presencia de cloruro de potasio el mutante *wis1DD* crece como la cepa silvestre y el mutante doble *wis1DD bch1Δ* crece como el mutante del exómero (**figura 29B**). Estos resultados indican que ni el fenotipo de sensibilidad a KCl de los mutantes del exómero se debe a una hiperactivación de la ruta que pudiera ser perjudicial en estas condiciones, ni la forma fosfomimética de Wis1 suprime la sensibilidad. Los resultados también sugieren que en presencia de KCl las funciones que tienen Sty1 y el exómero son distintas.

En presencia de acetato de potasio el mutante *wis1DD* crece mejor que una cepa silvestre y el mutante doble *wis1DD bch1Δ* crece mejor que la cepa *cfr1Δ* (**figura 29B**). Estos resultados conducen a la misma conclusión del subapartado anterior (resultados obtenidos con la cepa *sty1Δ cfr1Δ*), la ausencia de Sty1 es perjudicial en presencia de acetato de potasio, sobre todo si el exómero está ausente, por ello, en ausencia del complejo la “activación” de la ruta suprime parcialmente el fenotipo, ayudando a las células a crecer.

La cepa *sty1Δ cfr1Δ* crece ligeramente mejor en cloruro de magnesio que la cepa *cfr1Δ*; este resultado hacía presuponer que en presencia de esta sal una cepa carente del exómero en la que la ruta de respuesta a estrés estuviera “hiperactiva” crecería peor que el mutante del exómero. Como se observa en la **figura 29B**, la cepa *wis1DD* crece poco y el mutante doble *wis1DD bch1Δ* es incapaz de crecer a bajas concentraciones de cloruro de magnesio. Estos

resultados señalan que la activación de la ruta de estrés es perjudicial para crecer en presencia de cloruro de magnesio y más si no hay exómero.

En resumen, de los dos últimos apartados, la activación de la ruta favorece el crecimiento en presencia de acetato de potasio, no tiene efecto en presencia de KCl y es perjudicial en presencia de cloruro de magnesio. Estos resultados indican que la sensibilidad a estrés salino en ausencia del exómero es compleja y seguramente no se deba a una única causa.

5.3 Activación de la ruta de estrés en ausencia del exómero

Finalmente, se analizó la activación de la ruta de estrés en presencia de algunos compuestos mediante la detección de Sty1 fosforilada con el anticuerpo α -p38.

En primer lugar, se analizó la activación en presencia de cloruro de potasio. En una cepa silvestre se detecta la fosforilación de Sty1 a partir de los quince minutos de tratamiento con la sal. En el mutante *cfr1* Δ la fosforilación tiene lugar en igual medida y a los mismos tiempos que en la cepa silvestre. Por tanto, la activación de la ruta por KCl en ausencia del exómero no está alterada (**figura 30**). Este resultado está de acuerdo con el hecho de que el mutante doble *sty1* Δ *cfr1* Δ crecía peor que los sencillos, lo que indicaba que la función de Sty1, como activadora de la ruta para sobrevivir al cloruro de potasio, es diferente de la que tiene el exómero en presencia de esta sal.

En acetato de potasio la activación tiene lugar a los quince minutos de tratamiento, tanto en la cepa silvestre como en la cepa *cfr1* Δ (**figura 30**). En presencia de cloruro de magnesio hubo mucha variabilidad experimental lo que dificultó la comparación de la activación.

Con este conjunto de resultados se concluye que la sensibilidad a cloruro de potasio no se debe a un defecto de la actividad de la ruta de estrés, aunque

sí existe interacción entre las funciones de exómero y Sty1 en respuesta a este compuesto.

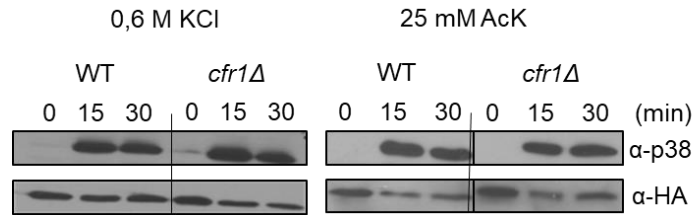


Figura 30. Activación de la ruta de estrés.

La activación de la ruta de estrés se observa mediante *Western Blot* visualizando la cantidad de Sty1 que se encuentra fosforilada (α -p38). La cantidad total de Sty1 se corresponde con la banda denominada α -HA. Las cepas WT y *cfr1Δ* se incubaron a 32°C durante los tiempos indicados con cloruro de potasio y con acetato de potasio.

6. Relación entre la ruta de integridad celular y el exómero

La ruta de integridad responde a numerosos tipos de estrés, como por ejemplo a estrés iónico, osmótico, térmico o a daños en la pared celular. La delección de la quinasa de la ruta, Pmk1/Spm1, produce sensibilidad a ciertos compuestos a los que son sensibles los mutantes del exómero, es el caso de cloruro de potasio en altas concentraciones o de Caspofungina (Hoya et al., 2017). Se quiso analizar si los fenotipos de sensibilidad del mutante *cfr1Δ* se deben a fallos en la ruta de integridad.

6.1 Interacción entre *cfr1+* y *pmk1+* /*spm1+*

Para conocer la existencia de interacción entre *cfr1+* y *pmk1+*, se comparó el crecimiento del mutante doble *pmk1Δ cfr1Δ* con el de los mutantes sencillos y el de la cepa silvestre en distintas condiciones de estrés. Como se puede observar en la **figura 31**, el mutante nulo de la quinasa (*pmk1Δ*) es mucho menos sensible a KCl que *cfr1Δ*. El mutante doble crece de manera intermedia a 0,5 M de KCl, corrigiendo parcialmente la sensibilidad de *cfr1Δ*.

En presencia de acetato de potasio no hay sensibilidad de la cepa *pmk1Δ*, y el mutante doble crece igual que el mutante *cfr1Δ* (**figura 31**); por tanto, la sensibilidad a acetato de potasio no parece deberse a que exista relación con la ruta de integridad.

En presencia de cloruro de sodio la delección de *pmk1+* suprime la sensibilidad de *cfr1Δ* (**figura 31**), lo que indica que la activación de esta ruta podría ser perjudicial para los mutantes del exómero en presencia de esta sal. Respecto al cloruro de magnesio, el mutante *pmk1Δ* crece mejor que la cepa silvestre en presencia de esta sal, de acuerdo con resultados publicados (Balcells et al., 1998). El mutante doble crece de manera similar al mutante *pmk1Δ* (**figura 31**). Estos resultados sugieren que la activación de la ruta de integridad celular es perjudicial (en presencia de cloruros de sodio y de magnesio) tanto en un silvestre como en ausencia del exómero.

De estos resultados se concluye que en presencia de KCl existe una interacción compleja entre el exómero y Pmk1 y que, posiblemente, la actividad de Pmk1 es la que provoca (o contribuye a) la sensibilidad a cloruro de sodio o a cloruro de magnesio en ausencia del exómero.

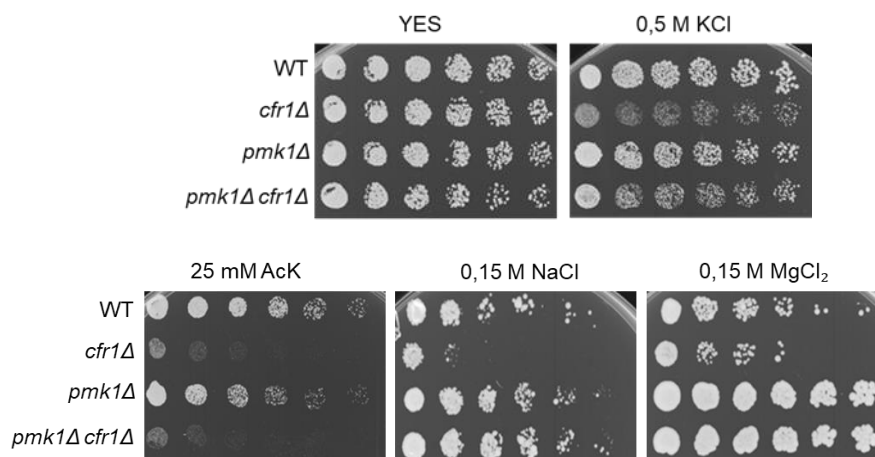


Figura 31. Interacciones génicas entre *cfr1+* y *pmk1+*.

Ensayo de crecimiento en gota de las cepas WT, *cfr1Δ*, *pmk1Δ* y *pmk1Δ cfr1Δ*. De cada cepa se inocularon seis diluciones seriadas 1:4, las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

6.2 La quinasa Pmk1 es necesaria para la formación del septo engrosado en presencia de KCl

Una vez estudiada la posible relación entre el exómero y la quinasa en términos de los fenotipos de sensibilidad en placa se procedió a analizar la aparición de septos engrosados tras tratar las células durante tiempos prolongados con KCl. En la **figura 32** se observa que en estas condiciones el mutante *pmk1Δ* presenta un defecto en la separación celular. Además, el mutante doble presenta el mismo fenotipo, y no el fenotipo de septos engrosados de *cfr1Δ*. Este resultado indica que la quinasa Pmk1 es necesaria para la formación del septo engrosado, que se observa en los mutantes del exómero tratados durante tiempos prolongados con KCl.

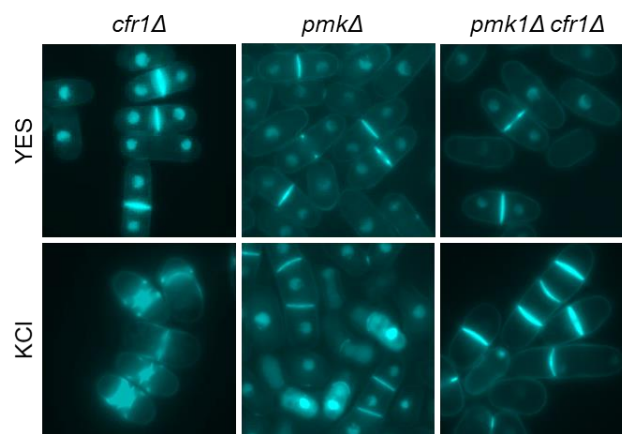


Figura 32. Búsqueda en diversas cepas del fenotipo de septación provocado por el KCl a la cepa *cfr1Δ*.

Tinción con Hoechst de las cepas mutante *cfr1Δ* y mutantes *pmk1Δ* tras ser tratadas con los distintos compuestos durante 16 horas a 25°C.

6.3 Activación de la ruta en ausencia del exómero

A continuación, se analizó la activación de la ruta de integridad en los mutantes del exómero; la activación se determina observando mediante *Western Blot* la cantidad de Pmk1 que se encuentra fosforilada. En este caso el anticuerpo empleado para detectar la forma fosforilada de la quinasa es p44/42, mientras que el anticuerpo α -HA se utiliza para detectar la cantidad total de Pmk1.

En la estirpe control tratada con 0,6 M de KCl se observa un pico de activación a los quince minutos, que se va reduciendo a lo largo del tiempo; en la **figura 33** se muestra el resultado para los tiempos 0-15-30 minutos. En una cepa *cfr1Δ* la activación es algo menor que la del silvestre a los quince minutos y casi indetectable a continuación (a partir de los treinta minutos de tratamiento) (**figura 33**), de manera que el pico de activación es más breve. Cuando se analizó la activación de la ruta con acetato de potasio también se observó que la ruta está activa durante menos tiempo en ausencia del exómero que en la cepa control (**figura 33**).

Para comprobar si el mutante *cfr1Δ* es incapaz de activar la ruta correctamente en cualquier condición se empleó la Caspofungina (agente inductor de estrés en la pared celular). Como se observa en la **figura 33** el mutante activa la ruta perfectamente en presencia del antifúngico.

En conjunto, estos resultados indican que el potasio está afectando a la activación de la ruta en ausencia del exómero, aunque no se puede afirmar con rotundidad que esa sea la causa de la sensibilidad a las sales de potasio.

Además, se vio que tras dieciséis horas de tratamiento en presencia de cloruro de potasio, tratamiento que induce la aparición de septos aberrantes, la ruta está menos activa (**figura 33**). El hecho de que en la cepa *pmk1Δ* no se produzcan los septos aberrantes demuestra que este defecto en la septación no es una consecuencia de una falta de señalización mediada por la ruta. Además, *pmk1Δ* crece bien a esa concentración de KCl. Estos datos sugieren que, o bien ambos defectos son independientes de la función que tiene la quinasa Pmk1 en la ruta de integridad, o bien que la activación incorrecta de la ruta de integridad es más perjudicial que la ausencia de esta, y es la causante tanto de la sensibilidad en placa como de la alteración de la septación.

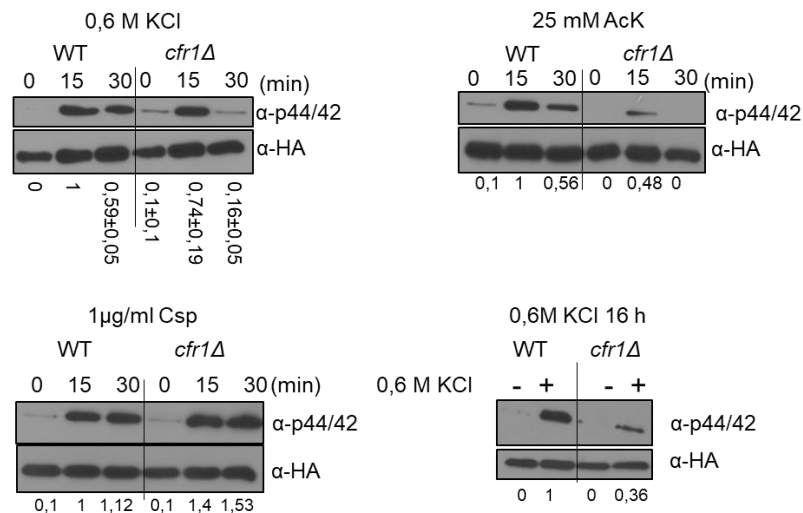


Figura 33. Activación de la ruta de integridad.

La activación de la ruta de integridad se observa mediante *Western Blot* a partir de la visualización de la cantidad de Pmk1/Spm1 que se encuentra fosforilada (α -p44/42). La cantidad total de Pmk1/Spm1 es la banda denominada α -HA.

Las cepas WT y *cfr1Δ* se trataron a lo largo del tiempo con KCl, acetato de potasio y Caspofungina (Csp) a 32°C, o a 25°C durante 16 horas con cloruro de potasio.

Para intentar determinar si los efectos de la delección de la quinasa en la cepa *cfr1Δ* están relacionados con su función en la ruta de integridad se analizaron los mismos fenotipos en ausencia de Pmp1, una fosfatasa que media la inactivación de la ruta. El mutante doble *pmp1Δ cfr1Δ* es ligeramente más sensible a cloruro de potasio que *cfr1Δ* (**figura 34**) y presenta el fenotipo de septos aberrantes (no mostrado). Por otro lado, el mutante *pmk1Δ cfr1Δ* es ligeramente más resistente que el mutante *cfr1Δ* a concentraciones bajas de KCl, por lo que parece que la activación de la ruta promovida al eliminar la fosfatasa sería perjudicial, mientras que la eliminación total de la ruta (*pmk1Δ*) favorecería ligeramente el crecimiento y permitiría que no haya septo engrosado.

En presencia de cloruro de magnesio las células no son capaces de crecer si se mantiene activa la ruta, como se ve con los mutantes *pmp1Δ* (**figura 34**) y resultados ya publicados (Madrid et al., 2007); mientras que como ya se ha visto anteriormente la falta de la quinasa de la ruta mejora el crecimiento en cloruro de magnesio; ambos resultados hacen pensar que la activación de la ruta por cloruro de magnesio determina la sensibilidad a este compuesto tanto en la cepa silvestre como, en mayor medida, en ausencia del exómero. Esta opción no se pudo corroborar porque los *Western* para analizar la actividad de la ruta con cloruro de magnesio dieron resultados muy variables.

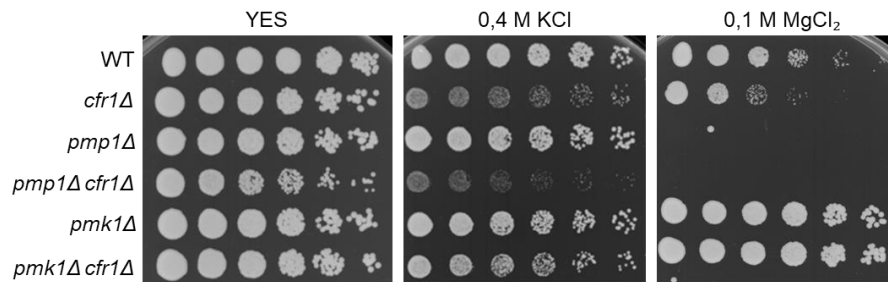


Figura 34. Interacciones génicas entre *cfr1*⁺ y *pmp1*⁺.

Ensayo de crecimiento en gota de las cepas WT, *cfr1*Δ, *pmp1*Δ, *pmp1*Δ *cfr1*Δ, *pmk1*Δ y *pmk1*Δ *cfr1*Δ. De cada cepa se inocularon seis diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

6.4 Relación entre el exómero y otros componentes de la ruta

Para obtener más información acerca de la relación entre la ruta de integridad y el exómero se realizaron los ensayos que se describen a continuación.

La activación de la ruta se inicia con la activación de las GTPasas de la familia Rho mediante sus GEF, ver Introducción. Los Rho implicados son Rho1 y Rho2, por este motivo se quiso comprobar si la sobreexpresión de alguno de ellos permitía el crecimiento del mutante en presencia de cloruro de potasio. Los resultados mostraron que ni provocando la sobreexpresión de ninguno de ellos con el plásmido bajo el control del promotor *nmt1*⁺ 3x en MM-leucina sin o con tiamina para controlar el encendido del promotor, ni con el plásmido multicopia pAL (expresando las proteínas bajo el control de su propio promotor) en medio YES, se observó crecimiento del mutante *cfr1*Δ en presencia de cloruro de potasio (no mostrado). Estos resultados indican que la menor activación de la ruta no se debe a la falta de actividad de Rho. La sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de Rho1, *Rho1G15V*, tampoco tuvo mucho efecto en el crecimiento de la cepa *cfr1*Δ en presencia de cloruro de potasio (ni de acetato de potasio, ni de cloruro de magnesio) como se observa en la **figura 35**.

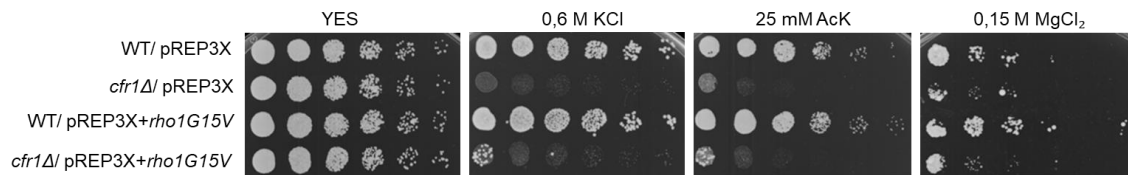


Figura 35. Sobre-expresión de la forma constitutivamente activa de Rho1, *Rho1G15V*. Ensayos de gota utilizando diluciones seriadas 1:4 de las cepas sin/ con el plásmido con la forma constitutivamente activa de la GTPasa Rho1. Placas incubadas a 32°C.

Otra aproximación que se usó para estudiar la relación entre el exómero y la ruta de integridad fue analizar la localización de algunos de los componentes de la ruta en el mutante del exómero. La propia Pmk1, la quinasa de la ruta de integridad, se localiza correctamente, en los polos y en el septo (no mostrado). El GEF de Rho1, Rgf1, se localiza en septo y polos de las células control y *bch1Δ* cultivadas en ausencia de estrés; sin embargo, el comportamiento del GEF es diferente en ambas estirpes al añadir KCl al medio de cultivo. En la estirpe silvestre la mayoría de Rgf1 deja de observarse en la superficie celular a los quince minutos de tratamiento y vuelve a detectarse en septo y polos a los treinta minutos, de acuerdo con los resultados publicados (Kabeche et al., 2015). En ausencia del exómero, la mayor parte de Rgf1 también se internaliza a los quince minutos de tratamiento, pero no recupera la localización cortical a los treinta minutos (**figura 36**). Por lo tanto, este regulador positivo de la ruta de integridad celular ve afectada su dinámica de localización en ausencia del exómero y en presencia de KCl. Aunque este defecto seguramente contribuye a la mala activación de la ruta de integridad en ausencia del exómero, no es seguro que sea la causa inicial, ya que a los quince minutos de tratamiento con KCl ya se detecta un ligero defecto en la activación, y a este tiempo el comportamiento de Rgf1 es similar en silvestre y mutante.

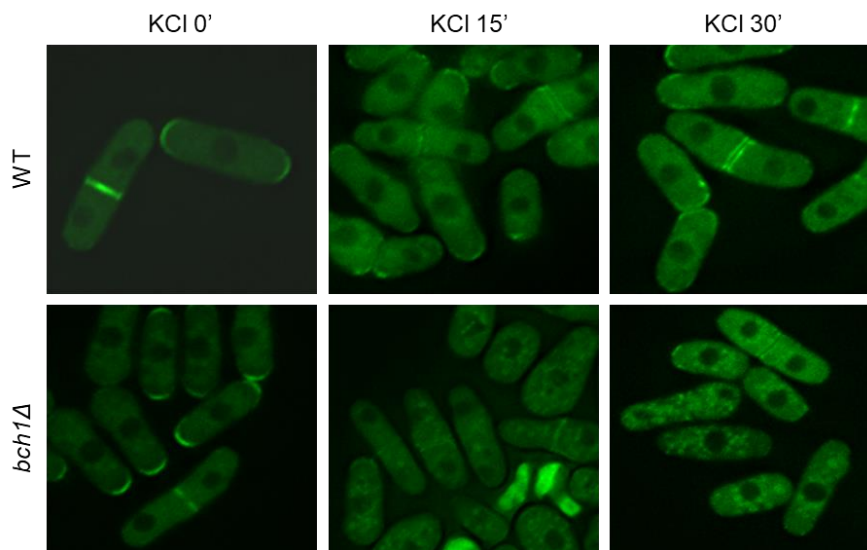


Figura 36. Localización de Rgf1.

Visualización de la proteína Rgf1 en las cepas WT y *bch1Δ* tratadas con 0,6 M KCl durante los tiempos indicados a 32°C. Las imágenes son proyecciones máximas de tres planos tomados con un sistema DeltaVision.

Otra aproximación para estudiar la relación entre la ruta y el exómero fue analizar la presencia del fenotipo *vic* en la cepa *cfr1Δ*; *vic* significa viable en presencia de inmunosupresor y cloruro. En la **figura 37** se puede comprobar como el mutante *cfr1Δ* es sensible a cloruro de magnesio y es muy sensible a la presencia conjunta de cloruro y de FK506 (mientras que a esa concentración de FK506 no lo es); por tanto, no presenta fenotipo *vic*, lo que indica que Cfr1 no es un componente típico de la ruta de integridad.



Figura 37. Ensayo de gota para determinar si existe fenotipo *vic* en el mutante *cfr1Δ*.

Se inocularon las cepas WT y *cfr1Δ* en placas suplementadas con el inmunosupresor Tacrolimus FK506, cloruro de magnesio o ambos compuestos. Las placas se incubaron a 32°C durante dos días.

Tampoco presentan el fenotipo *vic* los mutantes de delección de los homólogos de los sensores de *S. cerevisiae* *wsc1⁺* y *mtl2⁺*, ni la ausencia de estos genes provoca la falta de fosforilación de Pmk1, lo que ha llevado a concluir que no participan en la ruta (Cruz et al., 2013); sin embargo, el mutante doble *mtl2Δ cfr1Δ* parece tener menos activación de la ruta de integridad que incluso el mutante *cfr1Δ* (figura 38A). Esto estaría indicando que Mtl2 tiene una función en la activación de la ruta en ausencia del exómero. A pesar de ello, la localización del sensor Mtl2, y también del sensor Wsc1, es correcta en ausencia del exómero, incluso tratando las células con cloruro de potasio (figura 38B y resultados no mostrados). Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* son resistentes a KCl, mientras que los mutantes dobles con *cfr1Δ* son sensibles (figura 38C). Estos resultados indican que los sensores no son cargos del exómero, aunque tanto el sensor Mtl2 como el exómero tengan funciones en respuesta a KCl.

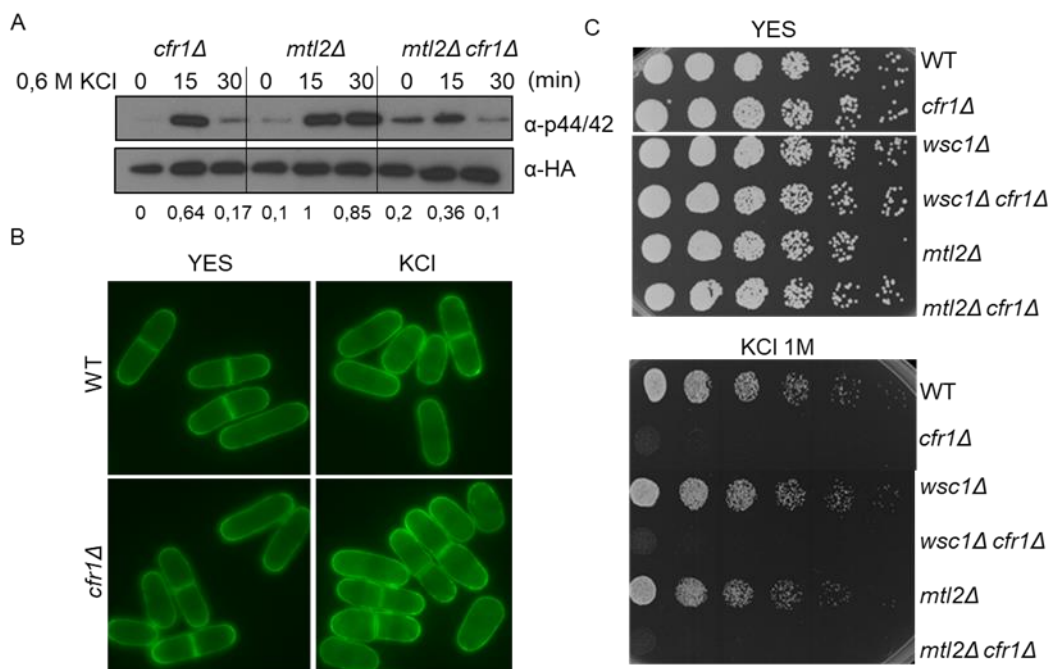


Figura 38. Fenotipos de los mutantes *wsc1Δ cfr1Δ* y *mtl2Δ cfr1Δ*. Localización Mtl2.

A. Activación de la ruta de integridad en las cepas sin *mtl2⁺*.

Las cepas *cfr1Δ*, *mtl2Δ* y *mtl2Δ cfr1Δ* fueron tratadas con KCl a lo largo del tiempo a 32°C. La activación de la ruta de integridad se observa en la banda llamada α-p44/42 y la cantidad total de Pmk1 en la banda denominada α-HA.

B. Visualización en el microscopio Leica de la proteína Mtl2 en las cepas WT y *cfr1Δ* tratadas y sin tratar con KCl durante una hora, a 28°C.

C. Ensayo de crecimiento en gota de los mutantes dobles en comparación con sus sencillos correspondientes en presencia de cloruro potásico. De cada cepa se inocularon diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

Los resultados de este subapartado indican que Cfr1 no es un componente de la ruta, pero sí tiene funciones en su activación en presencia de cloruro de potasio, que podrían estar relacionadas con la dinámica de la localización del GEF de Rho Rgf1 en la superficie celular.

6.5 Análisis de la activación de la ruta de integridad en mutantes del sistema endosomal tratados con KCl

De otros trabajos se sabe que el mutante *apm1Δ* presenta fenotipos similares a los de la delección de *cfr1+*, entre ellos sensibilidad a cloruro de potasio. Por este motivo se procedió a analizar la activación de la ruta de integridad en el mutante sin *apm1+*, codificante de la subunidad mediana del complejo AP-1. En este caso, dado que el mutante *apm1Δ* es termosensible, las células se incubaron a 28°C.

En la **figura 39A** se observa que en estas condiciones el defecto de *cfr1Δ* en la activación de la ruta en presencia de 0,6 M de cloruro de potasio es más severo que a 32°C, y que el mutante *apm1Δ* tiene una activación ligeramente menor que el control a los quince minutos, pero la duración de la activación es similar a la del silvestre. Respecto al crecimiento, el mutante *apm1Δ* presenta una sensibilidad intermedia a cloruro de potasio. El mutante doble *apm1Δ cfr1Δ* apenas crece (**figura 39B** y resultados anteriores del laboratorio. [Hoya et al., 2017](#)) y lo hace aún menos en presencia de cloruro de potasio. Estos resultados sugieren que el exómero y AP-1 realizan funciones paralelas en el tráfico vesicular necesarias para la supervivencia a estrés. Finalmente, *apm1Δ cfr1Δ* no presenta el defecto de septación tras tratamientos largos con cloruro de potasio (**figura 39C**).

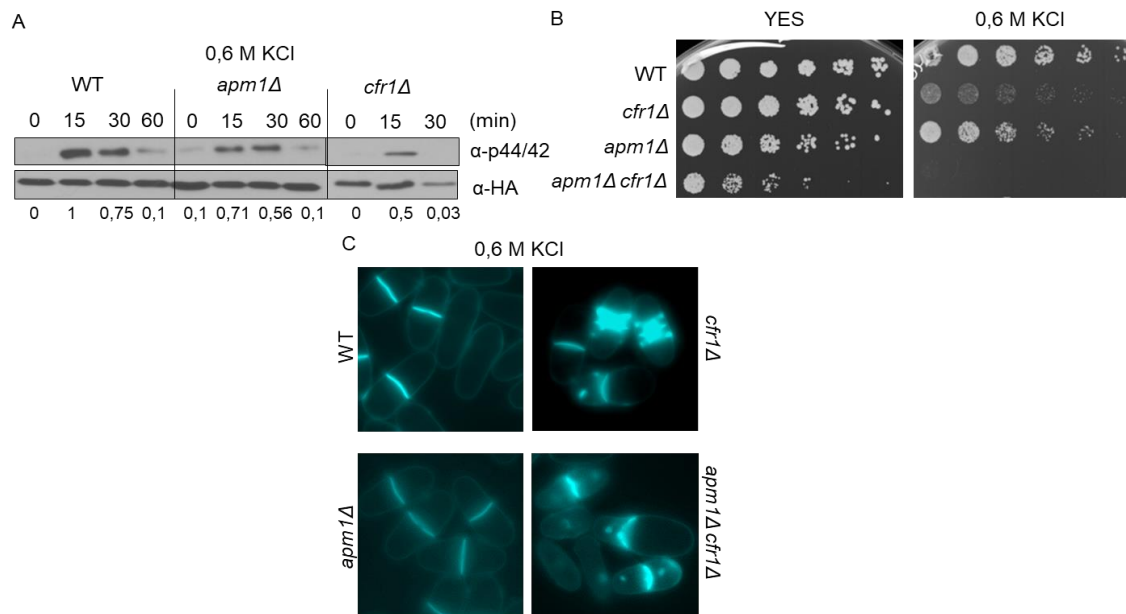


Figura 39. Fenotipos de las cepas *apm1Δ* y *apm1Δ cfr1Δ* en cloruro de potasio.

A. Análisis de la activación de la ruta de integridad.

La activación de la ruta se observa mediante *Western Blot* como cantidad de Pmk1/Spm1 fosforilada (α -p44/42) en relación con la cantidad total de Pmk1/Spm1 (α -HA).

Las cepas WT, *apm1Δ* y *cfr1Δ* se trataron a lo largo del tiempo con KCl a 28°.

B. Interacciones génicas entre *cfr1+* y *apm1+*.

Ensayo de crecimiento en gota de las cepas WT, *cfr1Δ*, *apm1Δ* y *apm1Δ cfr1Δ*. De cada cepa se inocularon diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días a 28°C.

C. Morfología de los septos.

Tinción con Hoechst de las cepas indicadas tratadas durante 16 horas con 0,6 M de cloruro potásico a 25°C.

De estos resultados se concluye que las células con un sistema endosomal dañado, como ocurre si falta el exómero o si falta AP-1, son sensibles a KCl, pero que esta sensibilidad no va asociada en todos ellos a un mismo defecto en la ruta de integridad.

7. Relación entre el exómero y las rutas TOR

Las rutas de señalización TOR regulan el metabolismo y el crecimiento en respuesta a diversas señales ambientales. En el caso de *S. pombe*, mutantes carentes de componentes del complejo TORC2 son sensibles a algunos compuestos a los que también lo son los mutantes del exómero. A continuación

se describen los experimentos que se realizaron para analizar si existe relación funcional entre estas rutas y el exómero. Debido a que los mutantes en las rutas tienen alterada la conjugación, que la frecuencia de obtención de un mutante nulo *cfr1Δ* por transformación con un casete de delección es sumamente ineficiente, y que los mutantes *cfr1Δ* y *bch1Δ* presentan los mismos fenotipos (Hoya et al., 2017), los mutantes dobles necesarios para realizar algunos de estos ensayos no se construyeron por cruce con *cfr1Δ*, sino por transformación con un casete de delección de *bch1⁺*.

7.1 Análisis de interacciones genéticas entre mutantes de los complejos TORC1 o TORC2 y del exómero

En primer lugar, se realizaron ensayos de crecimiento en gota en placas de YES con distintas concentraciones de rapamicina o de torina, compuestos que inhiben las rutas TOR. En la **figura 40** se muestra que el mutante del exómero es capaz de crecer igual que la cepa silvestre en presencia de rapamicina a 110 nM (e incluso a 440 nM, no mostrado). *tor1Δ*, que carece de la quinasa Tor1 del complejo TORC2, es muy ligeramente sensible a una concentración de rapamicina de 110 nM, y el mutante doble *tor1Δ bch1Δ* crece igual de bien que *bch1Δ* y el silvestre. Por su parte, el mutante termosensible *tor2-51*, que tiene una mutación puntual en Tor2, la quinasa del complejo TORC1, es sensible a una concentración de 110 nM de rapamicina. El mutante doble *tor2-51 bch1Δ* es casi igual de sensible, diferenciándose del mutante *bch1Δ*. Estos resultados indican que el mutante *bch1Δ* se parece más, respecto a la respuesta a rapamicina, al mutante *tor1Δ* que a *tor2-51*.

También se analizó el crecimiento en presencia de torina a una concentración de 3 μM. En estas condiciones, *bch1Δ* crece mejor que la cepa silvestre. Ambos mutantes *tor* son sensibles a este compuesto, hecho que indica que la torina está afectando a ambas quinasas y a ambas rutas TOR. La delección del exómero en cualquiera de los mutantes de las quinasas corrige su sensibilidad a torina (**figura 40**), lo que puede tomarse como una indicación de que puede existir una relación entre alguna de las rutas TOR y el exómero.

A continuación, se procedió a estudiar si existe interacción genética entre los mutantes *bch1Δ* y *tor* en cuanto al crecimiento en condiciones de estrés. En

presencia de cloruro de potasio se observa que el mutante *tor1Δ* es más sensible que *bch1Δ*, y que *tor1Δ bch1Δ* es más sensible que los mutantes sencillos (**figura 40**). Este resultado indica que existe interacción entre *tor1+* y el exómero en presencia de cloruro potásico. Por el contrario, el mutante *tor2-51* no es sensible a cloruro de potasio y el mutante doble *tor2-51 bch1Δ* es igual de sensible que *bch1Δ*; por tanto, esa sensibilidad es debida simplemente a la falta del exómero y no por la existencia de interacción entre *tor2+* y *bch1+*.

En presencia de higromicina B, *bch1Δ* es sensible y esta sensibilidad se suprime parcialmente por *tor1Δ*, ya que el mutante doble *tor1Δ bch1Δ* tiene un crecimiento intermedio respecto a los dos parentales. El mutante *tor2-51* tampoco es sensible a higromicina B; sin embargo, el mutante doble *tor2-51 bch1Δ* es más sensible que el mutante del exómero.

En cuanto a estrés térmico, se observó que la mutación *bch1Δ* no altera el patrón de crecimiento de *tor1Δ* a 37°C y mejora ligeramente el crecimiento de *tor2-51* a 32°C (**figura 40**).

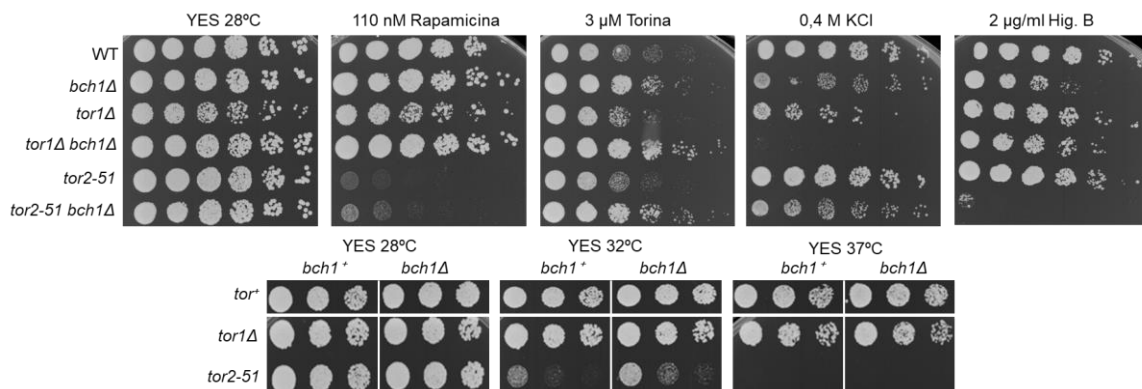


Figura 40. Interacciones génicas entre los complejos TOR y el exómero.

Ensayo de crecimiento en gota, de cada cepa se inocularon seis o tres diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días, las placas con compuestos se incubaron a 28°C.

Se intentó analizar la presencia de septos aberrantes producida por cloruro de potasio en la cepa *tor1Δ bch1Δ*, pero el resultado es difícil de interpretar por presentar dicha cepa varios defectos morfológicos que impiden la visualización de los septos tras teñir con el colorante Hoechst.

La ruta TORC2 responde a cambios en la concentración de glucosa en el medio. Por este motivo se quiso analizar el crecimiento del mutante del exómero en presencia de concentraciones bajas de glucosa. En la **figura 41** se puede

observar que el mutante *cfr1Δ* es capaz de crecer como la cepa silvestre a concentraciones de glucosa mucho más bajas que las utilizadas normalmente para el medio YES. Por lo tanto, no se realizaron más experimentos para analizar una posible relación funcional entre el exómero y la ruta TORC2 respecto a la respuesta a variaciones en la concentración de glucosa.

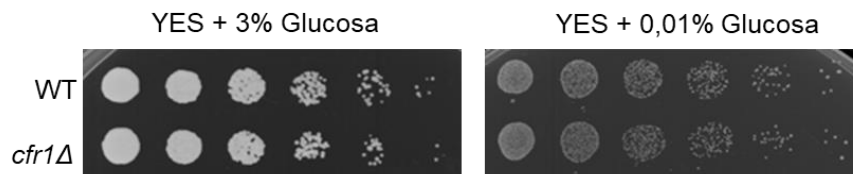


Figura 41. Crecimiento en distintas concentraciones de glucosa.

Se inocularon diluciones seriadas 1:4 de las cepas WT y *cfr1Δ* en medio YES con distintas concentraciones de glucosa.

Para resumir este subapartado, la existencia de interacción entre el exómero y las quinasas TOR, en particular entre la delección del exómero y de *tor1+* en presencia de cloruro de potasio, podría indicar una relación funcional entre ambos.

7.2 Interacción entre el exómero y el complejo SEA

En uno de los rastreos genéticos realizados se encontró interacción génica entre *bch1+* y algunos genes codificadores de proteínas del complejo SEA. Este complejo es un regulador de la actividad TORC1 de *S. cerevisiae*, y por tanto de la quinasa Tor1. Está formado por dos subcomplejos, uno (SEACAT formado por las proteínas Seh1, Sea2, Sec13, Sea3 y Sea4) actúa como activador y otro (SEACIT, formado por Sea1, Npr2 y Npr3) como inhibidor.

Con el fin de obtener más información acerca de una posible relación funcional entre el exómero y las rutas TOR, se analizó el crecimiento a distintas temperaturas de los mutantes de los que disponía el laboratorio con alguna subunidad del complejo SEA delecionada (*sea2Δ*, *sea3Δ*, *sea4Δ* y *npr2Δ*) y los correspondientes mutantes dobles carentes de *cfr1+*. Solamente en el caso del mutante *sea3Δ cfr1Δ* se observó interacción genética, ya que esta cepa crece peor que los mutantes sencillos incluso a 28°C (**figura 42**).

A continuación, se estudió la sensibilidad de las cepas en presencia de distintos compuestos a 28°C. Como se muestra en la **figura 42**, el mutante *sea3Δ* es sensible a cloruro de potasio, acetato de potasio e higromicina B. El mutante doble *sea3Δ cfr1Δ* es incapaz de crecer en cloruro de potasio 0,6 M, en acetato de potasio 25 mM o en higromicina B 2,5 µg/ml. Por tanto, en estos compuestos la función de Sea3 y el exómero están relacionadas, puesto que existe interacción génica.

npr2Δ es ligeramente sensible a higromicina B, siendo *npr2Δ cfr1Δ* más sensible. El resto de las cepas no son sensibles a ninguno de los compuestos.

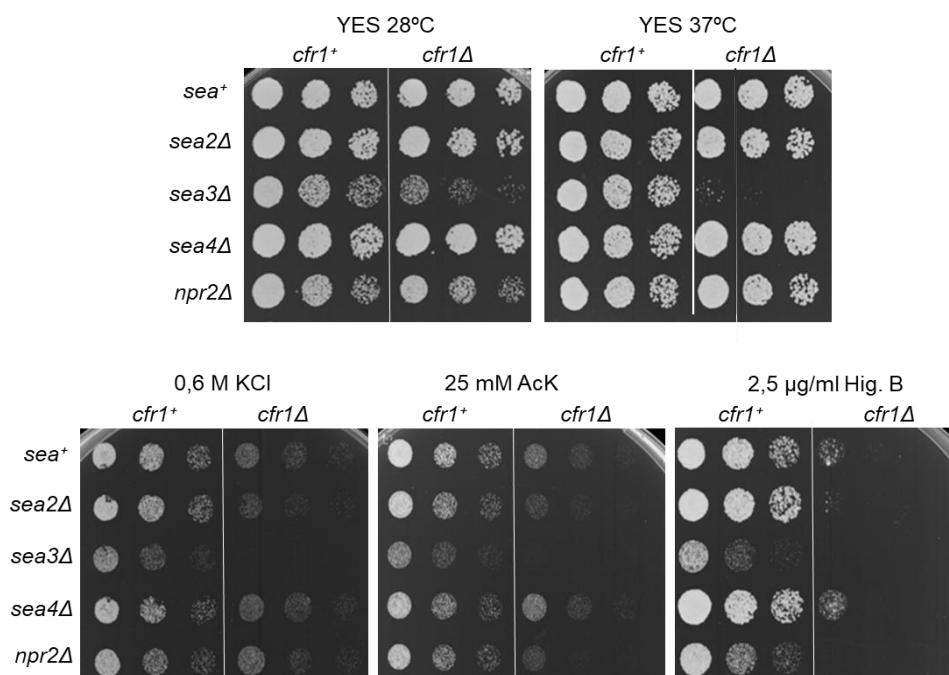


Figura 42. Interacciones genéticas entre el complejo SEA y el exómero.

Ensayo de crecimiento en gota, de cada cepa se inocularon tres diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días a 28°C, salvo la placa de YES 37°C.

Los resultados descritos en este subapartado muestran que la delección de *cfr1+* y de *sea3+* provoca sensibilidad a compuestos de potasio y a higromicina B, y que existe interacción entre estos genes. Dado que los otros mutantes del complejo activador no presentan estos fenotipos, y el mutante del complejo inhibidor *npr2Δ* muestra cierta interacción con *cfr1Δ*, es posible que los resultados observados con *sea3Δ* indiquen que el exómero tiene funciones relacionadas con Sea3 independientes de las que ejerce en el complejo SEACAT. Por lo tanto, estos resultados no aportaron información acerca de la relación entre el exómero y las rutas TOR.

7.3 En la cepa *cfr1Δ* la respuesta de la ruta TORC2 a KCl está alterada

Se ha descrito que en una cepa silvestre la ruta TORC2 se inactiva en ausencia de glucosa y se reactiva al volver a añadir este azúcar. La inactivación de la ruta también ocurre tras cinco minutos en presencia de 1 M KCl y permanece inactiva durante al menos sesenta minutos, lo que parece relacionarse con una adaptación a los cambios en las condiciones ambientales (Cohen et al., 2014).

Dado que se había observado interacción entre *tor1+* (la quinasa de TORC2) y el exómero en presencia de KCl, se quiso analizar la respuesta TORC2 del mutante *cfr1Δ* a esta sal. Con este objetivo se trataron las cepas silvestre y *cfr1Δ* con cloruro de potasio y se recogieron muestras a lo largo del tiempo. En estos ensayos la actividad de la ruta se evalúa observando la fosforilación de Gad8, un sustrato de Tor1, en la serina S546 con un anticuerpo específico (anti-PGad8). Como se ha descrito en Materiales y Métodos, los extractos proteicos se obtuvieron precipitando con TCA, y se cargaron 10 µg en dos geles, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-PGad8 o con anticuerpo anti-Gad8 (para valorar la cantidad total de Gad8 en la muestra).

Se realizaron pruebas para determinar las condiciones idóneas del experimento. Se observó que empleando una concentración de 0,6 M de KCl (la concentración empleada en otros experimentos de activación de rutas en este trabajo) no se producía un descenso reproducible de la cantidad de Gad8 fosforilada en la cepa silvestre. Por ese motivo se decidió utilizar una concentración mayor, la concentración elegida fue 1 M de cloruro de potasio (empleada también en Cohen y colaboradores. Cohen et al., 2014) y a 32°C, salvo algún caso en el que se utilizan mutantes termosensibles que los cultivos se incubaron a 28°C. Respecto al tiempo, se eligió una incubación de 75 minutos para observar una recuperación reproducible de la fosforilación.

En estas condiciones la cepa silvestre presenta Gad8 fosforilada antes de ser tratada con la sal. Esta fosforilación desciende drásticamente tras 15 minutos de tratamiento con 1M KCl, se recupera tras 75 minutos, y permanece alta incluso después de tres horas (**figura 43**). En el mutante *cfr1Δ*, la fosforilación de Gad8 también decae tras quince minutos de tratamiento pero, a diferencia de

lo que ocurre en la cepa silvestre, no se recupera a lo largo del experimento. Se realizó el experimento incubando las células hasta tres horas con la sal, sin que se haya detectado recuperación de fosforilación de Gad8 (**figura 43**). Los cambios observados en ambas cepas son cambios en la actividad de Tor1, ya que la cantidad total de Gad8 no disminuye al exponer las células a KCl.

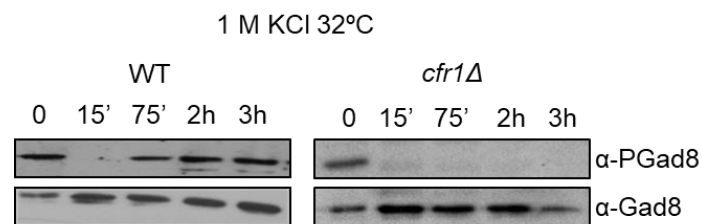


Figura 43. Análisis de la activación de la ruta TORC2.

Western Blot de las cepas silvestre y *cfr1Δ* sin tratamiento o con tratamiento a lo largo del tiempo con cloruro potásico. La banda α -PGad8 muestra la cantidad de Gad8 que se encuentra fosforilada, la banda α -Gad8 la cantidad total de proteína Gad8.

Por tanto, en ausencia del exómero la actividad TORC2 no se recupera tras un tratamiento con cloruro de potasio. En los siguientes apartados se describen una serie de experimentos destinados a estudiar en más detalle la relación del exómero y esta ruta de señalización.

7.4 Interacción entre el exómero y la GTPasa Ryh1

Ryh1 es una GTPasa relacionada con procesos de tráfico intracelular que se localiza en el Golgi, está implicada en la regulación de la actividad TORC2, y su ausencia produce sensibilidad a algunos compuestos a los que son sensibles los mutantes del exómero (Tatebe et al., 2010; Madrid et al., 2016). Por estos motivos se analizó si Ryh1 y el exómero están relacionadas en cuanto a la regulación de la actividad dependiente de Tor1.

7.4.1. Hay interacción génica entre *ryh1⁺* y *bch1⁺*

Como punto de partida, se realizaron ensayos en gota con las cepas silvestre, *bch1Δ*, *ryh1Δ*, *ryh1Δ bch1Δ*, *Ryh1Q70L* (una cepa con la GTPasa constitutivamente activa), y *Ryh1Q70L bch1Δ* (**figura 44**). Cuando se analizó el crecimiento en placas de YES incubadas a distintas temperaturas, se vio que existe interacción génica negativa entre ambos genes, puesto que el mutante

doble *ryh1Δ bch1Δ* solo es capaz de crecer a temperaturas bajas, presentando un crecimiento casi nulo a más de 25°C. Por otro lado, se observó que la cepa *Ryh1Q70L* es termosensible, indicando que la hiperactivación de Ryh1 es perjudicial para el crecimiento en temperaturas elevadas. La cepa *Ryh1Q70L bch1Δ* es aún más termosensible (ver la placa de 34°C en la **figura 44**), lo que sugiere que la hiperactivación de la GTPasa es más dañina si el exómero no es funcional.

Una vez analizada la interacción génica a altas temperaturas, se analizó el crecimiento de los mutantes en presencia de distintos compuestos. Como se observa en la figura, el mutante *ryh1Δ* es más sensible a KCl que el mutante *bch1Δ* (ver la placa de KCl 0,2 M). El mutante doble presenta un crecimiento nulo. La forma hiperactiva (*Ryh1Q70L*) presenta una sensibilidad a KCl distinta de la de *bch1Δ* (placa de 0,6M KCl), ya que crece mejor la primera gota pero peor la tercera, sugiriendo que el daño producido por ambas mutaciones puede ser diferente. *Ryh1Q70L bch1Δ* tiene un crecimiento más parecido al de *bch1Δ*.

En higromicina, que indica daño en el tráfico hacia las vacuolas, *ryh1Δ* es más sensible que *bch1Δ* (placa de 0,5 µg/ml) y el mutante doble no crece nada. Por otro lado, *Ryh1Q70L* presenta una sensibilidad parcial y el mutante doble *Ryh1Q70L bch1Δ* es más sensible que *bch1Δ* (placa de 2,5 µg/ml).

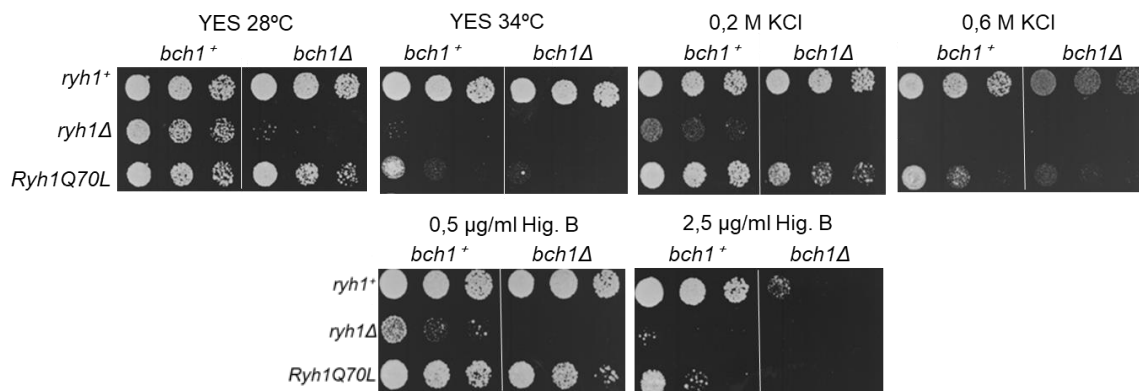


Figura 44. Interacciones génicas entre la delección/ la hiperactivación de *ryh1+* y el exómero.

Ensayo de crecimiento en gota, de cada cepa se inocularon tres diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días a 28°C.

Los resultados de este apartado indican que el exómero y Ryh1 pueden tener relación en sus funciones. El hecho de que haya interacción genética negativa en los mutantes dobles podría explicarse tanto si la GTPasa y el

exómero actúan en paralelo, como si ambos tienen una función común y funciones adicionales diferentes, ya que se ha descrito que tanto Ryh1 como el exómero participan en más de un proceso (He et al., 2006; Hoya et al., 2017).

7.4.2. Ryh1 se localiza correctamente en ausencia del exómero

Ryh1 se localiza en el Golgi, al igual que Cfr1. Por este motivo se quiso conocer si la localización de Ryh1 estaba afectada al faltar el exómero. Se realizaron fotografías de esta proteína marcada con GFP en el extremo aminoterminal, bajo el control de su promotor endógeno, en las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ*. En la **figura 45A** se puede observar que, en células cultivadas en condiciones estándar, esta proteína se localiza en puntos discretos distribuidos por todo el citoplasma, una localización típica de las proteínas de Golgi. Esta distribución permanece inalterada en ausencia del exómero. También se analizó la localización de la GTPasa en presencia de cloruro de potasio. En la figura se puede apreciar que el tratamiento con KCl no altera la localización en la cepa silvestre. Este resultado es similar al observado para Cfr1, cuya localización no se altera en presencia de la sal (resultado no mostrado). La distribución de GFP-Ryh1 tampoco se altera en el mutante *cfr1Δ* tratado con KCl (**figura 45A**).

Por tanto, la localización de Ryh1 no se ve alterada ni en presencia de cloruro de potasio ni en ausencia del exómero. Estos resultados demuestran que, aunque Ryh1 y el exómero tienen funciones en el Golgi relacionadas con la respuesta a cloruro de potasio, los fenotipos observados en *cfr1Δ* no se deben a una deslocalización de la GTPasa.

7.4.3. La eliminación de Ryh1 y del exómero afectan de distinta manera a la activación de TORC2 en respuesta a KCl

Para conocer si la interacción funcional entre Ryh1 y el exómero está relacionada con la actividad TORC2 se analizó la fosforilación de Gad8 en las cepas sin exómero y en mutantes sin *ryh1*⁺.

El experimento se realizó con una concentración de 1 M de cloruro de potasio pero a 28°C, puesto que es una temperatura en la que el mutante *ryh1Δ* sí puede crecer durante un tiempo en presencia de KCl. Al observar la cantidad de Gad8 fosforilada en el mutante *ryh1Δ* se aprecia que en el tiempo cero, es decir antes del tratamiento con KCl, apenas existe actividad y esta falta de activación permanece a lo largo del tratamiento con cloruro de potasio. En el mutante doble *ryh1Δ bch1Δ* ocurre como en el mutante *ryh1Δ*, es decir, no se detecta apenas actividad de la ruta ni antes ni tras 75 minutos. (Figura 45B)

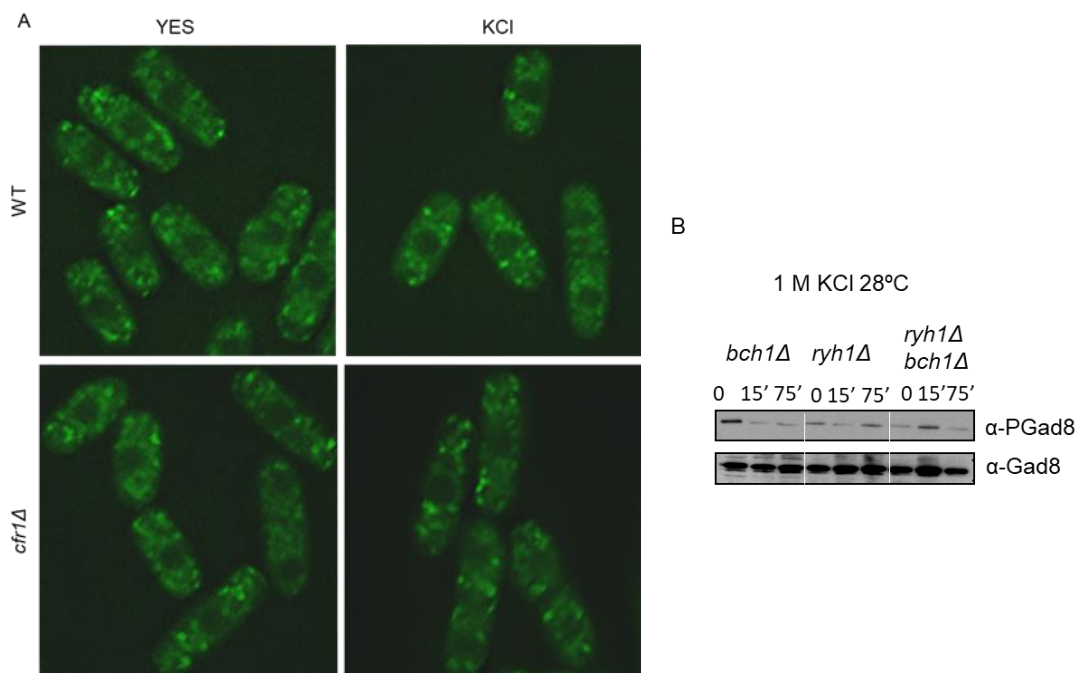


Figura 45. Localización de Ryh1 y análisis de la activación de la ruta TORC2 en ausencia de Ryh1.

A. Localización de Ryh1 en las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* con y sin cloruro de potasio.

B. Activación de la ruta TORC2 en las cepas *bch1Δ*, *ryh1Δ* y *ryh1Δ bch1Δ* sin y con tratamiento con cloruro de potasio. La banda α-PGad8 muestra la cantidad de Gad8 que se encuentra fosforilada, la banda α-Gad8 la cantidad total de proteína Gad8.

Con estos datos, se puede decir que tanto el exómero como una activación correcta de Ryh1 son necesarios para la recuperación de la actividad TORC2 tras el tratamiento con cloruro potásico, y que ambos mecanismos de regulación son diferentes. El exómero tendría un papel destacado en la regulación de la actividad tras el tratamiento con cloruro de potasio mientras que la GTPasa Ryh1 tiene un papel en la actividad TORC2 tanto en condiciones basales como en presencia de estrés. La conclusión de que ambos mecanismos son diferentes también se basa en la presencia de interacción génica entre ambos genes, indicativo de que pueden funcionar en vías paralelas.

7.5 Un sistema endosomal dañado presenta defectos en la respuesta a cloruro de potasio

Los resultados descritos en el apartado anterior demuestran que los defectos en la actividad TORC2 de los mutantes carentes del exómero en presencia de KCl no se deben ni a una alteración de los complejos SEA ni a una desregulación de Ryh1. Por otro lado, se sabe que los complejos TOR se localizan en el entorno de los endosomas tardíos-vacuola/lisosoma, al menos en parte, y que el exómero colabora con los adaptadores de clatrina para mantener la integridad del sistema endosomal (Hoya et al., 2017). Además, la supervivencia en presencia de brefeldina A, un compuesto que desorganiza el Golgi y los endosomas tempranos, depende de la inhibición temporal de la actividad TOR (Kowalczyk and Petersen, 2016) y en *S. cerevisiae* mutantes una interfaz Golgi-endosomas tempranos intacta es necesaria para la localización y actividad correctas del complejo TORC1 (asociado la quinasa Tor1) (Ejzykowicz et al., 2016). Por lo tanto, es posible que la desregulación de TORC2 en el mutante *cfr1Δ* se deba a los defectos en el sistema endosomal asociados a la ausencia exómero. En los apartados siguientes se describen una serie de experimentos destinados a investigar la relación entre el sistema endosomal y la respuesta a KCl mediada por TORC2.

7.5.1. El KCl daña el sistema endosomal tardío

Para conocer qué efectos está provocando el cloruro de potasio en las células se procedió a realizar fotografías en el microscopio electrónico de transmisión. Las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* sin tratar o tratadas con 0,4 M de cloruro potásico durante una hora se prepararon para su visualización mediante microscopía electrónica tal y como se describe en Materiales y Métodos. El motivo de que fueran tratadas con una concentración de KCl más baja de la empleada habitualmente se debe al hecho de que concentraciones más altas de la sal interfieren con el procesamiento de las muestras (resultados anteriores del laboratorio).

En la **figura 46** se puede observar cómo es el sistema endosomal en una cepa silvestre sin tratar. En presencia de KCl se puede observar que dicho sistema aparece dañado, con la aparición de estructuras membranosas diferentes (señaladas por triángulos) y una acumulación de estructuras membranosas en el citoplasma (señaladas por flechas). El mutante *cfr1Δ* sin tratar presenta estructuras con diferentes morfologías, que solo se observan en la cepa silvestre si se trata con KCl (triángulos). En esta cepa tratada con KCl, además de cúmulos de material membranoso (flechas), aparecen unos cuerpos multivesiculares (MVB) hipertrofiados. En levaduras, los cuerpos multivesiculares, que también se denominan compartimento prevacuolar, corresponden a los endosomas tardíos que se fusionan con las vacuolas. La alteración en la morfología de los endosomas tardíos en *cfr1Δ* tratado con KCl se ha confirmado en el laboratorio utilizando un marcador fluorescente de este compartimento (Cherry-FYVE, no mostrado).

Estas fotografías indican que el sistema endosomal está dañado en presencia de cloruro de potasio y que si, además, está delecionado *cfr1+*, los problemas causados por la sal son más graves, afectando incluso al compartimento prevacuolar. Estos resultados concuerdan con el hecho de que el mutante del exómero sea sensible a higromicina B, compuesto que indica un daño en la interfaz TGN-endosomas, y con la interacción entre el exómero y el sistema endosomal (temprano y tardío) descrita por el laboratorio (Hoya *et al.*, 2017).

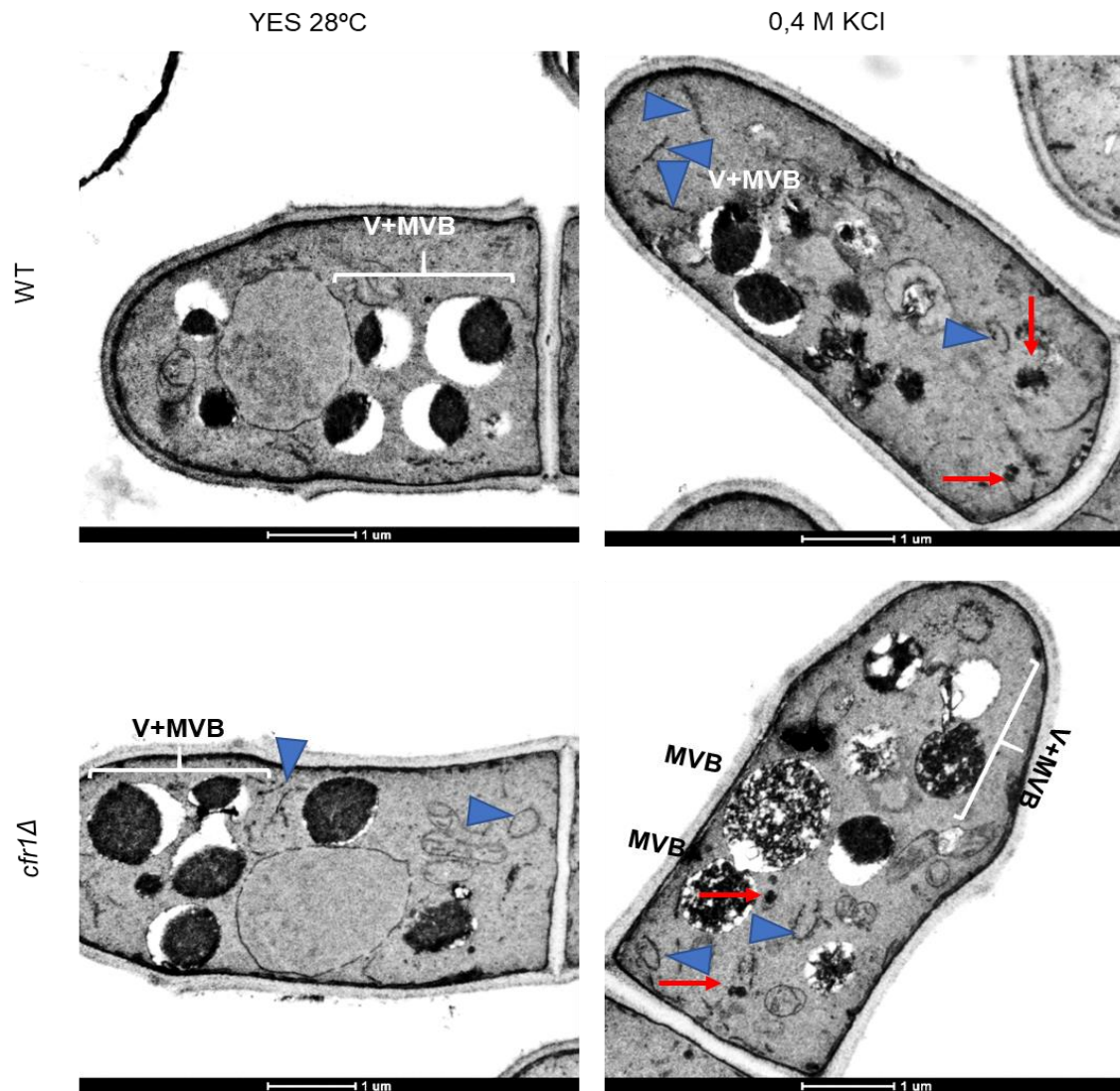


Figura 46. Micrografías.

Fotografías de las cepas WT y *cfr1Δ*, incubadas durante 1 hora a 28° sin/con 0,4 M de KCl, realizadas con un microscopio electrónico de transmisión. Las flechas indican los cúmulos de estructuras membranosas.

V+MVB es vacuola + *MultiVesicular Body*

MVB es *MultiVesicular Body*

Las flechas rojas señalan cúmulos de estructuras membranosas y los triángulos azules estructuras membranosas anómalas.

7.5.2. Existe interacción entre GGAs y el exómero en presencia de estrés

Dado que el KCl afecta al sistema endosomal, que los adaptadores monoméricos de clatrina conocidos como GGAs actúan en el tráfico entre el Golgi y el sistema endosomal tardío (Boehm and Bonifacino, 2001) y que estos

adaptadores presentan cierta relación funcional con el exómero (Hoya et al., 2017), se analizó si dicha interacción también se daba en presencia de la sal.

En la **figura 47** se puede observar que la delección de *gga21*⁺ no es sensible a concentraciones de cloruro de potasio a las que sí lo es el mutante del exómero y que el mutante doble *gga21Δ cfr1Δ* es igual de sensible que la cepa *cfr1Δ*. El mutante *gga22Δ* tampoco es sensible a concentraciones a las que la falta del exómero sí provoca sensibilidad, mientras que el mutante doble es algo más sensible a 0,6 M de cloruro de potasio. La delección de ambos GGAs provoca cierta sensibilidad a cloruro de potasio y el mutante triple es muy sensible. Estos resultados indican que la falta de ambos GGAs presenta sensibilidad a cloruro de potasio y que en esta sal existe interacción en las funciones del exómero y de estos adaptadores en concordancia con lo publicado (Hoya et al., 2017).

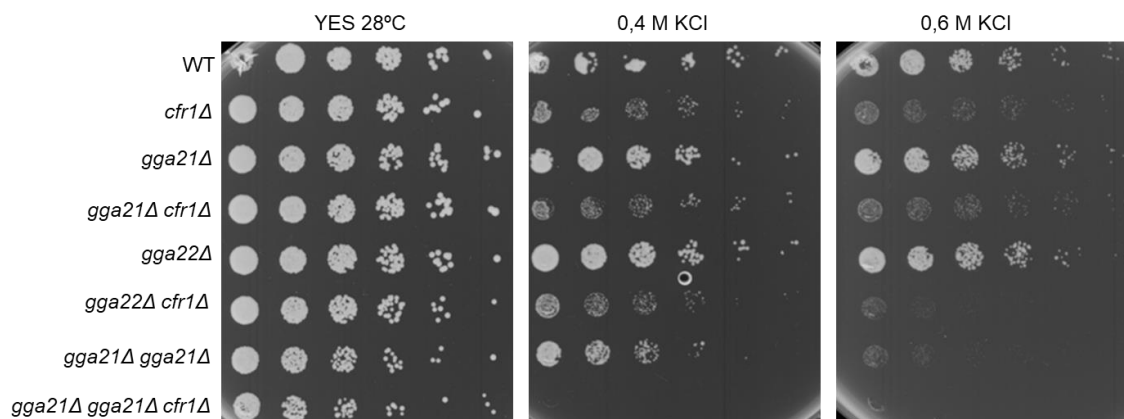


Figura 47. Interacciones genéticas entre los GGAs y el exómero.

Ensayo de crecimiento en gota, de cada cepa se inocularon seis diluciones seriadas 1:4. Las placas se incubaron durante dos días a 28°C.

7.5.3. Mutantes de los adaptadores AP-1 y GGA no muestran el mismo defecto en la actividad TORC2 que los mutantes del exómero

Los mutantes de delección del exómero no son capaces de recuperar la actividad TORC2 tras un tratamiento con KCl. Por otro lado, hay interacción funcional entre el exómero y los adaptadores de clatrina (resultados anteriores del laboratorio Hoya et al., 2017 y subapartado anterior). Por lo tanto, se quiso averiguar si la falta de recuperación de la señalización de TORC2 es una

característica de todos los mutantes defectivos en el tráfico por el sistema endosomal o es exclusiva de los mutantes del exómero. Para contestar a esta pregunta se analizó si en ausencia de los adaptadores AP-1 y GGA la actividad TORC2 se recupera tras el tratamiento con cloruro potásico.

Se visualizó la cantidad de Gad8 fosforilada a lo largo del tiempo en los mutantes *apm1Δ* y *gga21Δ gga22Δ* tratados con 1 M a 28°C (*apm1Δ*) o a 32°C. En ambas cepas se observa la bajada de la fosforilación de Gad8 a los quince minutos de tratamiento con la sal (**figura 48**), de modo similar a lo que ocurre en *cfr1Δ*; sin embargo, tras 75 minutos de tratamiento con la sal se produce la recuperación de la fosforilación de Gad8, a diferencia de lo que ocurre en ausencia del exómero. Este resultado indica que la falta de los adaptadores de clatrina no provoca un defecto irreversible y las cepas mutantes son capaces de recuperar la actividad TORC2, mientras que la falta del exómero debe tener un defecto más agravado y no es capaz de recuperar dicha actividad.

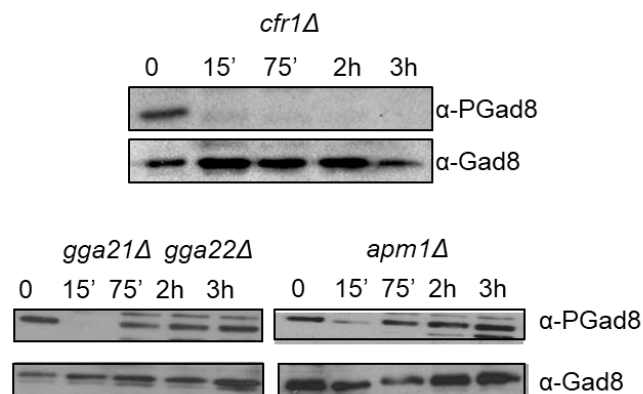


Figura 48. Análisis de la activación de la ruta TORC2.

Western Blot de las cepas *cfr1Δ*, *apm1Δ* y *gga21Δ gga22Δ* sin tratamiento o con tratamiento a lo largo del tiempo con cloruro potásico. La banda α-PGad8 muestra la cantidad de Gad8 que se encuentra fosforilada, la banda α-Gad8 la cantidad total de proteína Gad8.

7.5.4. Ppk32 no actúa en la respuesta a KCl mediada por TORC2

Ppk32 es un regulador negativo de TORC1 necesario para sobrevivir al estrés causado en el transporte de proteínas (Kowalczyk and Petersen, 2016). Es necesario para sobrevivir a la inhibición de Arf1 causada por la brefeldina A, algo que afecta a la integridad del Golgi y de los endosomas tempranos, y a la localización del exómero de *S. pombe* (Hoya et al., 2017). Se analizó si esta quinasa participa en la respuesta al daño producido por KCl y si está relacionada funcionalmente con el exómero.

En primer lugar, se analizó la interacción génica entre *cfr1*⁺ y *ppk32*⁺ a distintas temperaturas sin encontrar que exista. En segundo lugar, se analizó el crecimiento de *ppk32Δ* en presencia de KCl, y se encontró que ni este mutante es sensible a esta sal ni el mutante doble *ppk32Δ cfr1Δ* es más sensible que *cfr1Δ* (**figura 49A**).

A continuación se analizó la actividad TORC2 en los mutantes *ppk32Δ* y *ppk32Δ cfr1Δ*. Tras el tratamiento con KCl en la primera cepa la actividad TORC2 tiene la misma dinámica que en la cepa silvestre. En el mutante doble la actividad decae a los quince minutos de tratamiento para ya no recuperarse a la hora de tratamiento, al igual que ocurre en *cfr1Δ* (**figura 49B**). De estos resultados se concluye que Ppk32 no es necesaria para la activación de TORC2 en respuesta a KCl.

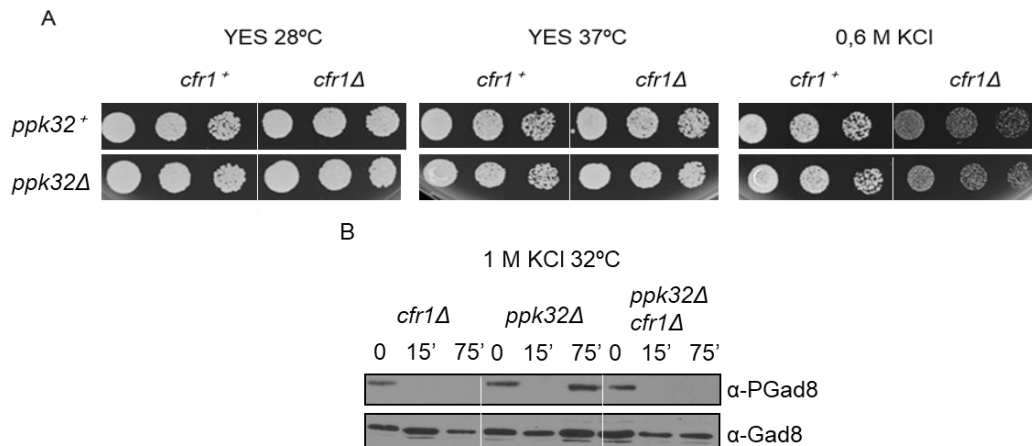


Figura 49. Efecto de la delección de *ppk32⁺* en la respuesta a cloruro de potasio.

A. Ensayo de crecimiento en gota, de cada cepa se inocularon tres concentraciones. Las placas se incubaron durante dos días, las placas con compuestos se incubaron a 28°C.

B. *Western-Blot* en el que se observa la cantidad de Gad8 fosforilada respecto a la cantidad total de las cepas *cfr1Δ*, *ppk32Δ* y *ppk32Δ cfr1Δ* tras tratar las células con cloruro de potasio a lo largo del tiempo.

7.6 Análisis de la relación entre el cloruro de potasio, el exómero y la autofagia

Otra función conocida de la ruta TOR es inhibir la autofagia (Otsubo et al., 2017). La proteína Atg8 fusionada a una proteína fluorescente (XFP) es un marcador de autofagia ampliamente utilizado en la literatura, ya que al inducirse el proceso autofágico por una bajada en los niveles de nutrientes la proteína XFP-Atg8 forma un foco de fluorescencia observable por microscopía. Este foco marca un compartimento relacionado con la autofagia. Además, en estas condiciones XFP-Atg8 se procesa proteolíticamente y la proteína fluorescente se libera, lo que es fácilmente detectable por *Western blot*. En este trabajo se ha utilizado una proteína CFP-Atg8, que se detecta con anticuerpos anti-GFP. Como una aproximación adicional para estudiar la relación entre el exómero y la ruta TOR nos preguntamos si la autofagia ocurría correctamente en ausencia del exómero, y si el KCl induce autofagia en el silvestre y/o en el mutante *cfr1Δ*.

Células de la cepa silvestre cultivadas en MM sin nitrógeno durante cinco horas presentan un foco de Atg8 (figura 50). En las mismas condiciones, en el

mutante del exómero también aparece el foco de Atg8, es decir que la autofagia está ocurriendo.

Con el fin de conocer si el KCl provoca autofagia se realizó un experimento de *Western Blot* para analizar la liberación de la CFP en las cepas silvestre y *cfr1Δ* cultivadas en presencia de KCl. Se tomaron muestras antes de añadir la sal (tiempo 0 h en la figura) y después de varias horas de incubación, hasta 6 horas. Como control se analizaron en paralelo muestras de las mismas estirpes incubadas en MM sin nitrógeno durante 6 horas. La banda que indica el procesamiento de CFP-Atg8 se detecta en ambas cepas cultivadas en ausencia de nitrógeno (**figura 50**). Este resultado demuestra que en células sin exómero también tiene lugar la autofagia en ausencia de nitrógeno, al inhibirse TORC1. Por otro lado, esta banda no se detecta en ninguna de las dos cepas cultivadas en YES o en YES con KCl, lo que demuestra que esta sal no induce la autofagia, o al menos no a los niveles que la induce la falta de nitrógeno.

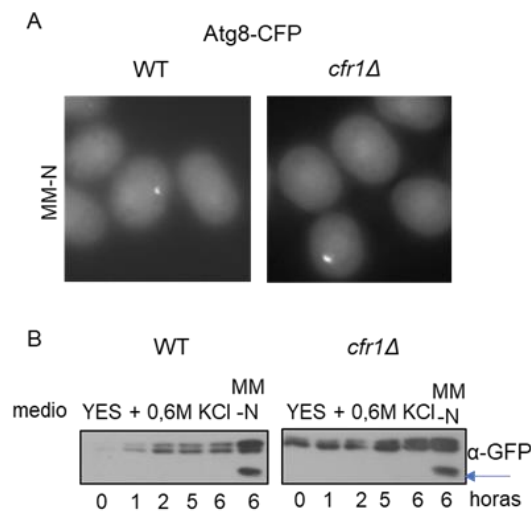


Figura 50. Autofagia.

A. Observación del foco de CFP-Atg8 en las cepas WT y *cfr1Δ* crecidas en MM-N durante 6 horas.

B. *Western Blot* de las cepas WT y *cfr1Δ* incubadas en YES+KCl o en MM-N a los tiempos indicados. La flecha indica la banda que aparece al ocurrir la autofagia.

8. Relación entre la ruta de TORC2 y la ruta de estrés en ausencia del exómero

Se sabe que existe interacción entre las rutas TORC2 y de estrés en cuanto a la regulación del ciclo celular y la entrada en mitosis (Petersen and Nurse, 2007). Para analizar si la ruta de respuesta a estrés está implicada de algún modo en los fallos en la recuperación de la actividad TORC2 de los mutantes sin exómero en presencia de KCl, se analizó la actividad de Tor1 en la cepa control o en el mutante *cfr1Δ* que portan, además, mutaciones en componentes de la ruta de respuesta a estrés.

En primer lugar, se comparó el nivel de fosforilación de Gad8 en la serina 546 en las estirpes control, *cfr1Δ* y *sty1Δ*. Como se observa en la **figura 51**, el comportamiento de los dos mutantes es ligeramente diferente, ya que mientras que en *cfr1Δ* la actividad no se recupera al cabo de 75 minutos, en *sty1Δ* hay una recuperación parcial. Una incubación de este mutante a tiempos más largos (hasta 3 horas) confirmó una recuperación parcial de la actividad de TORC2 (**figura 51**). Este resultado demuestra que la falta de reactivación de TORC2 en respuesta a KCl no es una consecuencia de la falta de crecimiento en presencia de la sal, ya que el mutante *sty1Δ* es más sensible a KCl que *cfr1Δ* (**figura 29A**). Una recuperación parcial de la fosforilación de Gad8 en el mutante *sty1Δ* en presencia de KCl se ha observado de manera independiente en el laboratorio de K. Shiozaki (comunicación personal). Por otro lado, el mutante *wis1DD*, en el cual está constitutivamente activa la ruta de Sty1, responde de manera similar al silvestre, lo que demuestra que la posible hiperactivación de la ruta de estrés no evita la inactivación de TORC2 a los 15 minutos de tratamiento.

El mutante *sty1Δ cfr1Δ* no es capaz de recuperar la fosforilación de Gad8 a lo largo del experimento (3 horas con KCl), lo que demuestra que la recuperación parcial de la actividad TORC2 que ocurre en ausencia de la ruta de estrés necesita que el exómero esté presente en las células. En el mutante *wis1DD bch1Δ* no llega a recuperarse la actividad TORC2 al cabo de tres horas, luego la forma fosfomimética de Wis1 no favorece dicha recuperación.

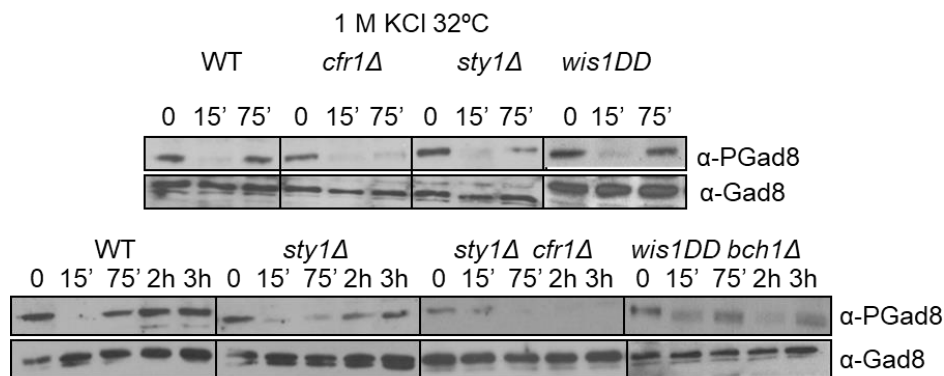


Figura 51. Análisis de la activación de la ruta TORC2 en relación con la ruta de estrés.

Western Blot de las cepas silvestre, *cfr1Δ*, *sty1Δ*, *wis1DD*, *sty1Δ cfr1Δ* y *wis1DD bch1Δ* sin tratamiento o con tratamiento a lo largo del tiempo con cloruro potásico. La banda α-PGad8 muestra la cantidad de Gad8 que se encuentra fosforilada, la banda α-Gad8 la cantidad total de proteína Gad8.

Este conjunto de resultados indica que la falta de recuperación en ausencia del exómero no está relacionada con la actividad de la ruta de estrés. La ruta de estrés y el exómero son mecanismos que afectan a la activación de la ruta TORC2 en respuesta a KCl de manera independiente.

9. Relación entre la ruta TORC2 y la ruta de integridad en ausencia del exómero

En *S. pombe* hay una relación compleja de inter-regulación entre las rutas de integridad celular y TORC2 (Madrid et al., 2016). Como se ha descrito en apartados anteriores, los mutantes del exómero tratados con KCl tienen defectos tanto en la activación de la ruta de integridad como en la recuperación de la ruta TORC2. Para obtener información que ayudara a relacionar estos defectos se analizó la fosforilación de Gad8 en células con o sin exómero que tuvieran, además, mutaciones en componentes de la ruta de integridad celular. Con este objetivo se observó la fosforilación de Gad8 en las cepas *pmk1Δ*, *pmk1Δ cfr1Δ*, *pmp1Δ*, y *pmp1Δ cfr1Δ*.

En el mutante *pmk1Δ* la dinámica de fosforilación de Gad8 en respuesta a KCl es similar a la del control. En el mutante *pmk1Δ cfr1Δ* la fosforilación de Gad8 desciende a los 15 minutos, y, aunque no se llegan a recuperar los niveles iniciales de fosforilación ni tan siquiera tras tres horas de tratamiento, sí se recupera parcialmente a partir de una hora con KCl (**figura 52A**), lo que sugeriría que la activación de la ruta de integridad podría impedir la recuperación de TORC2 en *cfr1Δ*.

Por otro lado, una hiperactivación de la ruta de integridad por eliminación de la fosfatasa Pmp1 no parece afectar a la actividad TORC2, ya que el mutante *pmp1Δ* tiene una dinámica similar a la de la cepa silvestre en cuanto a la fosforilación de Gad8 en presencia de cloruro de potasio. Finalmente, se quiso averiguar si esta hiperactivación sería capaz de suprimir el defecto en la recuperación de la actividad TORC2 en *cfr1Δ* por lo que se determinó el nivel de fosforilación de Gad8 en la cepa *pmp1Δ cfr1Δ*, que resultó comportarse como una cepa *cfr1Δ*. Es posible que al delecionar únicamente a *pmp1+* el nivel de actividad de la ruta no aumente lo necesario como para suprimir el efecto de la mutación *cfr1Δ* y que sea necesario delecionar alguna fosfatasa más para ver un efecto.

Anteriormente se vio que el mutante *cfr1Δ* muestra menos activación de la ruta de integridad tras treinta minutos de tratamiento con cloruro de potasio. Ese experimento se realizó con 0,6 M de cloruro de potasio tanto a 32°C como a 28°C. Para poder comparar la activación de la ruta de integridad con los experimentos de recuperación de la actividad TORC2 era necesario utilizar las mismas condiciones. Por ese motivo se analizó la cantidad de Pmk1 fosforilada a lo largo del tiempo en las cepas silvestre y mutante del exómero tratadas con 1 M de cloruro de potasio y a 32°C. En la **figura 52B** se observa que en el mutante la activación es menor tras quince minutos de tratamiento e indetectable tras treinta minutos. A esos tiempos se produce la inhibición de la fosforilación de Gad8. Por tanto, es posible que la respuesta reducida de la ruta de integridad en ausencia del exómero esté afectando a la recuperación de la actividad TORC2.

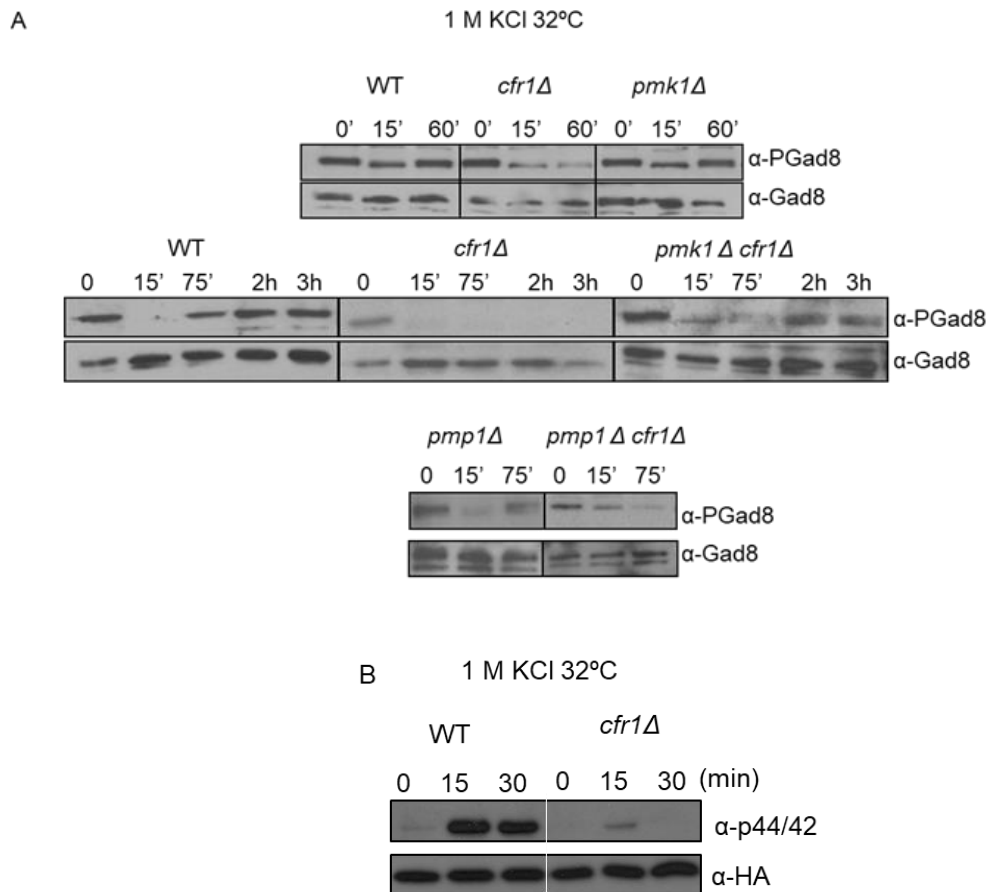


Figura 52. Relación entre la actividad TORC2, la ruta de integridad y el exómero.

A. *Western Blot* de las cepas *cfr1Δ*, *pmk1Δ*, *pmk1Δ cfr1Δ*, *pmp1Δ* y *pmp1Δ cfr1Δ* sin tratamiento o con tratamiento a lo largo del tiempo con cloruro potásico. La banda α-PGad8 muestra la cantidad de Gad8 que se encuentra fosforilada, la banda α-Gad8 la cantidad total de proteína Gad8.

B. Activación de la ruta de integridad en las cepas silvestre y mutante *cfr1Δ* con 1 M de cloruro de potasio. La cantidad de Pmk1/Spm1 que se encuentra fosforilada es la banda α-p44/42. La cantidad total de Pmk1/Spm1 es la banda denominada α-HA.

Introducción Antecedentes y objetivo Resultados Discusión

El exómero

El exómero es un complejo heterotetrámero descrito en la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* formado por Chs5 y las proteínas que componen la familia ChAPs. Su naturaleza aún es motivo de controversia, ya que en determinados estudios se considera un adaptador mientras que en otros se considera una cubierta (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006; Paczkowski and Fromme, 2014); posiblemente tenga ambas funciones, puesto que el tráfico dependiente del exómero es independiente de la cubierta de clatrina. El exómero en *S. cerevisiae* permite el transporte de proteínas transmembrana desde el TGN hasta la membrana plasmática, entre sus cargos conocidos se encuentran Chs3, Fus1, Pin2 y el exómero también participa en la polarización de Ena1 (Santos et al., 1997; Santos and Snyder, 1997; Valdivia and Schekman, 2003; Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Anton et al., 2017). La falta del exómero produce sensibilidad a determinados compuestos iónicos, aunque existen diferencias en los fenotipos según las ChAPs que se encuentren delecionadas (Anton et al., 2017; Anton et al., 2018).

En *Schizosaccharomyces pombe* existe una forma mucho más sencilla de exómero, formada simplemente por Cfr1 y la ChAP Bch1 (Hoya et al., 2017). La deleción del exómero de *S. pombe* provoca sensibilidad a determinados compuestos iónicos como se demuestra en anteriores trabajos del laboratorio (Hoya et al., 2017) y en este trabajo. Algunas de las sensibilidades son compartidas con la falta de exómero de la levadura de gemación, como por ejemplo la sensibilidad a cloruro de sodio. Sin embargo, la falta de exómero en la levadura de fisión provoca resistencia a cloruro de litio, un resultado más similar a la ausencia de Bch1 y Bud7 de *S. cerevisiae* que a la ausencia de Chs6 y Bch2, que produce sensibilidad. Por tanto, la ChAP de *S. pombe* está más relacionada funcionalmente con su homónima de *S. cerevisiae*; esto estaría en consonancia con el hecho de que Bch1 media la unión con Arf1, necesaria para las funciones del exómero (Paczkowski and Fromme, 2014; Anton et al., 2017; Hoya et al., 2017; Anton et al., 2018).

En la levadura de fisión aún no se han encontrado cargos específicos del exómero, posiblemente porque al ser más simplificado tiene funciones más generales que el de *S. cerevisiae*, que a lo largo de su evolución habría adquirido ciertas especializaciones al contar con más ChAPs. Otras levaduras también tienen una única proteína Chs5, mientras que el número de ChAPs es variable, de modo que distintos organismos pueden tener exómeros con distintos grados de complejidad (Anton et al., 2018). Los fenotipos asociados a la delección de estas proteínas son distintos, seguramente porque la especialización de estos exómeros depende del número de ChAPs.

El exómero y los canales/bombas iónicas

En la levadura de gemación la sensibilidad a compuestos iónicos está relacionada con la falta de polarización de Ena1 (Anton et al., 2017). En este trabajo se ha analizado la localización de su parálogo en la levadura de fisión, Cta3, que es la bomba que permite la salida de potasio de las células (Calero and Ramos, 2003), sin que en ausencia del exómero se haya encontrado diferencias en su localización con respecto a la del control. Este resultado, junto con el hecho de que existe interacción génica negativa entre el exómero y *cta3⁺*, puede estar indicando que Cta3 no es un cargo del exómero de *S. pombe*. En este trabajo también se han analizado otros canales iónicos descritos en *S. pombe*. Trk2, un canal de entrada de potasio (Calero et al., 2000; Calero and Ramos, 2003), también muestra interacción con el exómero, por tanto tampoco sería un cargo exclusivo y específico del exómero. En este trabajo se ha visto que la sensibilidad a acetato de potasio se ve parcialmente reducida si no entra el potasio a través de Trk2, algo que no se ha observado en el caso del cloruro de potasio; por tanto, el efecto que tienen ambos compuestos en la célula, así como su mecanismo de entrada no parece ser idéntico.

Cuando se analizó el crecimiento de otros mutantes nulos carentes de canales y bombas anotadas en la levadura de fisión, se observó que solo la eliminación de una proteína mitocondrial presentaba sensibilidades similares a las de la delección del exómero. El resto no serían tampoco cargos del exómero,

ya que si lo fueran su ausencia tendría que provocar fenotipos similares a los de la delección del exómero.

Cabe la posibilidad de que otros canales no anotados, o que no están en la colección de deletantes, sí sean cargos del exómero y que su ausencia explique la sensibilidad del mutante *cfr1Δ*. Otra opción es que, al ser el exómero un complejo implicado en el tráfico intracelular y en la vesiculación (Paczkowski and Fromme, 2014) su ausencia pueda estar provocando ciertas alteraciones en las membranas intracelulares de modo que, aunque los canales estén bien localizados no se encuentren en un ambiente propicio para llevar a cabo sus funciones (Dong et al., 2010; Scott and Gruenberg, 2010). Está descrito que un facilitador del transporte de cationes está implicado en el tráfico en membranas del Golgi (Fang et al., 2008). El exómero se localiza en el Golgi (Martin-Garcia et al., 2011; Hoya et al., 2017), por lo que puede haber cierta relación entre las funciones en tráfico del exómero y el papel de proteínas implicadas en el transporte de iones.

En este trabajo no se ha encontrado que la falta del exómero y su sensibilidad a compuestos iónicos se deba al papel de un determinado canal iónico, por ese motivo se decidió estudiar otros mecanismos relacionados con estrés celular, las rutas de respuesta a estrés.

El exómero y la ruta de la calcineurina

La ruta de la calcineurina tiene funciones importantes tanto en exocitosis como en la citocinesis (Zhang et al., 2000; Cheng et al., 2002), procesos en los que aparentemente está implicado el exómero. La calcineurina es una fosfatasa activada por calcio/ calmodulina que muestra interacción funcional con AP-1 (Kita et al., 2004), un complejo adaptador con el que el exómero comparte funciones en el sistema endosomal temprano (Hoya et al., 2017). En este trabajo se ha analizado si la activación de la calcineurina es correcta en ausencia del exómero. El método empleado para observar dicha activación quizá no sea el más adecuado en presencia de cloruro de potasio, puesto que se ha empleado el CDRE, un elemento de respuesta a calcineurina presente en *Prz1*, que parece responder a calcio pero no a cloruro (Hirayama et al., 2003);

además posiblemente los ensayos de tipo *Western Blot* no permiten ver de manera precisa si en presencia de cloruro de potasio se están produciendo pequeñas diferencias en la activación. Quizás se pudieran emplear otros métodos, como por ejemplo análisis de transcripción mediante PCR, para tener resultados más precisos. Por otro lado, también es posible que el exómero pudiera regular otros aspectos de la funcionalidad de la calcineurina, ya que en *S. cerevisiae* esta fosfatasa modula la endocitosis de la ATPasa de membrana Pma1 en mutantes sin la ATPasa vacuolar para mantener el pH intracelular (Velivela and Kane, 2018). Sin embargo, aunque los experimentos realizados en este trabajo sugieren que tanto los canales de entrada de calcio a la célula como la calcineurina comparten funciones con el exómero en presencia de cloruro de potasio, son una indicación fuerte de que actúan en vías paralelas.

El exómero y la UPR

La siguiente ruta que se analizó en el presente trabajo es la UPR (Wu et al., 2014). La respuesta a proteínas mal plegadas es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis basal, sin estrés, así como para un correcto proceso de citocinesis (Bicknell et al., 2007). En este trabajo se ha observado que el cloruro de potasio provoca daños en el retículo endoplasmático a largo plazo a las células sin exómero. Uno de los marcadores que ha permitido observar esto es Bip1, una chaperona soluble residente en el retículo endoplasmático. La localización de Bip1 con cloruro de potasio si falta el exómero es más próxima a la membrana plasmática que en el resto de condiciones probadas. Esta localización de Bip1 en una zona más cortical de la célula se asemeja a lo que ocurre en células tumorales (Zhang et al., 2010a), en relación con la producción de fosfolípidos en la membrana (Zhang et al., 2013). Bip1 se secreta más con cloruro de potasio, pero menos en ausencia del exómero que en la cepa silvestre. Bip1 podría estar dañada en presencia de cloruro de potasio y esto puede estar haciendo que se secrete más al medio extracelular para evitar problemas mayores, en ausencia del exómero quizá esté fallando su secreción al medio extracelular y al estar dañada provoque problemas en la célula.

Bip1, además, participa en la UPR, uniéndose a Ire1. Cuando existen proteínas mal plegadas en exceso, Bip1 se separa de Ire1 para que este sensor lleve a cabo sus funciones de quinasa y de ribonucleasa. La activación de la UPR también se ha analizado en este trabajo por un método indirecto, que ha permitido detectar la activación de la UPR cuando se tratan las células con tunicamicina, y que parece indicar que la ruta está más activa en la cepa *CFR1Δ* que en la cepa silvestre en condiciones basales. La UPR podría estar más activa en ausencia del exómero debido a los daños que existen en pared celular, a que la distribución de lípidos no sea la correcta en las membranas, o a que exista un defecto en el metabolismo lipídico (RIDD está relacionada con el metabolismo lipídico) (Kimmig et al., 2012). Además, en presencia de cloruro de potasio podría estar más activa la UPR en el mutante por los daños que esta sal provoca en el retículo y quizás en Bip1. La posible mayor activación de la respuesta a proteínas mal plegadas tendría que ser analizada de otro modo distinto al empleado en el presente trabajo, por ejemplo, mediante la visualización del corte producido en mensajeros por Ire1 en el mecanismo conocido como RIDD (Kimmig et al., 2012), mediante *Northern blot*, en vez de utilizando como marcador la cantidad de proteína que puede depender de efectos traduccionales y postraduccionales.

Los resultados presentados en este trabajo respecto a la relación entre el exómero y el retículo indican que se podría profundizar más en este tema para conocer cómo la falta de un complejo del Golgi (exómero) está provocando efectos en un paso anterior del sistema de endomembranas. Además, el exómero y la quinasa Ire1 presentan relación en sus funciones en presencia de cloruro de potasio, como que por ejemplo Ire1 sea necesaria para que se produzca el defecto en septación característico de la falta del exómero.

El exómero y la ruta SAPK

La ruta de respuesta a estrés también se ha analizado en el presente trabajo. Esta ruta responde a numerosos tipos de estrés (Ogden and Fantes, 1986; Shiozaki and Russell, 1995; Wilkinson et al., 1996; Shiozaki et al., 1997; Shieh et al., 1998a; Shieh et al., 1998b; Shiozaki et al., 1998). Los resultados obtenidos indican que existe relación funcional entre el exómero y las funciones

de la quinasa Sty1, pero que actuarían por vías paralelas. Por un lado, existe interacción génica entre *sty1⁺* y *cfr1⁺*, y además la ruta se activa perfectamente en ausencia del exómero. Por otro lado, la falta de exómero no provoca sensibilidad a agua oxigenada. Además, el canal Cta3, cuya transcripción está regulada por la cascada de MAPK de la ruta de estrés (Nishikawa et al., 1999), también muestra interacción con el exómero en sus funciones. Los resultados descartan que sea la falta de esta ruta la causa de la sensibilidad del mutante del exómero a cloruro de potasio. Se podría analizar más en detalle el efecto del estrés oxidativo en mutantes del exómero, mediante el uso de otros compuestos diferentes a agua oxigenada, realizando mediciones del estrés oxidativo presente en las células, etcétera..., porque en los rastreos realizados se ha encontrado interacción entre el exómero y proteínas localizadas en la mitocondria y en el peroxisoma que tienen funciones en estrés oxidativo.

El exómero y la ruta de integridad

La ruta de integridad celular también responde a numerosos tipos de estrés. En su activación participan las proteínas de la familia Rho (Rho1, Rho2, Rho3, Rho4 y Rho5), sus reguladores (GEF y GAP) y las proteínas Pck1 y Pck2, en función del tipo de estrés al que estén expuestas las células (Toda et al., 1996; Sengar et al., 1997; Sugiura et al., 1998; Sugiura et al., 1999; Calonge et al., 2000; Loewith et al., 2000; Madrid et al., 2006; Barba et al., 2008; Villar-Tajadura et al., 2008; Garcia et al., 2009; Cansado et al., 2010; Soto et al., 2010; Viana et al., 2013; Sanchez-Mir et al., 2014a; Sanchez-Mir et al., 2014b; Doi et al., 2015). En este trabajo se ha observado que la ausencia del exómero provoca o una menor activación de la ruta de integridad (con cloruro de potasio a 28°C o con 1 M de cloruro de potasio a 32°C) o un apagado temprano de la ruta (no se detecta apenas activación de la ruta de integridad a los treinta minutos de tratamiento con cloruro de potasio en ninguna de las condiciones probadas). La función de las GTPasas Rho en esta señalización defectuosa se ha analizado mediante la sobreexpresión de estas, sin que se corrija la sensibilidad a cloruro de potasio. Hay que tener en cuenta que el experimento se ha realizado en medio YES, donde posiblemente se estén enmascarando algunos resultados por la presencia de una cantidad de

tiamina en este medio que reprime parcialmente al promotor *nmt1+*. No se ha analizado la actividad GTPásica de estas proteínas ni su localización, por tanto no se puede descartar del todo que un mal funcionamiento de estas proteínas sea la causa de los problemas en la activación de la ruta de integridad. El exómero está implicado en el tráfico, y en el sistema de endomembranas no solo se transportan proteínas sino también lípidos, por lo que si en ausencia del exómero existiera un defecto en la distribución de los fosfolípidos de membrana o un mal metabolismo lipídico, las proteínas Rho podrían estar deslocalizadas (por ejemplo por no tener las modificaciones correctas en su estructura) (Kabeche et al., 2015; Franco et al., 2017). Rgf1 es un GEF de Rho1 cuya localización se redistribuye tras tratamientos con cloruro de potasio a los quince minutos (Kabeche et al., 2015. y este trabajo). En este trabajo se ha observado que en *cfr1Δ* este GEF no recupera totalmente su localización *a posteriori*, lo que podría estar provocando un fallo en la activación de Rho1 que podría tener cierto efecto en la falta de actividad de Pmk1 a los treinta minutos de tratamiento con cloruro de potasio.

En la levadura de gemación *S. cerevisiae* existen unos mecanosensores en la membrana plasmática que detectan los daños de la pared celular y activan la ruta de Slt2, la homóloga de la ruta de integridad. En *S. pombe* existen proteínas semejantes a estas pero, aunque su ausencia afecta a la integridad de la pared celular y a la activación de Rho1, no tiene efecto en la respuesta a través de la ruta de Pmk1 (Cruz et al., 2013). En este trabajo se ha visto que en ausencia del exómero Mtl2 tendría alguna función en la ruta de integridad celular. Quizás Mtl1, que está menos estudiado, no se localice correctamente en ausencia del exómero y la combinación de esta deslocalización con la falta de Mtl2 ocasione la menor activación de la ruta. En la levadura de gemación se sabe que cuando Wsc1 tiene problemas en su plegamiento se escapa del control de calidad del retículo endoplasmático y pasa a ser sustrato del control de calidad del aparato de Golgi (Wang and Ng, 2010). Wsc1 tiene glicosilaciones en su estructura, y la mayor parte de la glicosilación tiene lugar en el aparato de Golgi. El exómero se localiza en el aparato de Golgi así que, si bien ni Wsc1 ni Mtl2 son cargos del exómero de *S. pombe* porque se localizan correctamente en su ausencia, podrían no tener su

conformación adecuada al faltar un complejo del aparato de Golgi. Se ha analizado la movilidad electroforética de estas proteínas mediante *Western blot* para determinar si está alterada en *cfr1Δ*, lo que indicaría un fallo en su glicosilación, sin embargo los resultados no han sido concluyentes.

La transducción de algunas señales está relacionada con el sistema de endomembranas (Mitchell, 2008). Sin embargo, en otros mutantes del sistema endosomal con los cuales muestra interacción el exómero, como es el caso de *apm1Δ*, no se están provocando los mismos efectos en la ruta de integridad. Quizás la ausencia del exómero, que afecta tanto al sistema endosomal temprano como al tardío (Hoya et al., 2017), tenga un mayor efecto en la señalización.

El defecto en la activación de la ruta solo se ha observado en presencia de estrés iónico, pero no en presencia de Caspofungina, por lo tanto la función del exómero podría estar relacionada específicamente con la activación de la ruta por parte de algún componente de la familia Rho y de Pck (Barba et al., 2008).

No se ha observado una alteración aparente en la localización de Pmk1 en ausencia del exómero. Pmk1 desempeña funciones tanto en su forma unida a membranas como en su localización nuclear (Madrid et al., 2006; Madrid et al., 2007; Sanchez-Mir et al., 2012). Su inactivación solo puede ser llevada a cabo en el citoplasma donde se localizan tanto Pmp1, como las proteínas Pyp o las Ptc1. Las proteínas Pyp y Ptc1 dependen en parte de la cascada de Sty1, aunque también puede ser independientes de ella (Madrid et al., 2006; Madrid et al., 2007). La menor activación de la ruta de integridad podría deberse a la acción de alguna de estas fosfatasas, por lo que en un futuro se podría analizar si en ausencia del exómero hay algún aspecto de estas fosfatasas que esté alterado, como por ejemplo, analizando por *Western blot* si son más abundantes.

Existe relación entre la ruta de integridad y la ruta de la calcineurina o la ruta de respuesta a estrés (Millar et al., 1995; Sugiura et al., 1998; Madrid et al., 2007; Ma et al., 2011; Viana et al., 2013). Aunque estas dos últimas rutas se

activan correctamente en ausencia del exómero, podría estar ocurriendo una descoordinación entre rutas al faltar el exómero, quizás porque las fosfatasa no puedan actuar sobre sus sustratos o quizás porque deje de existir un papel antagónico entre la calcineurina y la ruta de integridad.

El exómero, las rutas TOR y la ruta de integridad

En *Schizosaccharomyces pombe* existen dos complejos TOR. TORC1 presenta en su estructura la quinasa Tor2, mientras que TORC2 tiene a la quinasa Tor1. El complejo TORC2 actuaría en condiciones de estrés, mientras que el complejo TORC1 estaría más implicado en procesos de transcripción, autofagia y traducción (Matsuo et al., 2003; Hayashi et al., 2007; Otsubo and Yamamoto, 2008). La ruta de integridad muestra relación con la ruta TORC2. Por un lado, la ruta TORC2 y la GTPasa Ryh1 activan a la ruta de integridad o promueven la localización de los activadores de la ruta. Por otro lado, la ruta de integridad modifica el ciclo de actividad GTPásica de Ryh1 modulando la actividad TORC2. En estas conexiones son importantes la fosfatidilinositol 4-fosfatasa 5-quinasa Its3 y también la regulación de los eisosomas, unas estructuras lipídicas en las que hay degradación de PI(4,5)P₂ (Kabeche et al., 2015; Madrid et al., 2015; Madrid et al., 2016).

Los resultados de otros autores (Madrid et al., 2016) y los nuestros hacen pensar que al activarse la ruta de integridad se produce la inhibición de la fosforilación de Gad8 por parte de Tor1, y esto se observa a los quince minutos de tratamiento con KCl. A partir de una hora de tratamiento con cloruro de potasio, se apaga la ruta de integridad y se recupera la ruta TORC2. En una cepa silvestre esa recuperación podría depender de Ryh1, que es un activador de Tor1, y del exómero. En este trabajo se ha descrito que en ausencia del exómero y en presencia de KCl existe una activación menos intensa y más corta de la ruta de integridad, que podría desregular a Ryh1, y no existe recuperación de la ruta TORC2. En ausencia de la ruta de integridad y del exómero se produce una recuperación parcial, que podría estar mediada por Ryh1. De este modo, Ryh1 y el exómero estarían llevando a cabo funciones en

la actividad TORC2 tras tratamientos con cloruro de potasio; ambas son proteínas localizadas en el Golgi lo que hace resaltar el papel del sistema de endomembranas en la actividad de las rutas de respuesta a estrés (Tatebe et al., 2010; Hatano et al., 2015; Madrid et al., 2016).

Otras GTPasas de la familia Rab también están implicadas en la activación de la ruta TOR en otros organismos (Tatebe et al., 2010). Al contrario de lo que ocurre con estas proteínas, el exómero no tiene una actividad catalítica, por lo que el mecanismo por el que mediaría la recuperación de la actividad TORC2 es aún desconocido. La localización de Ryh1 es correcta en ausencia del exómero pero no se ha analizado su actividad. Es posible que esta, u otra GTPasa, no tengan actividad en ausencia del exómero. Además, es posible que en ausencia del exómero estén ocurriendo daños en la distribución de lípidos en las membranas y por tanto en la creación de microdominios necesarios para la localización de proteínas en sus lugares correctos en la membrana (Behnia and Munro, 2005; Daboussi et al., 2012; Guo et al., 2014). Se ha propuesto que Ryh1 facilita el contacto de Gad8 con Tor1, lo que facilita su fosforilación (Tatebe et al., 2010), por lo que es posible que esta alteración lipídica impidiera este contacto.

Otra posibilidad es que, en ausencia del exómero, el tratamiento con cloruro de potasio haga que las células se encuentren en un estado de *standby* en el que algunas rutas no estén señalizando. Si a las células sin exómero se las retira de las condiciones estresantes son capaces de recuperarse, quizás porque salen de ese hipotético estado de letargo o de adaptación permanente. Los mutantes del exómero son sensibles a higromicina B, tanto en la levadura de gemación como en la de fisión. Los mutantes hipersensibles a higromicina B muestran una parada en el crecimiento en unas condiciones favorables para recuperarse, esto podría estar pasando en los mutantes del exómero (Ejzykiewicz et al., 2016; Anton et al., 2018).

El cloruro de potasio provoca la formación de cúmulos de estructuras membranosas, lo que podría provocar la activación de controles de calidad o incluso de Ire1; además, dado que en *S. cerevisiae* se ha demostrado que existe relación funcional entre la ruta de Sit2 y la UPR (Scrimale et al., 2009;

Promlek et al., 2011), no puede descartarse que la UPR participe en la recuperación de la actividad de TORC2 en los mutantes del exómero expuestos a KCl. En estos mutantes también existen daños en el sistema endosomal tardío, en el entorno del sistema prevacuolar (Hoya et al., 2017), donde posiblemente se produzca la acción de las rutas TOR.

Las estructuras membranosas observadas con cloruro de potasio se pueden corresponder con fragmentación del aparato de Golgi. Un compuesto que produce la fragmentación del aparato de Golgi es la brefeldina A, al inhibir la acción de Arf1. Los mutantes del exómero de *S. cerevisiae* son sensibles a este compuesto, debido a la necesidad de Arf1 para las funciones del exómero (Trautwein et al., 2006). En *S. pombe* la pseudoquinasa Ppk32 se localiza en el Golgi, está implicada en la sensibilidad a brefeldina A, y su cantidad está regulada por la acción de las quinasas Tor1 y Tor2 (Kowalczyk and Petersen, 2016). Sin embargo, la no interacción génica entre *ppk32+* y *cfr1+* observada en este trabajo sugieren que esta proteína y el exómero actúan por mecanismos independientes. Quizá la desorganización del Golgi en presencia de cloruro de potasio afecta a otras quinasas localizadas en el Golgi y que estén también implicadas en las rutas TOR.

La ruta TORC1 no se ha analizado en detalle en este trabajo, porque no se han visto defectos en la autofagia (Otsubo et al., 2017), aunque no hay que descartar que el exómero también esté implicado en la misma.

El exómero y la citocinesis

La UPR, la calcineurina, la ruta de integridad y la ruta TOR están implicadas en la citocinesis. La UPR es necesaria para una correcta citocinesis (Bicknell et al., 2007), en ausencia de calcineurina o de *pmk1+* existen defectos en septación (Yoshida et al., 1994; Toda et al., 1996). Pmk1 se localiza en el septo (Madrid et al., 2006) y además la activación de la ruta de integridad afecta a un mensajero regulado con funciones en la localización de la miosina (Satoh et al., 2009). El complejo TOR también participa en la entrada de mitosis y evita problemas en la formación del anillo contráctil (Baker et al., 2016). En este trabajo se ha visto que la falta de Apm1, Ire1 y Pmk1 impiden la formación

del septo engrosado en presencia de cloruro de potasio que aparece en ausencia del exómero. Aunque es posible que Apm1 y Pmk1 estén afectando a la composición de polisacáridos del septo, no se ha podido determinar qué compuestos están formando ese septo engrosado porque en las condiciones experimentales necesarias para hacer el experimento de fraccionamiento de la pared celular estos septos aberrantes no se forman. Ninguna de las enzimas de la pared celular analizadas muestra una deslocalización en *cfr1Δ*, aunque sí se ha observado una alteración en la localización de las miosinas, las septinas y el exocisto. Las miosinas pueden estar deslocalizadas por la acción de la ruta de integridad, que en el momento de la citocinesis se está activando (Madrid et al., 2007) pero que en ausencia del exómero tiene menos actividad.

Visión general y perspectivas de futuro

La ausencia del exómero tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe* determina sensibilidad a diversos compuestos iónicos (Anton et al., 2017; Hoya et al., 2017; Anton et al., 2018), lo que indica que la función/funciones de este complejo en presencia de estrés estaría conservada a lo largo de la evolución. Dado que en *S. pombe* el exómero es bastante más sencillo que en *S. cerevisiae*, podría llevar a cabo varias funciones en respuesta a estrés, que en organismos con más ChAPs podrían haberse separado y especializado. Otras proteínas de *S. pombe* parálogas a proteínas Chs, como es el caso de Cfh3 (Sharifmoghadam and Valdivieso, 2009; Sharifmoghadam et al., 2012), también tienen una función más relevante en presencia de estrés, lo que sugiere que su función original estaba asociada a estas situaciones.

Este trabajo se ha centrado sobre todo en el análisis de la posible función del exómero en respuesta a estrés salino. La sensibilidad a este tipo de estrés en células sin este complejo de proteínas podría deberse al menos a tres causas, no necesariamente excluyentes entre sí.

La primera y más esperable, dada la función descrita para el exómero como adaptador/cubierta (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006; Paczkowski and Fromme, 2014), sería que en los mutantes un canal/bomba de iones no llegara a su destino final de forma

adecuada. En particular, el candidato ideal *a priori* era Cta3/Ena1, por los resultados obtenidos en *S. cerevisiae* (Anton et al., 2017). Sin embargo, aunque esta posibilidad no puede descartarse completamente, los resultados obtenidos en este trabajo parecen descartar que la deslocalización de una única proteína cargo con esa función sea el origen de los fenotipos de los mutantes *cfr1Δ* y *bch1Δ*. Dado que el transporte vesicular es también necesario para el transporte intracelular de lípidos, una función relacionada sería un defecto en la formación de microdominios lipídicos en los mutantes. Utilizando sondas fluorescentes en el laboratorio se ha analizado la localización de PI(4,5)P₂, que está relacionado con la respuesta a estrés y con la localización de Rgf1 (Kabeche et al., 2015), y de PI(3,5)P₂, relacionado con la respuesta a estrés mediada desde las vacuolas (Jin et al., 2017), sin que se haya encontrado una diferencia aparente en su localización entre las cepas silvestre y *cfr1Δ* sin o con KCl.

La segunda razón para la sensibilidad a estrés salino sería que el daño que se produce en el sistema endomembranoso en ausencia del exómero (Hoya et al., 2017) se agravaría o sería más relevante en presencia de sales. Los experimentos expuestos en este trabajo, y otros realizados en el laboratorio, demuestran que, efectivamente, el sistema endosomal está más dañado en el mutante que en el silvestre, en particular en presencia a KCl. Los experimentos de interacción génica entre *cfr1+* y *ppk32+* sugieren que este daño sería diferente al producido en presencia de brefeldina A (Kowalczyk and Petersen, 2016). También sería diferente al que ocurre en ausencia de adaptadores de clatrina (Ma et al., 2009; este trabajo); una posible explicación para esta diferencia sería que AP-1 y GGAs son adaptadores *bona fide*, que participan en el transporte de cargos concretos, mientras que la función del exómero sería diferente. Bch1 es la ChAP más antigua y se le asigna capacidad de producir curvatura de membranas (Wang et al., 2006; Paczkowski and Fromme, 2014; Anton et al., 2018). Es posible que esta proteína promueva/ garantice una flexibilidad/ microorganización/ topología lipídica a las membranas del sistema endosomal y que, en su ausencia, los iones captados del ambiente hipersalino produzcan un daño en las endomembranas que no ocurriría en ausencia de los otros adaptadores.

La tercera razón estaría relacionada con una participación del exómero en procesos de señalización. Las células han desarrollado varias rutas de señalización para detectar las variaciones ambientales y poner en marcha los mecanismos adecuados para hacerlas frente y garantizar la supervivencia celular en respuesta a estrés. El exómero podría formar parte/ participar en la regulación de alguna(s) de ellas. Los resultados de este trabajo parecen demostrar que el exómero no participaría de forma significativa en la activación de las rutas de la calcineurina y de la de respuesta a estrés. Por otro lado, aunque la ausencia de fenotipo *vic* demuestra que el exómero no es un componente de la misma, sí que parece estar relacionado con la ruta de integridad celular, ya que la amplitud de la respuesta es menor en ausencia que en presencia del exómero. La razón para esta alteración no está clara, ya que la sobre-expresión de las GTPasas Rho no suprimen el fenotipo de *cfr1Δ* y la alteración en la localización de Rgf1 es patente después del momento en el que ya se detecta defecto en la activación. Respecto a los sensores, parece que ni Wsc1 ni Mtl2 serían cargos del exómero, y habría que investigar en más detalle la posible implicación de Mtl1, el menos caracterizado de todos (Cruz et al., 2013) y su relación con Mtl2 y con el exómero. Finalmente, el exómero parece estar relacionado con la respuesta de la ruta dependiente de la quinasa Tor1 en condiciones de estrés. La función más conocida de las rutas TOR es la de fomentar procesos anabólicos y reprimir procesos catabólicos; en la levadura de fisión la inhibición de estas rutas en respuesta a medio mínimo sin nitrógeno (una condición necesaria para la conjugación) facilita la parada en G1 y la autofagia necesaria para proveer una fuente de nitrógeno durante la esporulación (Otsubo and Yamamoto, 2008; Otsubo et al., 2017) en lo que se considera un proceso de adaptación a las condiciones ambientales. De igual manera, este y otros trabajos (Cohen et al., 2014; Madrid et al., 2016), indican que en presencia de KCl se reduce temporalmente la actividad de Tor1 que al cabo de un tiempo se recupera. En ausencia del exómero falla esta recuperación. Aunque se han realizado experimentos para analizar si este fallo se debe a la deslocalización de algunos componentes de la ruta, los resultados han sido negativos (en el caso de GFP-Ryh1 y Ste20-3xGFP) o no concluyentes por la falta de calidad de los reactivos (Gad8-GFP, Gad8-3xGFP,

Bit61-3xGFP). Tampoco parece deberse a una alteración de SEACIT o SEACAT al completo, aunque no se descarta un papel en la regulación de Sea3. Otra posibilidad es que la desregulación de Tor1 sea una consecuencia de la respuesta anómala de la ruta de integridad, ya que este y otros trabajos (Madrid et al., 2016) muestran que en un silvestre existe relación entre ambas rutas. En ausencia del exómero esta coordinación estaría alterada, lo que indicaría que, más que ser un componente específico de una ruta, este complejo actuaría como/ formaría parte de un centro de coordinación de la respuesta a estrés. Una hipótesis sería que participaría en la formación de contactos entre membranas de distintos orgánulos, de ahí los efectos pleiotrópicos observados en los mutantes y la existencia de alteraciones en sistemas tan diferentes como el compartimento prevacuolar y el retículo endoplasmático.

Las hipótesis anteriores contemplan el exómero como un participante activo de la respuesta a estrés, de modo que al faltar está fallando un componente estructural/ funcional de la célula, y sería eso lo que produciría sensibilidad a estrés. Sin embargo, otra manera de contemplar el problema sería que una vez que el KCl daña el sistema endosomal, la célula detecta un daño y esto hace que permanezca parada hasta que se repare el daño. Dado que en los mutantes del exómero el daño es más severo, la célula no podría repararlo y sentiría el daño de manera permanente. Como hemos demostrado, las células permanecen vivas en presencia de KCl y, una vez eliminada la sal, son capaces de proseguir con su ciclo de vida. Esta hipótesis plantea la existencia de un punto de control (*checkpoint*) de daño en las endomembranas, y apunta al exómero como un participante del mismo. En *S. cerevisiae* se ha descrito tanto una relación entre la ruta de Slt2 y las rutas TOR como una relación entre un descenso en la actividad TOR y un estado de quiescencia (Vilella et al., 2005; Petkova et al., 2010; Petkova et al., 2013; Sundaram et al., 2015). A pesar de que sea en otras condiciones y en otro organismo, algo similar podría estar pasando en la levadura de fisión. El hecho de que la delección de *pmk1+* promueva tanto una recuperación parcial de la actividad TORC2 en *cfr1Δ* como una ligera mejora en el crecimiento de las colonias

mutantes en placas con KCl, parece indicar que es necesario que la ruta de integridad no se active para facilitar la adaptación a este daño.

Independientemente de cuál sea la función del exómero en respuesta a estrés salino, los experimentos de este trabajo, junto a los de otros autores, demuestran que hay varios procesos biológicos necesarios para garantizar el crecimiento en KCl (rutas de señalización, adaptadores de clatrina...), y que es posible que la causa última de la muerte celular cuando falla cada uno de ellos sea diferente. Los resultados de esta Tesis sugieren fuertemente que la causa por la que la ausencia del exómero produce sensibilidad a KCl no es única, sino que en *S. pombe* este complejo estaría implicado en diversos procesos, sin que el fallo en cada uno de ellos sea lo único que inhibe el crecimiento en condiciones de estrés. Además, en los diversos rastreos se ha visto que el exómero tiene interacción con una gran cantidad de genes y proteínas implicadas en multitud de procesos, incluidas proteínas nucleares y mitocondriales. El exómero además presenta dominios de proteínas nucleares (Martin-Garcia et al., 2011), y es en el núcleo donde tienen lugar los cambios transcripcionales producidos tras la activación de las rutas descritas (Wilkinson et al., 1996; Takada et al., 2007), así que es posible que a través de los dominios nucleares el exómero se esté asociando a otras proteínas y secuestrándolas para que solo ejerzan sus funciones en el momento y las circunstancias adecuadas.

Para avanzar en el conocimiento de la función del exómero en respuesta a estrés habrá que seguir ahondando en los siguientes aspectos:

- Análisis de la relación entre las GTPasas Rho, las proteínas Pkc, o los sensores Wsc1, Mtl1 y Mtl2 y el exómero en presencia de KCl, para ahondar en la implicación del exómero en las rutas de integridad y TOR.
- También sería interesante conocer si en ausencia de exómero existe una mayor activación de la UPR, realizando *Northern Blot* para analizar el estado del mensajero *gas2⁺*, y así saber con más precisión cómo está la UPR en las células *cfr1Δ* tratadas con KCl.
- Otro tema que podría investigarse en un futuro es el análisis de la integridad de las mitocondrias, y del nivel de estrés oxidativo en las células

mutantes con KCl, a pesar de que la falta de exómero no provoque sensibilidad a agua oxigenada. Quizás el exómero tenga funciones en el mantenimiento de la homeostasis de las mitocondrias.

- Aunque no se han encontrado problemas en la regulación del pH en los mutantes sin exómero, cabe la posibilidad de que exista cierta desregulación, ya que los métodos utilizados (observación al microscopio de fluorescencia tras tinción con quinacrina o de la utilización de una pHluorina citoplásmica) no son muy precisos. Habría que realizar otros experimentos. Es posible que el KCl además de afectar al compartimento prevacuolar esté afectando a las propias vacuolas.
- Respecto a la función del exómero en citocinesis, habría que analizar la localización de las miosinas, las septinas y el exocisto a los 15 minutos de tratamiento con KCl, ya que los experimentos realizados hasta el momento fueron tras un tiempo mínimo de 4 horas en presencia de la sal, y en esas condiciones también había defectos en su distribución en la estirpe control.
- Establecer la existencia de un *checkpoint* de daño en endomembranas analizando si un mutante *wee1Δ cfr1Δ* es capaz de crecer en placas con KCl.

Introducción Antecedentes y objetivo Resultados Discusión
Conclusiones

EUREKA
(ARQUÍMEDES)

Las principales conclusiones obtenidas de este trabajo fueron las siguientes:

1. La falta del exómero de *Schizosaccharomyces pombe* provoca sensibilidad a estrés iónico, pero no a estrés osmótico.
2. La sensibilidad a estrés iónico provocada por la ausencia de exómero no se debe a la falta o deslocalización de ninguno de los canales iónicos analizados. Ningún canal iónico analizado es un cargo del exómero.
3. La ausencia del exómero provoca la aparición de un septo engrosado tras tratamientos largos con cloruro de potasio que no se produce en ausencia del sensor de la UPR Ire1, de la quinasa de la ruta de integridad Pmk1 o de la proteína del complejo AP-1 Apm1.
4. El exómero y la calcineurina comparten funciones en la respuesta a cloruro de potasio, pero por vías independientes.
5. La ausencia del exómero afecta al retículo endoplasmático: en *cfr1Δ* se secreta menos Bip1; además, cuando esta cepa se trata con cloruro de potasio la distribución de proteínas solubles y transmembrana asociadas a este orgánulo se altera.
6. El exómero y la ruta de estrés en la que participa Sty1 muestran interacción funcional en la respuesta a cloruro de potasio.
7. La ausencia del exómero provoca una activación anómala de la ruta de integridad celular, sin que el exómero sea un componente de dicha ruta.
8. La proteína Rgf1, GEF de Rho1, no recupera su localización en la superficie celular cuando las células sin exómero son tratadas con KCl.
9. El cloruro de potasio afecta al sistema endosomal y al compartimento prevacuolar, y este efecto es más severo en células sin exómero.
10. La ausencia del exómero afecta a la reactivación de la ruta TORC2 en respuesta a cloruro de potasio.
11. La ausencia del exómero provoca sensibilidad a múltiples fuentes de estrés, sin que ninguno de los procesos analizados sea la única causa de dicha sensibilidad.

Introducción Antecedentes y objetivo Resultados Discusión
Conclusiones Materiales y métodos

1. Microorganismos utilizados

Este trabajo se realizó empleando distintas cepas de *Escherichia coli* y de *Schizosaccharomyces pombe*.

La bacteria *E. coli* se utilizó para los trabajos rutinarios de clonación molecular; la estirpe DH5 α , cuyo genotipo se muestra en la **tabla SI** del Anexo, fue la hospedadora habitual de los plásmidos usados. Las cepas de esta bacteria se conservan en viales con glicerol al 50% y a -80°C.

La levadura de fisión *S. pombe* fue el modelo de estudio empleado en este trabajo. Las características genéticas, junto a la procedencia, de cada una de las cepas con las cuales se realizaron los experimentos, aparecen detalladas en la **tabla SI**. Las cepas se guardaron en viales con glicerol al 30% a una temperatura de -80°C, para una conservación prolongada en el tiempo, o a -20°C durante tiempos más breves.

2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada (*Milli Rho*) y se esterilizaron en autoclave. Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar a los correspondientes medios líquidos, previamente a su esterilización.

2.1 Medios de cultivo para *E. coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio denominado LB (Luria-Bertani) cuya composición consta de: triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y cloruro sódico al 1%. El pH de este medio de cultivo oscila entre 7,2 y 7,4; el ajuste del pH se realiza antes de la esterilización en autoclave.

Para la selección de clones bacterianos resistentes a antibióticos el medio se suplementó con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) o con kanamicina (30 $\mu\text{g/ml}$).

2.2 Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y el mantenimiento de la levadura *S. pombe* están descritos por Moreno y colaboradores (Moreno et al., 1991).

- El medio rico utilizado para el crecimiento de *S. pombe* fue YES (*Yeast Extract Supplemented*), su composición es: glucosa al 3%, extracto de levadura al 0,5%, adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo (225 mg/l de cada uno de ellos). Previamente a su esterilización en autoclave se ajusta el pH a 5,6; la glucosa se añade una vez esterilizado para evitar problemas de caramelización.

En los experimentos llevados a cabo en condiciones de estrés los distintos compuestos se añadieron al medio tras la esterilización por autoclave, excepto en el caso del cloruro potásico.

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

- El medio mínimo empleado en este trabajo se denomina EMM (*Edinburgh Minimal Media*), su composición es la siguiente: glucosa al 2%, ftalato monopotásico al 0,3%, fosfato de disodio al 0,22% y cloruro de amonio al 0,5%; el denominado MM sin nitrógeno (MM-N) no contiene cloruro de amonio. Tras la esterilización en autoclave se añaden sales, minerales y vitaminas esterilizados por filtración.
 - Solución concentrada de sales (50x): cloruro de magnesio hexahidratado 0,26 M, cloruro de calcio dihidratado 5,0 mM, cloruro de potasio 0,67 M y sulfato de sodio decahidratado 14,1 mM.
 - Solución concentrada de minerales (10.000x): ácido bórico 80,9 mM, sulfato de manganeso 23,7 mM, sulfato de zinc heptahidratado 13,9 mM, cloruro férrico

hexahidratado 7,4 mM, ácido molíbdico monohidratado 2,5 mM, ioduro de potasio 6,0 mM, sulfato de cobre (II) pentahidratado 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 40,8 mM y pantotenato cálcico 4,2 mM.

El medio mínimo se suplementó con adenina, histidina, leucina, lisina y/o uracilo (225 mg/l) en aquellos casos en los que fue necesario suplementar para el crecimiento de ciertas cepas; si el medio mínimo tiene añadidos los cinco suplementos se denomina medio mínimo completo.

En algunos experimentos fue necesaria la adición de ciertos compuestos, para la inducción de estrés, o de tiamina, para la represión del promotor *nmt1⁺*.

3. Condiciones y análisis de crecimiento

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

Las células de esta bacteria se incubaron en tubos de vidrio con medio líquido LB sometidos a agitación orbital de 200 rpm y a temperatura igual a 28°C o a 37°C. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de LB incubadas en estufas a las mismas temperaturas que en el caso de los cultivos líquidos.

3.2 Condiciones de cultivo para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*

El momento óptimo para iniciar los experimentos es aquel en el que los cultivos se encuentran en fase exponencial de crecimiento. Con el objetivo de conseguir que el cultivo se encontrase en esta fase horas antes de la realización del experimento se pre-inoculó cada una de las cepas necesarias; pasado cierto tiempo (generalmente toda la noche) se estimó su crecimiento

mediante la medida de la absorbancia a 600 nm y se realizó un inóculo en medio fresco realizando la dilución adecuada para que, teniendo en cuenta el tiempo de generación de cada cepa en las condiciones de cultivo (medio y temperatura de incubación), el inóculo se mantuviera creciendo en fase exponencial hasta la realización del experimento.

La medida de la absorbancia a 600 nm antes mencionada se realizó en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus de BioRad. Con las curvas de calibración obtenidas previamente en el laboratorio se conoce que una densidad óptica de 1 es equivalente a 10^7 células/ml de *S. pombe*.

Los cultivos líquidos se incubaron en matraces o en tubos de vidrio sometidos a una agitación de 200 rpm a temperaturas entre los 25°C y los 32°C, según el experimento. Los cultivos sólidos se llevaron a cabo en placas Petri incubadas a diferentes temperaturas.

3.3 Ensayos de crecimiento en gota

Este tipo de experimento permitió analizar y comparar el crecimiento de distintas cepas, a diferentes temperaturas o en presencia de compuestos químicos inductores de estrés, con el objetivo de conocer su sensibilidad o las interacciones génicas existentes.

La realización del experimento se inició con cultivos en medio líquido pre-inoculados y, posteriormente, inoculados hasta obtener una densidad óptica igual a 1. A continuación, se realizaron diluciones seriadas 1:4 de cada cepa para obtener seis concentraciones decrecientes de células; de cada una de esas concentraciones se colocó, mediante un replicador, una gota en una placa del medio sólido requerido. En ocasiones se emplearon solo tres concentraciones de células, partiendo de una densidad óptica de 0,4 y haciendo dos diluciones seriadas 1:4.

Las placas con las gotas se incubaron entre dos y cinco días, según la temperatura.

3.4 Condiciones especiales de crecimiento de *S. pombe*

Las condiciones de cultivo (tiempos, temperaturas) en presencia de sales, agentes antifúngicos, agentes causantes de estrés, distintas concentraciones de glucosa, etcétera... se indican en cada experimento junto a la concentración utilizada.

Generalmente todos los compuestos se añadieron una vez esterilizados los medios líquidos o sólidos; la excepción es el cloruro de potasio, del cual (en el caso de los medios sólidos) se pesó la cantidad necesaria y se añadió, junto a los otros componentes sólidos del medio, antes del paso por el autoclave.

Las placas suplementadas con compuestos inestables se prepararon siempre un día antes de la realización del experimento.

3.5 Condiciones de cultivo para la conjugación de *S. pombe*

Para que se produzca la conjugación de esta levadura son necesarias condiciones limitantes de nutrientes, por este motivo la inducción de la conjugación se realizó en placas de MM completo (descrito anteriormente). Según la capacidad de crecimiento de las cepas parentales las placas se incubaron a diferentes temperaturas para permitir su crecimiento y conjugación.

4. Cruces genéticos y aislamiento de ascosporas

4.1 Conjugación

Con el objetivo de conseguir cepas con características de dos estirpes parentales se llevaron a cabo cruces genéticos. La conjugación entre las dos cepas parentales se realizó en las condiciones descritas en el subapartado 3.5.

Si las estirpes parentales fueron heterotálicas se tomó la misma cantidad de células de cada progenitor; si para el cruce genético se empleó una cepa homotálica se tomó una menor cantidad de dicha cepa, para disminuir la probabilidad de conjugación entre sus propias células.

Los cigotos se originan 12-20 horas después de realizarse el cruce e inmediatamente tiene lugar la meiosis y esporulación, formándose ascas con cuatro ascosporas haploides observables entre uno y dos días después de la incubación.

El aislamiento de las ascosporas se realizó por dos procedimientos diferentes:

4.2 Aislamiento de ascosporas al azar

Para la selección de ascosporas al azar se tomó una pequeña cantidad del cruce en el momento en el que las ascas estuvieron maduras y se “resuspendió” en 1 ml de agua en presencia de 5 μ l del extracto enzimático β -glucuronidasa (Roche). La mezcla se incubó a temperatura ambiente (25-28°C) en agitación durante, aproximadamente, 16 horas para facilitar la liberación de las esporas. Se “plaquearon” las esporas, a partir de diluciones de la mezcla original, en medio rico YES; una vez crecieron en medio rico se seleccionaron aquellas colonias que presentaban el genotipo de interés mediante su crecimiento en medios selectivos, análisis por PCR u observación al microscopio.

4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: análisis de tétradas

Este tipo de aislamiento se realizó para analizar los productos de la segregación meiótica. Para realizarlo se “resuspendió” una pequeña cantidad del cruce esporulado en 200 μ l de agua estéril y se extendieron 5 μ l en un extremo de una placa de medio YES. Las ascas se depositaron de manera individual en zonas separadas de la placa empleando un micromanipulador automático (Singer MSM System Series 200). La placa con las ascas separadas se incubó durante 16 horas a temperatura ambiente para facilitar la posterior disección del asca. Posteriormente, se separaron las cuatro esporas de cada asca utilizando el micromanipulador. La placa con las esporas

separadas se incubó a la temperatura adecuada, según las características del cruce, hasta que se observó el crecimiento de las colonias procedentes de las esporas. Por último, se procedió al estudio genotípico de cada una de ellas del modo en el que se ha descrito en el subapartado 4.2.

5. Procedimientos 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, llevan el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación ColE1 y un fragmento del operón de lactosa de *E. coli* que codifica parte de la β -galactosidasa. Además, disponen de un sitio de clonación múltiple con 21 sitios únicos de restricción; la diferencia entre el denominado como KS y el conocido como SK se encuentra en la orientación de este sitio de clonación y de los promotores de las ARN-polimerasas T3 y T7 que lo flanquean y que son necesarios para la síntesis *in vitro* de ARN. Posee, también, el origen de replicación del fago f1.
- **pGEM-T (Promega)**: es un plásmido de 3 kb derivado del vector pGEM-5zf (+). Su secuencia contiene el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación ColE1 y un fragmento del operón lac de *E. coli*. Tiene 13 sitios únicos de reconocimiento por endonucleasas de restricción flanqueados por los promotores de las polimerasas T3 y SP6. Además, cuenta con un fragmento del origen de replicación f1. Es un vector lineal que posee una timina en cada extremo y se emplea para clonar fragmentos de ADN amplificados mediante PCR.

5.1.2 Vectores de *S. pombe*

Los plásmidos usados para esta levadura poseen características comunes, como son: la presencia de un origen de replicación y de marcadores de selección para bacterias y para levaduras.

No existen plásmidos centroméricos (monocopia) para *S. pombe* debido a que su centrómero es demasiado grande como para ser incluido en un plásmido.

- **pAL-KS⁺**: este vector tiene 6,3 kb y fue obtenido por el Dr. Ishiguro en la Universidad Konan de Japón a partir del plásmido pBluescript KS. Consta de una secuencia de replicación autónoma *ars1⁺*, un fragmento de ADN con sitios de reconocimiento para 11 enzimas de restricción en la región del operón lactosa y el gen *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *leu1-32* de *S. pombe*.
- **pAU- KS⁺**: este vector tiene un tamaño de 5,6 kb. Sus características son similares a las del anterior, salvo que el marcador de selección es el gen *URA3* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *ura4-Δ18* de *S. pombe*.
- **pREPs**: este conjunto de vectores fue obtenido a partir del plásmido de *E. coli* pUC119. Confieren la resistencia al antibiótico ampicilina y son autónomos en la bacteria. El marcador de selección es el gen *LEU2* y presentan el promotor *nmt1⁺*, reprimible por tiamina. Existen tres versiones: pREP3X, 41X y 81X, de todas ellas en este trabajo se ha empleado la versión 3X, la más fuerte. El sitio de clonación múltiple se encuentra a continuación del promotor.
- **pJK148** (McLeod et al., 1987; Keeney and Boeke, 1994): es un vector integrativo, puesto que carece de la secuencia *ars1⁺*, de 5,3 kb. Posee un sitio de clonación múltiple con sitios de reconocimiento para 19 enzimas de restricción, el gen de resistencia a ampicilina, un fragmento del operón lactosa y el origen de replicación ColE1 de *E. coli*. Para su integración en el genoma es necesario convertirlo en lineal digiriendo en el gen *leu1⁺*, la reconstitución del gen se produce mediante recombinación al introducirlo en una cepa *leu1-32*.

5.2 Obtención del ADN

La extracción del ADN plasmídico de *E. coli* se efectuó por el método de lisis alcalina (Zhou et al., 1990), rompiendo las células con una mezcla de NaOH y de SDS. Si fue necesario un ADN de pureza superior o en mayor cantidad se utilizaron las columnas QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN). Este *kit* permite la unión del ADN a una membrana de sílica, en presencia de una elevada concentración de sales, y su elución con baja concentración de sales, de una manera sencilla, rápida y sin necesidad de emplear solventes orgánicos.

La extracción del ADN total de *S. pombe* se realizó según los protocolos descritos por Moreno y colaboradores (Moreno et al., 1991) y en el manual de laboratorio de Sambrook y colaboradores (Sambrook, 2001).

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los termocicladores empleados fueron: MyCycler™ (BioRad) y Multigene Mini™ (Labnet International).

La mezcla de reacción fue la siguiente: tampón de reacción suministrado con la enzima por la casa comercial; 3 mM de cloruro de magnesio; los cuatro desoxinucleótidos trifosfato precursores a una concentración de 0,2 mM de cada uno; los oligonucleótidos necesarios para ser usados como cebadores a una concentración final de 100 µM; 0,25 unidades de la enzima BioTaq polimerasa (BIOLINE) y el ADN molde (extraído según los protocolos del subapartado 5.2) o una cantidad muy pequeña de células (PCR de colonia). En ocasiones, para obtener ADN con un menor porcentaje de errores, se empleó la enzima VELOCITY DNA Polymerase (BIOLINE), usando las condiciones recomendadas por la casa comercial.

Durante la reacción tiene lugar un primer paso de desnaturalización del ADN molde a 94°C, un segundo paso de anillamiento de los cebadores a la temperatura óptima variable según su secuencia y, por último, la extensión de las hebras, utilizándose 1 minuto de incubación a 72°C por cada kb de ADN a

amplificar. Cada uno de estos pasos se repite de manera cíclica a lo largo del proceso entre 24 y 32 veces, dependiendo del experimento.

Los productos de la PCR fueron purificados, si fue necesario, utilizando el sistema NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (MACHEREY-NAGEL).

5.4 Manipulación de ADN

La manipulación del ADN se realizó siguiendo los protocolos recogidos en los manuales (Ausubel *et al.*, 1995; Sambrook, 2001) y las indicaciones de las casas comerciales suministradoras de enzimas y materiales. La digestión con enzimas de restricción se realizó en los tiempos y temperaturas indicadas por el manual de la casa suministradora.

La ligación de fragmentos de ADN se realizó empleando la enzima ADN ligasa del fago T4 (Fermentas) e incubando durante dieciséis horas a 16°C. Cuando fue necesario, el fosfato del extremo 5' del vector se eliminó mediante tratamiento con 1 unidad de fosfatasa alcalina (Roche) durante 5-8' a 37°C.

El análisis de los fragmentos de ADN procedentes del tratamiento con enzimas de restricción o de la amplificación mediante PCR se llevó a cabo a través de electroforesis horizontal en geles de agarosa (Hispanlab), de porcentaje acorde al tamaño a analizar, con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml para permitir la visualización del ADN bajo una fuente de luz ultravioleta. La electroforesis se realizó en presencia de tampón 1x TAE (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, pH ajustado a 8 con acético). Si fue necesaria la purificación de fragmentos de ADN tras su separación en gel de agarosa esta se realizó con el *kit* NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (MACHEREY-NAGEL).

5.5 Secuenciación de ADN

El ADN purificado fue secuenciado en dos emplazamientos diferentes: el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca, que cuenta con un secuenciador automático Abi Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems), o el servicio de secuenciación del CENIT, que emplea un secuenciador automático capilar 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

La técnica usada se basa en modificaciones del método descrito por Sanger y colaboradores (Sanger et al., 1977). Se usan didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos que son detectados por un láser. Las secuencias obtenidas se observaron en forma de cromatograma, junto con las letras correspondientes a cada nucleótido, con el programa Chromas.

5.6 Transformación

5.6.1 Transformación de *E. coli*

La transformación de la bacteria con plásmidos o con productos de ligación se realizó por choque térmico siguiendo el protocolo diseñado por Kushner (Kushner, 1978). En ocasiones se empleó un método más simplificado, de tan solo un minuto de duración, diseñado por Golub (Golub, 1988).

Otro modo de transformación empleado fue la electroporación, aplicación de un campo eléctrico para permeabilizar la membrana plasmática de la bacteria y permitir la entrada del ADN transformante.

5.6.2 Transformación de *S. pombe*

La entrada del ADN en las células de la levadura se facilitó produciendo agujeros con acetato de litio siguiendo el método descrito en (Ito et al., 1983) y modificado por Bahler (Bahler et al., 1998). Otro método empleado fue el del LiSorb, protocolo procedente del laboratorio del Dr. Nurse (www.biotwiki.org/bin/view/Pombe/NurseLabManual).

Las placas con los transformantes se incubaron entre 25°C y 32°C para permitir el crecimiento de las colonias.

5.7 Construcciones realizadas

5.7.1 *gas2⁺* fusionado al promotor y al terminador *nda2⁺*

La amplificación de las secuencias no codificantes en 5' (promotor) y en 3' (terminador) del gen de la α -tubulina *nda2⁺*, así como de la ORF de *gas2⁺*, se realizó por PCR utilizando la enzima Velocity. Cada fragmento estaba flanqueado por secuencias correspondientes a sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción, de modo que se pudieran clonar originando la construcción *Pnda2⁺:gas2⁺:Tnda2⁺*. Tras la amplificación, los fragmentos de ADN se purificaron y se digirieron con las enzimas correspondientes. El promotor se digirió con las enzimas *ApaI* y *EcoRI*, la ORF de *gas⁺* con las enzimas *EcoRI* y *NotI* y el terminador con las enzimas *NotI* y *SacI*. Una vez digeridos, todos los fragmentos se ligaron entre sí y al vector pJK148 (digerido previamente con las enzimas *ApaI* y *SacI*). Con esta construcción se transformó la cepa DH5 α de *E. coli*.

Para fusionar la construcción anterior con la proteína GFP se clonó el fragmento de ADN que codifica la proteína fluorescente, con el sitio de restricción para *NotI*, la GFP se fusionó en el sitio para esa enzima que se introdujo antes del codón de parada del gen *gas2⁺* al hacer la construcción *Pnda2⁺:gas2⁺:Tnda2⁺*. De este modo, la GFP queda tras la ORF de *gas2⁺*. El ADN plasmídico obtenido en *E. coli* tras la ligación se linealizó con la enzima *Tth1111* para dirigir su integración en el locus *leu1⁺* de *S. pombe*, donde se introdujo mediante transformación.

6. Análisis de proteínas

Las técnicas generales para el análisis de proteínas se encuentran descritas por Harlow (Harlow, 1988). A continuación, se indican las variaciones introducidas en estos protocolos.

6.1 Obtención de extractos celulares

Los extractos celulares se obtuvieron de cultivos en fase logarítmica de crecimiento. Las células procedentes de estos cultivos se recogieron por centrifugación y se lavaron con 1 ml de agua fría. A continuación, se añadieron 5 μ l de tampón de extracción por densidad óptica (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Triton x-100 1%) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina/ pepstatina 1 μ g/ml y PMSF 1 mM). Las células se lisaron con bolitas de vidrio (Braun Biotech International) en una *Fast Prep* FP120 (Bio 101 Savant) aplicando tres pulsos de quince segundos cada uno a una velocidad de 5 m/s. Entre cada uno de los pulsos las células se incubaron durante cinco minutos en hielo. La eliminación de las bolitas de vidrio, las paredes y los restos celulares se consiguió mediante una centrifugación de un minuto a 3.000 rpm, para evitar la degradación de las proteínas esta centrifugación se realizó a 4°C.

La valoración de la concentración de proteína total en cada muestra se llevó a cabo mediante el método colorimétrico Bradford (Bradford, 1976) en un espectrofotómetro SmartSpec™Plus (BioRad) y usando BSA como patrón para realizar la recta de calibración. A partir de los valores obtenidos en la medición se igualó la cantidad de proteína de todas las muestras.

Las muestras ya igualadas se diluyeron a la mitad añadiendo el tampón de carga 2x SB (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 0,286 M, glicerol 20% y azul de bromofenol); realizado este paso las muestras se hirvieron durante cinco minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

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

Este procedimiento se realizó de manera similar al descrito en el apartado anterior, las diferencias entre ambos se describen a continuación:

Las células se lavaron con 1 ml de tampón *STOP* (EDTA 10 mM, NaCl 154 mM, NaF 10 mM y NaN₃ 10 mM) y posteriormente con 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5/ EDTA 5 mM. El tampón de extracción empleado contuvo Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM y sacarosa al 10%.

La eliminación de paredes y restos celulares se realizó a 1.600 *xg* durante cinco minutos.

Una vez obtenidos los extractos e igualadas las muestras, 160 μ l de estas se mezclaron con 40 μ l de urea 8 M y se incubaron durante toda la noche en rotación y a 4°C. A la mañana siguiente se diluyeron a la mitad con 2x SB y se calentaron a 65°C durante cinco minutos.

6.2 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Las muestras, con los extractos totales obtenidos según los protocolos descritos anteriormente y ya desnaturalizadas, se cargaron en geles de poliacrilamida: bisacrilamida (29:1, BioRad) de porcentaje variable en función del tamaño de la proteína a analizar. La separación de las proteínas en los geles, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se consiguió mediante la aplicación de 150 V durante, aproximadamente, una hora; para la separación se utilizó tampón de carrera 1x Laemmli (Tris 25 mM, Glicina 200 mM y SDS 0,1%, pH 8,3).

La transferencia de proteínas a membranas de PVDF (Immobilon™-P, Millipore) se realizó mediante la aplicación de 100 V durante aproximadamente una hora y media en un sistema Mini Trans Blot (BioRad) con tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol o etanol al 10%, pH 8,3).

6.3 Inmunodetección de proteínas

Las membranas procedentes de la electrotransferencia se bloquearon, con leche en polvo (Sveltesse-Nestlé) al 5% ó al 3% o con seroalbúmina bobina (Sigma) al 3% disueltas en TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 136 mM y Tween-20 al 0,25%), durante una hora a temperatura ambiente y en rotación.

Después del bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios necesarios (casas suministradoras y diluciones indicadas en el subapartado 6.5), diluidos en la solución anteriormente empleada en el bloqueo, durante toda la noche a 4°C y en rotación.

Tras la incubación con el anticuerpo primario se procedió a realizar dos lavados de diez minutos con TBST y a incubar la membrana en presencia del anticuerpo secundario adecuado (dilución y casa comercial indicadas en el subapartado 6.5) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se volvió a lavar dos veces con TBST antes de iniciar su revelado.

El revelado de las membranas se realizó mediante quimioluminiscencia, detectando la actividad peroxidásica unida al anticuerpo secundario con el empleo del *kit* WesternBright™ ECL (Advansta), en películas fotosensibles Medical X-Ray Film Blue, AGFA.

6.4 Ensayo de *immunoblot* de colonias (*Dot Blot*)

Este ensayo permite la detección de proteínas secretadas al medio extracelular, siendo un ejemplo típico la detección de la Cpy1 secretada debido a defectos en su transporte (Iwaki et al., 2006; Codlin and Mole, 2009).

Los cultivos necesarios, en fase exponencial de crecimiento (DO=1), se centrifugaron para concentrar sus células y, posteriormente, se procedió a depositar 6 µl de esas células sobre una membrana de nitrocelulosa colocada en la placa del medio correspondiente (YES o YES con 0,6 M de KCl). La placa se incubó durante 30 horas para permitir el crecimiento de las células y la

acumulación de las proteínas secretadas en la nitrocelulosa. Antes de realizar la incubación con los anticuerpos fue necesario lavar la membrana con TBST para eliminar las células. El bloqueo y la incubación con los anticuerpos primario y secundario se realizó en BSA al 1% disuelta en TBST. La inmunodetección se realizó de igual modo que en el subapartado 6.3.

6.5 Anticuerpos utilizados

- Anticuerpo primario monoclonal frente al epítipo HA de Roche (12CA5), dilución 1:4.000.
- Anticuerpo primario monoclonal frente a la GFP de BD Living Colors (JL-8), dilución 1:3.000.
- Anticuerpo primario frente a la actina de Millipore (Clone C4), dilución 1:10.000.
- Anticuerpo primario frente a la tubulina de Sigma (B-5-1-2), dilución 1:10.000.
- Anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con peroxidasa, de BioRad, dilución 1:10.000.
- Anti-p38 de Cell Signalling Technology, dilución 1:2.500. Para detectar la activación de Sty1.
- Anticuerpo policlonal anti-p44/42 MAP kinase Thr202/Tyr 204 de Cell Signalling Technology, dilución 1:2.500. Para detectar la activación de Spm1/Pmk1.
- Anti-pGad8, dilución 1:2.000 (cedido por K. Shiozaki).
- Anti-Gad8, dilución 1:2.000 (cedido por K. Shiozaki).
- Anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de conejo, conjugado con peroxidasa, dilución 1:10.000.

7. Análisis de la activación de Sty1 y de Pmk1

Mediante el siguiente protocolo se analizó el nivel de fosforilación de las quinasas Sty1 y Pmk1.

Las células se incubaron en medio rico YES durante toda la noche a 28°C, al día siguiente se inocularon de nuevo en YES para obtener un cultivo en crecimiento logarítmico; alcanzada la fase de crecimiento logarítmico se realizó el tratamiento con los distintos agentes químicos, a las concentraciones y temperaturas indicadas en cada experimento.

Las células se recogieron mediante filtración de 30 ml de cultivo y posterior lavado de los filtros con 1 ml de PBS frío (en un tubo de 1,5 ml durante unos segundos de centrifugación a 4°C). Los precipitados obtenidos se congelaron con hielo seco y, una vez finalizada la recogida de todas las muestras, se descongelaron en hielo.

Las células se lisaron añadiendo 5 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, IGEPAL 0,1% y glicerol 10%, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina/pepstatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM) por densidad óptica junto con bolitas de vidrio y aplicando dos pulsos de dieciséis segundos cada uno a una velocidad de 5,5 m/s en *Fast Prep*. La eliminación de paredes, restos celulares y bolitas de vidrio se realizó mediante una centrifugación de dos minutos y medio a 13.200 rpm en frío. La valoración de la cantidad de proteína se realizó como se ha descrito en el subapartado 6.1.

Una cantidad igual a 1 mg de proteína en 200 µl de tampón de extracción se incubó durante dos horas en presencia de 60 µl de bolitas de níquel (Ni-NTA His-Bind Resin®, Novagen®, Millipore), en rotación y en frío. Las construcciones cuentan con seis histidinas unidas a Sty1 o a Pmk1; las histidinas se unen a las bolitas de níquel permitiendo así la purificación de las quinasas. Pasadas las dos horas, las bolitas se lavaron tres veces con Tris-HCl 1 M pH 8 y se añadieron 60 µl de 2x SB. Las muestras se hirvieron durante cinco minutos para favorecer su desnaturalización y la disociación de las proteínas de las bolitas.

Se cargaron 30 μ l de cada muestra en dos geles al 10% de acrilamida, de modo que uno de los geles fue empleado para detectar la cantidad de quinasa fosforilada y el otro para detectar la cantidad total. Todo el procedimiento de electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección se realizó según lo descrito en subapartados anteriores. La detección de la cantidad fosforilada se realizó bloqueando e incubando los anticuerpos en BSA al 3%, se evitó el uso de leche porque contiene fosfatasa que dificultan la visualización de la fosforilación.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anti-p38 para detectar la activación de Sty1.
- Anti-p44/42 MAP kinase Thr202/Tyr 204 para detectar la activación de Spm1/Pmk1.
- Anti-HA, para detectar la cantidad total de Sty1 o de Pmk1.
- Anticuerpo secundario de ratón conjugado con peroxidasa, para detectar la HA.
- Anticuerpo de conejo, para detectar la activación.

8. Análisis de la actividad TORC2

Se determinó la actividad TORC2 mediante la visualización de la cantidad de la quinasa Gad8 fosforilada.

Las células se incubaron durante toda la noche a 28°C y al día siguiente se mantuvieron en crecimiento logarítmico hasta iniciar el experimento. Las condiciones a las que se realizó cada experimento se recogen en la sección de Resultados de esta memoria.

Las células se recogieron mediante centrifugación y se lavaron con TCA al 20%. Se centrifugaron y los precipitados se resuspendieron en 20 μ l de TCA al 20% y se congelaron a -20°C.

Los extractos celulares se obtuvieron lisando las células con bolitas de vidrio en *Fast Prep*, para lo que se aplicaron tres pulsos de quince segundos cada uno a una velocidad de 5,5 m/s. Los extractos así obtenidos se mezclaron con 400 μ l de TCA al 5% y se centrifugaron durante diez minutos a 3.000 rpm,

en frío. El pH ácido del TCA provoca la precipitación de las proteínas, por este motivo se eliminó el sobrenadante y se realizó la disolución del precipitado en un tampón con SDS 2% y Tris base 200 mM, esa disolución se hirvió durante cinco minutos. Los restos no solubles se eliminaron por centrifugación de las muestras a 13.000 rpm durante dos minutos. La valoración de la cantidad de proteína presente en los sobrenadantes se realizó mediante el método de Bradford.

Los extractos se igualaron a la misma concentración de proteínas y se diluyeron a la mitad con 2x SB. La electroforesis se realizó en dos geles de acrilamida al 10%, cargando 10 µg de proteína en cada uno, según lo descrito en el subapartado 6.2. La electrotransferencia e inmunodetección se hizo como en subapartados anteriores. Los anticuerpos utilizados, disueltos en leche al 3%, se detallan a continuación.

Anticuerpos utilizados: anti-pGad8, dilución 1:2.000; anti-Gad8, dilución 1:2.000 y anti-conejo, dilución 1:10.000. Los anticuerpos anti-Gad8 han sido cedidos por el laboratorio del Dr. Shiozaki.

9. Técnicas microscópicas

9.1 Microscopía de campo claro y de contraste de fases

La observación de células en campo claro o en contraste de fases se realizó tomando muestras de cultivos líquidos o de placa, el microscopio utilizado fue un Leica DM RXS.

9.2 Microscopía de fluorescencia

La observación de muestras fluorescentes se realizó gracias a la utilización de filtros adecuados que permiten el paso de la luz ultravioleta de una determinada luz de onda.

9.2.1 Fluorescencia directa con proteínas de fusión

Las proteínas de interés se fusionaron con distintas proteínas fluorescentes que permiten su visualización microscópica sin necesidad de utilizar inmunofluorescencia.

El marcador más utilizado en este trabajo fue la proteína verde fluorescente (GFP). La GFP es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria* que posee la capacidad de emitir luz verde al ser excitada con luz de longitud de onda de 488 nm. Esta proteína se puede expresar de forma heteróloga en células procariotas y eucariotas y permite la detección de la expresión y la localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para usar este sistema es necesario fusionar la secuencia de ADN de interés en fase con la secuencia que codifica esta proteína. La variante utilizada en este trabajo se denomina EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), una versión más brillante que la original que se excita a 488 nm y que emite luz de 507 nm.

También se emplearon variantes de la GFP, con otros espectros de emisión, como son: CFP (cian) e YFP (amarillo). CFP se excita a 433 nm y emite a 475 nm, mientras que YFP se excita con una longitud de onda de 513 nm y emite a 527 nm.

9.2.2 Tinción con Hoechst 33258

Este colorante tiñe de manera específica los núcleos celulares al unirse a las zonas del ADN de doble cadena que presentan un alto contenido en A-T. Además, tiñe de modo inespecífico la pared y el septo celular, porque, a pesar de ser un colorante muy soluble, las células de la levadura de fisión no son muy permeables a su entrada y algunas moléculas del colorante quedan atrapadas. Emite luz de longitud de onda de 461 nm (azul) al ser excitada con longitud de onda de 352 nm.

La tinción con este colorante se realizó con 1 ml de cultivo lavado en agua y “resuspendido” en 20 μ l de Hoechst 33258 a 50 μ g/ml. Tras cinco minutos de contacto con el colorante las células se lavaron con agua y se procedió a su visualización en un microscopio Leica DM RXS.

9.3 Microscopía electrónica

La microscopía electrónica se realizó con células fijadas en glutaraldehído (TAAB), teñidas con permanganato potásico al 2% (Panreac), deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol y embebidas en resinas Spurr (TAAB). El tratamiento posterior de las muestras y su visualización fue realizado por el servicio Nucleus de la Universidad de Salamanca.

9.4 Microscopios y equipos utilizados

- **Leica DM RXS:** se trata de un microscopio de epifluorescencia con una cámara digital Leica Qsensys y un programa informático denominado Qfish.
- **Personal DeltaVision (Applied Precision):** es un equipo dotado con un microscopio invertido Olympus IX-70, una cámara CoolSNAP HQ2 (Photometrics) y un *software* denominado SoftWorx ResolveD. Permite la realización de planos celulares.
- **Tecnai Spirit Twin 120 kV:** es un microscopio electrónico de transmisión perteneciente al servicio Nucleus de la Universidad de Salamanca.

10. Análisis bioinformático de los datos

Las secuencias de ADN y de proteínas, el alineamiento de estas secuencias y los mapas de restricción se visualizaron con los programas: Chromas, DNASTar, ClustalW, BLAST y ExPaSY.

El tratamiento de las imágenes se hizo con ImageJ y Photoshop. La cuantificación de las bandas se realizó con ImageJ. Para la deconvolución, técnica que mediante el uso de algoritmos permite la mejora de la resolución de las imágenes, se usó el *software* SoftWorx.

11. Bases de datos utilizadas

La información sobre genes y proteínas de *S. pombe* se obtuvo de la base de datos [http:// www.pombe.org](http://www.pombe.org).

La bibliografía se consiguió en la base de datos PubMed.

Introducción Antecedentes y objetivo Resultados Discusión
Conclusiones Materiales y Métodos Anexo

Tabla SI Principales cepas empleadas en este trabajo.

Número HVP	Genotipo	Procedencia
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Stratagene
<i>S. pombe</i>		
4	<i>pmp1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
30	<i>leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección laboratorio
54	<i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección laboratorio
241	<i>cfr1::his3⁺ leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	Colección laboratorio
264	<i>cfr1::his3⁺ leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Colección laboratorio
1443	<i>pmk1::LEU2 leu1-32 ura4Δ18 h⁻</i>	P. Pérez
1732	<i>sty1::HA:6His:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁺</i>	M. Gacto
1733	<i>pmk1::HA:6His:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁺</i>	M. Gacto
1734	<i>pmk1::ura4⁺ pmk1-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	M. Gacto
2177	<i>sty1::ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁺</i>	Colección laboratorio
2288	<i>wis1DD leu1-32 h⁻</i>	P. Pérez
2759	<i>sur4mcherry:NAT sec24-GFP:ura4⁺ cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Colección laboratorio
2761	<i>sur4-mcherry:NAT sec24-GFP:ura4⁺ h[?]</i>	Colección laboratorio
2840	<i>sty1::NAT h[?]</i>	Colección laboratorio
3119	<i>tts1-GFP:ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁺</i>	S. Oliferenko
3164	<i>ire1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁹⁰</i>	P. Pérez
3165	<i>gpt1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
3229	<i>gas2-GFP:KAN leu1-32 h⁻</i>	C. Vázquez
3236	<i>gas2-GFP:KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Colección laboratorio
3286	<i>ire1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 h⁻</i>	Colección laboratorio
3320	<i>cfr1::his3⁺ gpt1::KAN h[?]</i>	Este trabajo
3322	<i>ire1::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Colección laboratorio
3406	<i>ire1::NAT h⁺</i>	Colección laboratorio

3443	<i>ire1::NAT cfr1::his3⁺ leu1-32 ura4-Δ18 h⁻</i>	Colección laboratorio
3453	<i>pmk1::LEU2 cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Colección laboratorio
3490	<i>apm1::ura leu1-32 his3-Δ1 h⁻</i>	Colección laboratorio
3505	<i>his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 /bip1-GFP_{ADEL}:leu1⁺ h⁻</i>	Colección laboratorio
3506	<i>cfr1::his3⁺ ura4-Δ18 ade6 /bip1-GFP_{ADEL}:leu1⁺ h⁻</i>	Colección laboratorio
3515	<i>spm1::NAT leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	J. Cansado
3522	<i>gas2::KAN leu1-32 h⁻</i>	C. Vázquez
3544	<i>his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 /bip1-HA_{ADEL}:leu1⁺ h⁻</i>	Colección laboratorio
3545	<i>cfr1::his3⁺ura4-Δ18 ade6 /bip1-HA_{ADEL}:leu1⁺ h⁻</i>	Colección laboratorio
3573	<i>cfr1::his3⁺ gas2::KAN h[?]</i>	Este trabajo
3619	<i>mtl2::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Y. Sánchez
3620	<i>wsc1::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	Y. Sánchez
3621	<i>mtl2-GFP:ura4⁺ h⁻</i>	Y. Sánchez
3642	<i>wsc1-GFP:ura4⁺ h[?]</i>	Y. Sánchez
3699	<i>apm1::ura4⁺ cfr1::his3⁺ h⁻</i>	Colección laboratorio
3797	<i>cfr1::his3⁺ pmk1:HA:6His:ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
3817	<i>cfr1::his3⁺ tts1-GFP:leu1⁺ h[?]</i>	Este trabajo
3818	<i>wsc1::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
3819	<i>mtl2::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
3835	<i>his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 /P_{nda2}⁺:gas2-GFP:T_{nda2}⁺:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
3836	<i>ire1::KAN ura4-Δ18 ade6 /P_{nda2}⁺:gas2-GFP:T_{nda2}⁺:leu1⁺ h⁹⁰</i>	Este trabajo
3837	<i>cfr1::his3⁺ ura4-Δ18 ade6 /P_{nda2}⁺:gas2-GFP:T_{nda2}⁺:leu1⁺ h⁻</i>	Este trabajo
3928	<i>gga21::KAN leu1-32 ura4-Δ18 h⁺</i>	P. Pérez
3929	<i>gga22::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
3958	<i>tup11::ura4⁺ tup12::ura4⁺ cta3::ura4⁺ h[?]</i>	S. Whitehall
3994	<i>gga21::KAN gga22::KAN h[?]</i>	Colección laboratorio
4069	<i>cch1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	P. Pérez
4070	<i>ura4:pKK2+pCDRE-GFP: ura4⁺ his3⁺ h⁺</i>	P. Pérez
4074	<i>gga21::KAN gga22::KAN cfr1::his3⁺</i>	Colección laboratorio
4076	<i>gga22::KAN cfr1::his3 h⁻</i>	Colección laboratorio
4080	<i>gga21::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Colección laboratorio

4081	<i>his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6/pREP3Xppb1+ h⁻</i>	Este trabajo*
4082	<i>his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 / pREP 3Xppb1ΔCT h⁻</i>	Este trabajo*
4083	<i>cfr1::his3⁺ ura4-Δ18 ade6 pREP 3Xppb1+ h⁻</i>	Este trabajo*
4084	<i>cfr1::his3⁺ ura4-Δ18 ade6 / pREP 3Xppb1ΔCT h⁻</i>	Este trabajo*
4100	<i>cfr1::his3 ura4:pKK2+pCDRE-GFP: ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4174	<i>yam8::ura4⁺ leu1-32 ade6 h⁺</i>	Y. Sánchez
4175	<i>sty1::ura4⁺ cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4176	<i>yam8::ura4⁺ cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4178	<i>cch1::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4224	<i>ppb1::NAT leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁻</i>	P. Pérez
4225	<i>cnb1::NAT leu1-32 ura4-Δ18 h⁺</i>	P. Pérez
4272	<i>cfr1::his3⁺ sty1HA:6His:ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4438	<i>leu1⁺:nmt1⁺:cta3-YFP cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4484	<i>cnb1::NAT cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4485	<i>ppb1::NAT cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4498	<i>mtl2::KAN pmk1-HA:6His:ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4578	<i>cfr1::his3⁺ mtl2::KAN pmk1:HA:6His:ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4600	<i>cfr1::his mtl2-GFP:ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4601	<i>cfr1::his3⁺ wsc1-GFP:ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4698	<i>trk2::ura4⁺ h⁺</i>	Este trabajo
4728	<i>CFP-atg8:leu1⁺ h⁻</i>	Y. Sánchez
4729	<i>rgf1::his3⁺ rgf1-GFP:leu1⁺ h⁻</i>	Y. Sánchez
4732	<i>tor2-51:ura4⁺ h⁺</i>	S. Moreno
4733	<i>tor2-51:ura4⁺ h⁻</i>	S. Moreno
4734	<i>tor1::KAN h⁻</i>	S. Moreno
4754	<i>rgf1::his3⁺ bch1::NAT rgf1-GFP:leu1⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4755	<i>CFP-atg8:leu1⁺ cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4757	<i>ryh1::KAN leu1-32 h⁻</i>	K. Shiozaki
4758	<i>FLAG-ryh1Q70L leu1-32 h⁻</i>	K. Shiozaki
4763	<i>tor1::KAN bch1::NAT h[?]</i>	Este trabajo
4764	<i>tor2-51:ura4⁺ bch1::NAT h[?]</i>	Este trabajo
4786	<i>FLAG-Ryh1Q70L bch1::NAT h[?]</i>	Este trabajo
4796	<i>ryh1::KAN bch1::NAT h[?]</i>	Este trabajo
4797	<i>ppk32::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
4798	<i>ppk32::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4799	<i>apm1::ura4⁺ pmk1:HA:6His:ura4⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4801	<i>sea4::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
4802	<i>sea4::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo

4803	<i>sea2::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
4804	<i>sea2::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4813	<i>ryh1::KAN GFP-ryh1:leu1⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4828	<i>npr2::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	Pilar Pérez
4829	<i>npr2::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4830	<i>sea3::KAN⁺ leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h⁺</i>	P. Pérez
4831	<i>sea3::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4846	<i>trk2::ura cfr1::his3⁺ h⁺</i>	Este trabajo
4855	<i>tup11::ura4⁺ tup12::ura4⁺ cta3::ura4⁺ bch1::NAT h[?]</i>	Este trabajo
4893	<i>cfr1::his3⁺ ryh1::KAN GFP-ryh1:leu1⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4894	<i>cta3-YFP:leu1⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4896	<i>pmp1::KAN cfr1::his3⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4947	<i>pmk1::ura4⁺ bch1::NAT pmk1-GFP:leu1⁺ h[?]</i>	Este trabajo
4956	<i>ura4-Δ18 ade6 his3⁺ /pREP3Xrho1G15V h[?]</i>	Este trabajo**
4957	<i>cfr1::his3⁺ /pREP3Xrho1G15V h[?]</i>	Este trabajo
4958	<i>wis1DD:ura4⁺ bch1::KAN h[?]</i>	Este trabajo

- * Plásmidos cedidos por P. Pérez.
- ** Plásmido cedido por Y. Sánchez.

Para descubrir genes que presentan interacción con los genes del exómero (*cfr1⁺* y *bch1⁺*) se realizó un tipo de rastreo genético denominado SGA que se describe a continuación.

El rastreo genético de tipo SGA

SGA son las iniciales de *Synthetic Genetic Array*. Este tipo de rastreo permite conocer redes de interacciones génicas. Para realizar el rastreo se parte de una colección de mutantes, en este caso se partió de la colección de los mutantes viables de *Schizosaccharomyces pombe* de Bioneer en la que se había realizado el reemplazamiento de cada gen por el gen de resistencia a kanamicina. La colección de mutantes se cruza con la cepa problema, que presenta un gen deletado y reemplazado por el de resistencia a nourseotricina.

Procedimiento

La cepa problema se inoculó en diez placas de medio SPA (fosfato de potasio 7,3 mM, glucosa 55,5 mM y agar) con la ayuda de un replicador. Sobre cada una de las pequeñas colonias de la cepa problema se inocularon las cepas de la colección, también con ayuda del replicador. Las placas de SPA con los cruces se incubaron a 25°C durante tres días. Pasado ese tiempo se incubaron en una estufa de 42°C para permitir la eliminación de las células diploides. Después de otros tres días se pasaron las células desde las placas de SPA a placas de YES, que se incubaron a 28°C para permitir la germinación de las esporas. Una vez hubieron germinado las esporas se pasaron las colonias a placas de YES con geneticina y al cabo de tres días se pasaron de estas a placas de YES con geneticina y nourseotricina para permitir el crecimiento exclusivo de los mutantes dobles.

Interpretación de los resultados

Se comparó el crecimiento de las colonias inoculadas en las placas con los dos antibióticos con las colonias respectivas de las placas de YES con geneticina. De cada una de las colonias se midió la circularidad y también su diámetro, mediante análisis ocular.

Si el diámetro de la colonia mutante doble (YES con geneticina y con nourseotricina) es igual que el del parental de la colección (YES con geneticina) significa que no existe interacción génica entre ambos genes (el gen problema y el gen correspondiente de la colección). Si la colonia del mutante doble es menor que la del parental es sintético enfermo y existe interacción génica negativa; si no crece nada es sintético letal y también muestra interacción génica negativa. Por último, si el mutante doble crece mejor que la cepa parental significa que suprime el fenotipo y que existe interacción génica positiva.

Resultados del SGA con la cepa problema *bch1::NAT*

El rastreo genético se realizó por duplicado. Los genes con los que se obtuvo interacción son los siguientes (en negrita los genes que dieron interacción en ambos duplicados):

atg16⁺, **atg4⁺**, *atg14⁺*, **atg1802⁺**, *atg17⁺*, *atg13⁺*, *mug179⁺*, *atg7⁺*, *atg12⁺*, *atg20⁺*, *spbc713.07c⁺*, **vps13⁺**, **vps3⁺**, *vps28⁺*, *vps16⁺*, **vps36⁺**, *aps3⁺*, *vac7⁺*, *isp6⁺*, *spcc584.13⁺*, *vps8⁺*, *kap123⁺*, *erv14⁺*, *xpa1⁺*, *ste4⁺*, *spbpj4664.05⁺*, *spac26f1.08c⁺*, *spbc1604.03c⁺*, *spac1b3.08⁺*, *fex1⁺*, *btf3⁺*, *can1⁺*, *mam4⁺*, *rbd2⁺*, *aat1⁺*, *gos1⁺*, *did4⁺*, *sft1⁺*, *sxa1⁺*, *bob1⁺*, *cho1⁺*, *cho2⁺*, *pmr1⁺*, *syj2⁺*, **get1⁺**, *sif3⁺*, *mug180⁺*, *arf6⁺*, *sbh1⁺*, *gyp51⁺*, *fkbp39⁺*, *syj1⁺*, *spac11d3.18c⁺*, *spbc577.11⁺*, *spbc3e7.09⁺*, **cul3⁺**, *knd1⁺*, *mf1⁺*, *spbc1861.07⁺*, *nta1⁺*, *mug30⁺*, **ubp9⁺**, *dma1⁺*, *pib1⁺*, *btb2⁺*, *rpf2⁺*, *spac12b10.01c⁺*, *sea3⁺*, *sea4⁺*, *ubp16⁺*, *rrp2⁺*, *hrd3⁺*, *spac23a1.07⁺*, **urm1⁺**, **bgl2⁺**, *spcc757.12⁺*, *mde2⁺*, *vrp1⁺*, *gfh1⁺*, **lsb5⁺**, *pk11⁺*, *spbc1289.14⁺*, **mug33⁺**, *mug132⁺*, *mug81⁺*, *mug116⁺*, *mug30⁺*, *mug103⁺*, *crs1⁺*, *mug142⁺*, *mug37⁺*, *mug180⁺*, **iph1⁺**, *mug51⁺*, *mug65⁺*, *mug161⁺*, *ral2⁺*, *gyp3⁺*, *rho3⁺*, *guf1⁺*, *rga9⁺*, *spac9.07c⁺*, *spbc215.01⁺*, *spcc584.03c⁺*, *mei3⁺*, **byr1⁺**, *dsk1⁺*, *gsk3⁺*, *spo4⁺*, *ppk26⁺*, *ppk8⁺*, *ppk9⁺*, *csk1⁺*, *ypa1⁺*, *pho1⁺*, *sds23⁺*, *ptn1⁺*,

spbp8b7.31+, *pyp1+*, ***sds21+***, *spac24b11.07c+*, *scs7+*, *sut1+*, ***oaa1+***, *gal1+*, *spbc17g9.12c+*, *spbc18e5.08+*, *coq6+*, *sno1+*, ***urk1+***, *rmt3+*, *nit1+*, *spbp10d8.02c+*, *glt1+*, *mpg2+*, *ppm1+*, *itr1+*, *spbc1271.07c+*, *ura1+*, *spbc119.03+*, *spcc23b6.01c+*, *spo9+*, *sdh1+*, *acb1+*, *ntp1+*, *spac18b11.09c+*, *dap1+*, *lys3+*, *car2+*, *spbc1347.09+*, *spacunk4.15+*, ***efm6+***, *set6+*, *ssr4+*, *rxt2+*, *hip1+*, *pst2+*, *nhp6+*, *hat1+*, *set3+*, *png2+*, *hif2+*, *hht2+*, ***mst2+***, *clr2+*, *sir2+*, ***ptf2+***, *swd2+*, *rep2+*, ***spac1327.01c+***, *rep1+*, *thi5+*, *adn1+*, *mbx1+*, *gaf1+*, *arb1+*, *elp5+*, ***spr1+***, ***ker1+***, *reg1+*, *trm1+*, *pdc1+*, *sep11+*, *spbc25d12.06+*, *caf1+*, *pab2+*, *ssr3+*, *nrp1+*, *ath1+*, *exo2+*, *csx1+*, *rsm1+*, *spac1527.03+*, *ski2+*, ***rtc3+***, *def1+*, *tma20+*, *asc1+*, *trs401+*, *pth2+*, *upf3+*, ***spac458.02c+***, *afg1+*, *spbc27b12.14+*, *pex3+*, *pex6+*, *spac14c4.01c+*, *pet801+*, *atp12+*, *cyt1+*, *spbc1921.04c+*, *spbp7e8.02+*, *spbc11b10.08+*, *srx1+*, *spbc25b2.10+*, *cid2+*, *pth1+*, *thi2+*, ***mba1+***, *she9+*, *spac25b8.18+*, *spcc737.05+*, *hry1+*, *rpp202+*, *rps2802+*, *rpl1101+*, *rpl4102+*, *rpl3202+*, *rpl2002+*, *rps2201+*, *rpl1102+*, *rpl2801+*, *rps3002+*, *rpp201+*, *rps2502+*, *rpl1701+*, *rpl902+*, *rpl803+*, *rpl501+*, *rpl1002+*, *rpl3601+*, *rpl1603+*, *rps401+*, *rpp102+*, *rps001+*, *pol4+*, *rad26+*, *hht3+*, *oga1+*, *spac694.02+*, *cds1+*, *npr2+*, *rpb9+*, *rrp2+*, *rhp55+*, *rad1+*, *tsn1+*, *chp1+*, *meu1+*, *sgo2+*, *fan1+*, ***atl1+***, *spbc887.02+*, *bsu1+*, *ist2+*, *mnr2+*, *grp2+*, *spcc74.04+*, *cch1+*, *osh3+*, *ctr4+*, *spbc3b8.08+*, *csb3+*, *spac8e11.05c+*, *ate1+*, *nde1+*, ***raf2+***, ***trk1+***, *spac27e2.03c+*, *sif3+*, *atp14+*, *ubc15+*, *rhp7+*, ***xrc4+***, *spac959.06c+*, *spbc428.15*, ***spbc21c3.15c+*** y *hri1+*.

Se seleccionaron genes de interés entre todos ellos. Las 39 cepas con cada uno de esos genes delecionados se volvieron a cruzar con la cepa *bch1::NAT*. Los mutantes dobles se inocularon en placas de distintos medios (YES y YES + KCl) y a distintas temperaturas para:

- 1) Confirmar los resultados del rastreo.
- 2) Determinar si existe interacción génica en presencia de estrés térmico.
- 3) Determinar si existe interacción génica en presencia de estrés iónico a 32°C.

- 1) Las interacciones encontradas con los siguientes genes a 28°C (la temperatura a la que se realizó el rastreo) eran resultado de falsos positivos: *hri1+*, *erv14+* y *bob1+*.

2) La interacción con los siguientes genes parecía ser del tipo sintético letal (no se logró que el mutante doble creciera a ninguna temperatura): *sbh1⁺*, *cul3⁺*, *ubp9⁺*, *vps36⁺* y *ptn1⁺*. El problema de algunos se debía a fallos en la conjugación, ya que los mutantes dobles se lograron obtener mediante transformación con la construcción *bch1::NAT* siendo, por tanto, un falso resultado la letalidad sintética con estos genes.

Se encontró interacción génica en presencia de estrés térmico (37°C) con los siguientes genes: *syj2⁺*, *fkbp39⁺*, *spbc3b8.08⁺*, *vps3⁺*, *gyp51⁺*, *atg4⁺*, *atg16⁺*, *oga1⁺*, *sds21⁺*, *sds23⁺*, *rho3⁺*, *gyp3⁺*, *syj1⁺*, *csb3⁺*, *sea3⁺*, *rga9⁺*, *sft1⁺*, *did4⁺*, *itr1⁺*, *gos1⁺*, *guf1⁺*, *vrp1⁺*, *get1⁺*, *lsb5⁺*, *pmr1⁺*, *sea4⁺*, *arf6⁺* y *cho2⁺*.

3) Se encontró interacción génica negativa en presencia de KCl con los siguientes genes: *syj2⁺?*, *erv14⁺?*, *rho3⁺*, *sds23⁺*. Con interrogante aquellos genes con los que solo se vio interacción en presencia de KCl en una de las dos repeticiones del experimento.

Se vio interacción génica positiva en presencia de KCl con los siguientes genes: *sbh1⁺*, *atg16⁺?*, *sds21⁺*, *rga9⁺*, *syj1⁺?*, *cul3⁺* y *vps36⁺*. Con interrogante los genes con los que solo se vio interacción en presencia de KCl en una de las dos repeticiones del experimento.

Resultados del SGA con la cepa problema *cfr1::NAT*

El rastreo genético se realizó por duplicado. Los genes con los que se obtuvo interacción son los siguientes (en negrita los genes que dieron interacción en ambas ocasiones):

atg17⁺, *atg1803⁺*, *spbc713.07c⁺*, *fsc1⁺*, *zip2⁺*, ***vps68⁺***, ***coy1⁺***, *gyp51⁺*, *grp1⁺*, ***mug33⁺***, *mpd1⁺*, *spac7d4.12c⁺*, *tre1⁺*, *fsv1⁺*, *gim4⁺*, ***spac3h5.08c⁺***, *tvp15⁺*, *spac6g10.06⁺*, *sea3⁺*, ***cul3⁺***, ***ubc14⁺***, ***ubp9⁺***, *hrd1⁺*, ***dsc2⁺***, *spbc56f2.03⁺*, *mug67⁺*, *cnt6⁺*, ***spac9.07c⁺***, ***cnt5⁺***, ***ivn1⁺***, ***ppk9⁺***, *sck2⁺*, ***nrk1⁺***, *ckb1⁺*, ***byr1⁺***, ***ppk31⁺***, *ado1⁺*, ***spac16c9.01c⁺***, *lkh1⁺*, *pho4⁺*, ***sds21⁺***, ***ptn1⁺***, *spacunk4.15⁺*, *ppp16⁺*, ***efm6⁺***, *spbc30d10.14⁺*, *pdcc201⁺*, *spac823.09c⁺*, *spap11e10.01⁺*, ***spcc16c4.10⁺***, ***spbc12c2.03c⁺***, ***tdh1⁺***, *coq3⁺*, *mtx2⁺*, ***met16⁺***, ***lys1⁺***, ***iph1⁺***, ***utr4⁺***, ***gcd1⁺***, *gti1⁺*, *mnl1⁺*, *spac977.12⁺*, *ser3⁺*, *spc2⁺*, ***clr2⁺***, ***raf2⁺***, ***sir2⁺***, *clr3⁺*, *swd2⁺*,

arp42⁺, swi6⁺, hip1⁺, mug183⁺, mst2⁺, hif2⁺, spbc1773.12⁺, bud20⁺, klf1⁺, gsf1⁺, spbc1773.16c⁺, reb1⁺, asc1⁺, ski3⁺, upf3⁺, wbp4⁺, dre4⁺, spac2g11.04⁺, cip1⁺, spac458.02c⁺, cxr1⁺, spac1527.03⁺, tim13⁺, mba1⁺, spac25b8.18⁺, rpl3001⁺, rps1801⁺, rpl102⁺, rpl2002⁺, mprl39⁺, mis20⁺, spr1⁺, swi3⁺, sgo2⁺, dbi2⁺, rhp7⁺, bqt1⁺, ada2⁺, pku80⁺, oga1⁺, rap1⁺, pef1⁺, rhp55⁺, spac11d3.18c⁺, spbc1683.03c⁺, spac1b3.15c⁺, spbpb10d8.05c⁺, pcl1⁺, pet3⁺, elo1⁺, eis1⁺, bzz1⁺, gtp1⁺, byr3⁺, dph5⁺, pth4⁺, gir2⁺, vac7⁺, nup61⁺, tht1⁺, spbc2a9.02⁺, urk1⁺, spac6g10.10c⁺, slf1⁺, ahk1⁺, tam5⁺, gde1⁺, spac1705.02⁺, dhp5⁺, spac4f10.17⁺, ilv1⁺, pop3⁺, mtx2⁺, pcl1⁺, spac4a8.02c⁺ y spac11d3.01c⁺.

En este caso no se realizaron comprobaciones posteriores para eliminar falsos positivos o para analizar interacción en condiciones de estrés.

A continuación se muestra un listado de las proteínas cuyos genes aparecieron por duplicado, con indicación de su función y con qué gen del exómero dieron interacción. **Tabla SII**

Proteína	Producto. Fuente: Pubmed	Bch1/Cfr1/Ambos
Atg16	Autophagy associated protein	Bch1
Atg4	Atg8 deconjugator	Bch1
Atg1802	Autophagy associated WD repeat protein	Bch1
Vps13	Chorein homolog Vps13a	Bch1
Vps3	CORVET complex subunit, GTPase regulator	Bch1
Vps36	ESCRT II complex subunit	Bch1
Get1	GET complex (ER membrane insertion) subunit	Bch1
Urm1	Ubiquitin-like protein modifier	Bch1
Bgl2	Glucan beta-glucosidase	Bch1
Lsb5	Actin cortical patch component	Bch1
Oaa1	Mitochondrial acylpyruvase	Bch1
Urk1	Uridine kinase/uracil phosphoribosyltransferase	Bch1
Ptf2	Mst2 histone acetyltransferase acetyltransferase complex subunit	Bch1
Spac1327.01c	Transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type	Bch1
Ker1	DNA-directed RNA polymerase I complex subunit	Bch1
Rtc3	SBDS family protein Rtc3	Bch1
Atl1	Alkyltransferase-like protein	Bch1

Trk1	Plasma membrane potassium ion transmembrane transporter	Bch1
Xrc4	XRCC4 nonhomologous end joining factor	Bch1
Spbc21c3.15c	Aldehyde dehydrogenase	Bch1
Vps68	Vacuolar sorting protein	Cfr1
Coy1	CASP family protein involved in Golgi vesicle transport	Cfr1
Spac3h5.08c	WD repeat protein, human WDR44 family	Cfr1
Ubc14	Ubiquitin conjugating enzyme E2 for HECT-type and RBR family E3 Ub ligases	Cfr1
Dsc2	Golgi Dsc E3 ligase complex subunit	Cfr1
Spac9.07c	GTPase Obg family, involved in cytoplasmic translation Rbg1	Cfr1
Cnt5	Centaurin	Cfr1
Ivn1	CDC50 domain protein, phospholipid-translocating ATPase subunit	Cfr1
Ppk9	Serine/threonine protein kinase	Cfr1
Nrk1	Nicotinamide riboside kinase	Cfr1
Ppk31	Serine/threonine protein kinase	Cfr1
Spac16c9.01c	Ribokinase-like, unknown specificity	Cfr1
Ptn1	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate3-phosphatase	Cfr1
Spcc16c4.10	6-phosphogluconolactonase	Cfr1
Spbc12c2.03c	Methionine synthase reductase	Cfr1
Tdh1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cfr1
Met16	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	Cfr1
Lys1	Amino adipate-semialdehyde dehydrogenase	Cfr1
Utr4	Methionine salvage haloacid dehalogenase-like hydrolase	Cfr1
Gcd1	Glucose dehydrogenase	Cfr1
Clr2	Chromatin silencing protein	Cfr1
Sir2	Sirtuin family histone deacetylase	Cfr1
Hip1	Hira protein, histone chaperone	Cfr1
Mug183	Histone chaperone Rtt106-like	Cfr1
Hif2	Set3 complex subunit	Cfr1
Klf1	Transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type	Cfr1
Gsf1	Transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type	Cfr1
Asc1	Cofactor for cytoplasmic methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases	Cfr1
Upf3	Up-frameshift suppressor 3 family protein	Cfr1
Spac25b8.18	Mitochondrial thioredoxin-related protein	Cfr1
Swi3	Replication fork protection complex subunit	Cfr1

Pku80	Ku domain protein	Cfr1
Oga1	Stm1 homolog	Cfr1
Rap1	Telomere binding protein	Cfr1
Pef1	Pho85/PhoA-like cyclin-dependent kinase	Cfr1
Rhp55	RecA family ATPase	Cfr1
Spac11d3.18c	Carboxylic acid transmembrane transporter	Cfr1
Spbpb10d8.05c	Transmembrane transporter	Cfr1
Bzz1	F-BAR domain protein	Cfr1
Pth4	Mitochondrial translation release factor	Cfr1
Vac7	Vac7 ortholog	Cfr1
Spac6g10.10c	Human mmtag2 ortholog, implicated in splicing	Cfr1
Spac4a8.02c	Conserved protein, UPF0047 family	Cfr1
Cul3	Cullin 3	Ambos
Ubp9	Ubiquitin C-terminal hydrolase	Ambos
Mug33	Tea1-interacting protein involved in exocytosis	Ambos
Iph1	Insulinase pombe homologue 1	Ambos
Byr1	MAP kinase kinase	Ambos
Sds21	Serine/threonine protein phosphatase PP1 subfamily	Ambos
Spr1	DNA-protein crosslink removal protease	Ambos
Efm6	Elongation factor EF-1 alpha (eEF1A) lysine 390 methylase	Ambos
Mst2	Histone acetyltransferase	Ambos
Spac458.02c	mRNP complex	Ambos
Mba1	Mitochondrial membrane-associated ribosome receptor	Ambos
Raf2	CLRC ubiquitin ligase complex subunit	Ambos

En resumen, a pesar del alto grado de falsos resultados que pueden obtenerse en este tipo de rastreos, se pudo encontrar varios genes que muestran interacción con uno u otro gen del exómero, entre estos genes se encuentran codificantes de quinasas, fosfatasa, factores de transcripción, elementos del tráfico intracelular, proteínas relacionadas con la respuesta TOR y con las síntesis de fosfolípidos. Existen doce genes que dieron interacción por duplicado y con ambos genes, entre estos genes se encuentran los de fosfatasa, los de genes relacionados con ubiquitinación y numerosos genes implicados en modificaciones del ADN o de las histonas.

Los genes que presentan interacción génica con *bch1+* en presencia de cloruro de potasio están relacionados con procesos de endocitosis y con el

complejo AP-1 (con el que el exómero presenta interacción) como es *rho3+*; codifican fosfatasa (*sds21+* y *sds23+*); son GAP de Rho (*rga9+*); están relacionados con procesos de tráfico (*vps36+* y *erv14+*), con modificaciones del inositol y procesos de endocitosis (*syj1+* y *syj2+*), con autofagia y procesos de ubiquitinación (*atg16+* y *cul3+*) o con el translocón del retículo endoplasmático (*sbh1+*). Es decir, son genes relacionados con procesos en los que se ha visto que podría estar implicado el exómero (este trabajo y trabajos anteriores del laboratorio. Hoya et al., 2017).

Se analizó en más detalle el crecimiento en placas de KCl y MgCl₂ de los mutantes de delección de los genes que se indican en la **Tabla SIII**. Los resultados se muestran en **figura SI**.

Tabla SIII Funciones de las proteínas cuya sensibilidad a cloruro potásico y a cloruro magnésico se analizó

Proteína	Producto
Spbc887.02	CIC chloride channel
Msy1	MS calcium ion channel protein
Fex1	Plasma membrane fluoride efflux channel
Spac977.14c	Aldo/keto reductase, predicted calcium channel regulator
Spac1635.01	Mitochondrial outer membrane voltage-dependent anion-selective channel
Spbc32f12.12c	Golgi membrane protein involved in vesicle-mediated transport
Spbbp10d8.04c	Transmembrane transporter
Spbbp10d8.05c	Transmembrane transporter
Spbbp10d8.06c	Transmembrane transporter

Spac24h6.13	DUF221 family protein implicated in Golgi to plasma membrane transport
Rsn1	Golgi to plasma membrane transport protein Rsn1
Spac6f6.04c	Transmembrane transporter
Spac977.17	MIP water channel

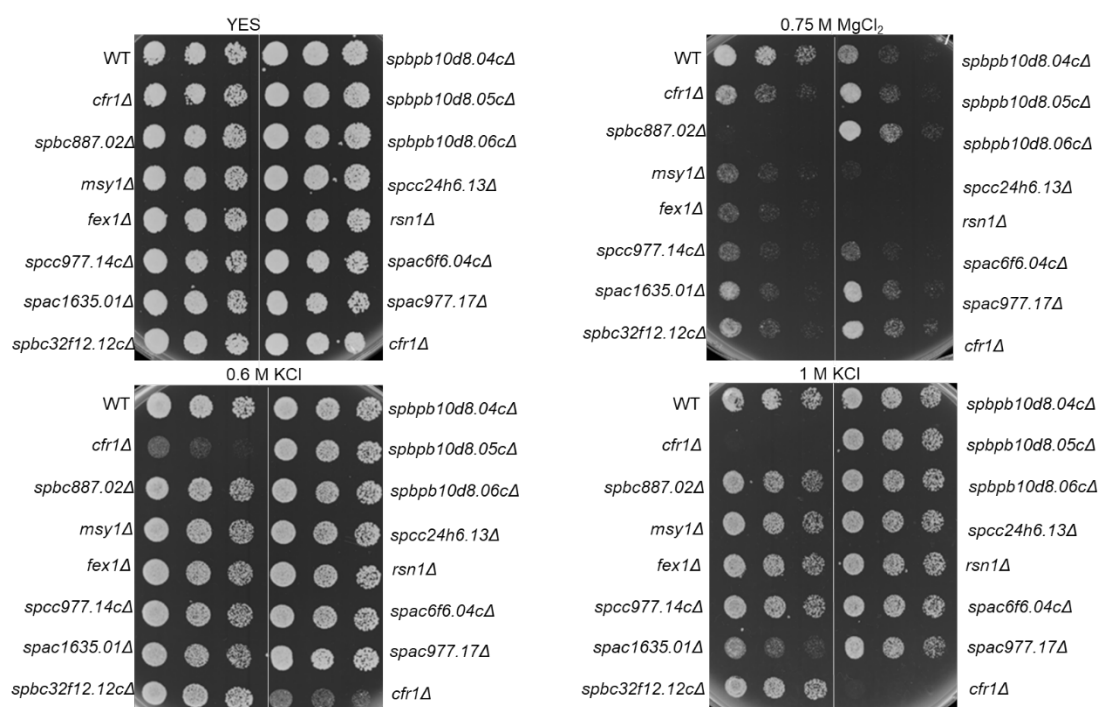


Figura SI. Crecimiento de mutantes de canales iónicos y de mutantes relacionados con el tráfico intracelular en presencia de cloruro potásico y cloruro de magnesio. Se inocularon tres diluciones seriadas 1:4 de cada cepa. Las placas se incubaron durante dos días a 32°C.

Introducción Antecedentes y objetivo Resultados Discusión
*Conclusiones Materiales y Métodos Anexo **Bibliografía***

- Algret, R., J. Fernandez-Martinez, Y. Shi, S.J. Kim, R. Pellarin, P. Cimermancic, E. Cochet, A. Sali, B.T. Chait, M.P. Rout, and S. Dokudovskaya. 2014. Molecular architecture and function of the SEA complex, a modulator of the TORC1 pathway. *Mol Cell Proteomics*. 13:2855-70.
- Ali, R., C.L. Brett, S. Mukherjee, and R. Rao. 2004. Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J Biol Chem*. 279:4498-506.
- Anton, C., B. Zanolari, I. Arcones, C. Wang, J.M. Mulet, A. Spang, and C. Roncero. 2017. Involvement of the exomer complex in the polarized transport of Ena1 required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations. *Mol Biol Cell*. 28:3672-3685.
- Anton, C., J. Valdez Taubas, and C. Roncero. 2018. The Functional Specialization of Exomer as a Cargo Adaptor During the Evolution of Fungi. *Genetics*.
- Arasada, R., and T.D. Pollard. 2014. Contractile ring stability in *S. pombe* depends on F-BAR protein Cdc15p and Bgs1p transport from the Golgi complex. *Cell Rep*. 8:1533-44.
- Arasada, R., and T.D. Pollard. 2015. A role for F-BAR protein Rga7p during cytokinesis in *S. pombe*. *J Cell Sci*. 128:2259-68.
- Arellano, M., A. Duran, and P. Perez. 1996. Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *Embo J*. 15:4584-91.
- Arellano, M., H. Cartagena-Lirola, M.A. Nasser Hajibagheri, A. Duran, and M. Henar Valdivieso. 2000. Proper ascospore maturation requires the *chs1⁺* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol*. 35:79-89.
- 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.
- Ayscough, K., N.M. Hajibagheri, R. Watson, and G. Warren. 1993. Stacking of Golgi cisternae in *Schizosaccharomyces pombe* requires intact microtubules. *J Cell Sci*. 106 (Pt 4):1227-37.
- Bahler, J., J.Q. Wu, M.S. Longtine, N.G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A.B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J.R. Pringle. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 14:943-51.
- Baker, K., S. Kirkham, L. Halova, J. Atkin, M. Franz-Wachtel, D. Cogley, K. Krug, B. Macek, D.P. Mulvihill, and J. Petersen. 2016. TOR complex 2 localises to the cytokinetic actomyosin ring and controls the fidelity of cytokinesis. *J Cell Sci*. 129:2613-24.
- Balcells, L., R. Martin, M.C. Ruiz, N. Gomez, J. Ramos, and J. Arino. 1998. The Pzh1 protein phosphatase and the Spm1 protein kinase are involved in the regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase in fission yeast. *FEBS Lett*. 435:241-4.
- Banuelos, M.G., D.E. Moreno, D.K. Olson, Q. Nguyen, F. Ricarte, C.R. Aguilera-Sandoval, and E. Gharakhanian. 2010. Genomic analysis of severe hypersensitivity to hygromycin B reveals linkage to vacuolar defects and new vacuolar gene functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 56:121-37.
- Barba, G., T. Soto, M. Madrid, A. Nunez, J. Vicente, M. Gacto, and J. Cansado. 2008. Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal*. 20:748-57.

- Barfield, R.M., J.C. Fromme, and R. Schekman. 2009. The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell*. 20:4985-96.
- Bassett, D.E., Jr., M.S. Boguski, and P. Hieter. 1996. Yeast genes and human disease. *Nature*. 379:589-90.
- Bateman, A., and C. Chothia. 1996. Fibronectin type III domains in yeast detected by a hidden Markov model. *Curr Biol*. 6:1544-7.
- Behnia, R., and S. Munro. 2005. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*. 438:597-604.
- Bicknell, A.A., A. Babour, C.M. Federovitch, and M. Niwa. 2007. A novel role in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. *J Cell Biol*. 177:1017-27.
- Blatch, G.L., and M. Lassle. 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*. 21:932-9.
- Boehm, M., and J.S. Bonifacino. 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell*. 12:2907-20.
- 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*. 72:248-54.
- Calero, F., N. Gomez, J. Arino, and J. Ramos. 2000. Trk1 and Trk2 define the major K(+) transport system in fission yeast. *J Bacteriol*. 182:394-9.
- Calero, F., and J. Ramos. 2003. K⁺ fluxes in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res*. 4:1-6.
- Calonge, T.M., K. Nakano, M. Arellano, R. Arai, S. Katayama, T. Toda, I. Mabuchi, and P. Perez. 2000. *Schizosaccharomyces pombe* Rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase Pck2p. *Mol Biol Cell*. 11:4393-401.
- Cansado, J., T. Soto, M. Gacto, and P. Perez. 2010. Rga4, a Rho-GAP from fission yeast: Finding specificity within promiscuity. *Commun Integr Biol*. 3:436-9.
- Carnahan, R.H., and K.L. Gould. 2003. The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol*. 162:851-62.
- Cartagena-Lirola, H., A. Duran, and M.H. Valdivieso. 2006. The *Schizosaccharomyces pombe cfr1⁺* gene participates in mating through a new pathway that is independent of *fus1⁺*. *Yeast*. 23:375-88.
- Codlin, S., and S.E. Mole. 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*. 122:1163-73.
- Cohen, A., M. Kupiec, and R. Weisman. 2014. Glucose activates TORC2-Gad8 protein via positive regulation of the cAMP/cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway and negative regulation of the Pmk1 protein-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 289:21727-37.
- Corbett, E.F., and M. Michalak. 2000. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci*. 25:307-11.
- Cortes, J.C., J. Ishiguro, A. Duran, and 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.

- Cortes, J.C., E. Carnero, J. Ishiguro, Y. Sanchez, A. Duran, and J.C. Ribas. 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.* 118:157-74.
- Cortes, J.C., M. Konomi, I.M. Martins, J. Munoz, M.B. Moreno, M. Osumi, A. Duran, and 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.
- Cortes, J.C., M. Sato, J. Munoz, M.B. Moreno, J.A. Clemente-Ramos, M. Ramos, H. Okada, M. Osumi, A. Duran, and J.C. Ribas. 2012. Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol.* 198:637-56.
- Cortes, J.C., M. Ramos, M. Osumi, P. Perez, and J.C. Ribas. 2016. Fission yeast septation. *Commun Integr Biol.* 9:e1189045.
- Cruz, S., S. Munoz, E. Manjon, P. Garcia, and Y. Sanchez. 2013. The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen.* 2:778-94.
- Chappell, T.G., and G. Warren. 1989. A galactosyltransferase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol.* 109:2693-702.
- Chatfield-Reed, K., L. Vachon, E.J. Kwon, and G. Chua. 2016. Conserved and Diverged Functions of the Calcineurin-Activated Prz1 Transcription Factor in Fission Yeast. *Genetics.* 202:1365-75.
- Chen, Y., D.C. Gershlick, S.Y. Park, and J.S. Bonifacino. 2017. Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers. *J Cell Biol.* 216:4141-4151.
- Cheng, H., R. Sugiura, W. Wu, M. Fujita, Y. Lu, S.O. Sio, R. Kawai, K. Takegawa, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2002. Role of the Rab GTP-binding protein Ypt3 in the fission yeast exocytic pathway and its connection to calcineurin function. *Mol Biol Cell.* 13:2963-76.
- Daboussi, L., G. Costaguta, and G.S. Payne. 2012. Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol.* 14:239-48.
- Day, K.J., L.A. Staehelin, and B.S. Glick. 2013. A three-stage model of Golgi structure and function. *Histochem Cell Biol.* 140:239-49.
- Day, K.J., J.C. Casler, and B.S. Glick. 2018. Budding Yeast Has a Minimal Endomembrane System. *Dev Cell.* 44:56-72 e4.
- de Medina-Redondo, M., Y. Arnaiz-Pita, C. Clavaud, T. Fontaine, F. del Rey, J.P. Latge, and C.R. Vazquez de Aldana. 2010. beta(1,3)-glucanosyl-transferase activity is essential for cell wall integrity and viability of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One.* 5:e14046.
- Degols, G., K. Shiozaki, and P. Russell. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 16:2870-7.
- Dekker, N., D. Speijer, C.H. Grun, M. van den Berg, A. de Haan, and F. Hochstenbach. 2004. Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell.* 15:3903-14.
- Demeter, J., and S. Sazer. 1998. Imp2, a new component of the actin ring in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol.* 143:415-27.

- Deng, L., R. Sugiura, M. Takeuchi, M. Suzuki, H. Ebina, T. Takami, A. Koike, S. Iba, and T. Kuno. 2006. Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca²⁺-dependent pathways in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 17:4790-800.
- Doi, A., A. Kita, Y. Kanda, T. Uno, K. Asami, R. Satoh, K. Nakano, and R. Sugiura. 2015. Geranylgeranyltransferase Cwg2-Rho4/Rho5 module is implicated in the Pmk1 MAP kinase-mediated cell wall integrity pathway in fission yeast. *Genes Cells*. 20:310-23.
- Dong, X.P., X. Wang, and H. Xu. 2010. TRP channels of intracellular membranes. *J Neurochem*. 113:313-28.
- Du, W., L. Halova, S. Kirkham, J. Atkin, and J. Petersen. 2012. TORC2 and the AGC kinase Gad8 regulate phosphorylation of the ribosomal protein S6 in fission yeast. *Biol Open*. 1:884-8.
- Duenas-Santero, E., A.B. Martin-Cuadrado, T. Fontaine, J.P. Latge, F. del Rey, and C. Vazquez de Aldana. 2010. Characterization of glycoside hydrolase family 5 proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 9:1650-60.
- Ejzykowicz, D.E., K.M. Locken, F.J. Ruiz, S.P. Manandhar, D.K. Olson, and E. Gharakhanian. 2016. Hygromycin B hypersensitive (hhy) mutants implicate an intact trans-Golgi and late endosome interface in efficient Tor1 vacuolar localization and TORC1 function. *Curr Genet*. 63:531-551.
- Fanchiotti, S., F. Fernandez, C. D'Alessio, and A.J. Parodi. 1998. The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biol*. 143:625-35.
- Fang, Y., R. Sugiura, Y. Ma, T. Yada-Matsushima, H. Umeno, and T. Kuno. 2008. Cation diffusion facilitator Cis4 is implicated in Golgi membrane trafficking via regulating zinc homeostasis in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 19:1295-303.
- Farquhar, M.G., Hauri, H. P. 1997. Protein sorting and vesicular traffic in the Golgi apparatus.63-119.
- Ford, M.G., I.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J. Praefcke, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*. 419:361-6.
- Franco, A., T. Soto, R. Martin-Garcia, M. Madrid, B. Vazquez-Marin, J. Vicente-Soler, P.M. Coll, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2017. Distinct functional relevance of dynamic GTPase cysteine methylation in fission yeast. *Sci Rep*. 7:6057.
- Gaits, F., G. Degols, K. Shiozaki, and P. Russell. 1998. Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev*. 12:1464-73.
- Garcia, I., V. Tajadura, V. Martin, T. Toda, and Y. Sanchez. 2006. Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol*. 59:836-53.
- Garcia, P., V. Tajadura, and Y. Sanchez. 2009. The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 20:721-31.
- Gemmill, T.R., and R.B. Trimble. 1999. *Schizosaccharomyces pombe* produces novel Gal0-2Man1-3 O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*. 9:507-15.

- Glick, B.S. 2013. Integrated self-organization of transitional ER and early Golgi compartments. *Bioessays*. 36:129-33.
- Goffeau, A., B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S.G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science*. 274:546, 563-7.
- Golub, E.I. 1988. 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 16:1641.
- Greenall, A., A.P. Hadcroft, P. Malakasi, N. Jones, B.A. Morgan, C.S. Hoffman, and S.K. Whitehall. 2002. Role of fission yeast Tup1-like repressors and Prr1 transcription factor in response to salt stress. *Mol Biol Cell*. 13:2977-89.
- Grun, C.H., F. Hochstenbach, B.M. Humbel, A.J. Verkleij, J.H. Sietsma, F.M. Klis, J.P. Kamerling, and J.F. Vliegthart. 2005. The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology*. 15:245-57.
- Guo, Y., D.W. Sirkis, and R. Schekman. 2014. Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 30:169-206.
- Gustavsson, M., G. Barmark, J. Larsson, E. Muren, and H. Ronne. 2008. Functional genomics of monensin sensitivity in yeast: implications for post-Golgi traffic and vacuolar H⁺-ATPase function. *Mol Genet Genomics*. 280:233-48.
- Guydosh, N.R., P. Kimmig, P. Walter, and R. Green. 2017. Regulated Ire1-dependent mRNA decay requires no-go mRNA degradation to maintain endoplasmic reticulum homeostasis in *S. pombe*. *Elife*. 6.
- Halova, L., W. Du, S. Kirkham, D.L. Smith, and J. Petersen. 2013. Phosphorylation of the TOR ATP binding domain by AGC kinase constitutes a novel mode of TOR inhibition. *J Cell Biol*. 203:595-604.
- Harlow, D.E. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. *CSHL Press*.
- Hartmuth, S., and J. Petersen. 2009. Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *J Cell Sci*. 122:1737-46.
- Hatano, T., S. Morigasaki, H. Tatebe, K. Ikeda, and K. Shiozaki. 2015. Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle*. 14:848-56.
- Hayashi, T., M. Hatanaka, K. Nagao, Y. Nakaseko, J. Kanoh, A. Kokubu, M. Ebe, and M. Yanagida. 2007. Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes Cells*. 12:1357-70.
- He, Y., R. Sugiura, Y. Ma, A. Kita, L. Deng, K. Takegawa, K. Matsuoka, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2006. Genetic and functional interaction between Ryh1 and Ypt3: two Rab GTPases that function in *S. pombe* secretory pathway. *Genes Cells*. 11:207-21.
- Hirayama, S., R. Sugiura, Y. Lu, T. Maeda, K. Kawagishi, M. Yokoyama, H. Tohda, Y. Giga-Hama, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2003. Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *J Biol Chem*. 278:18078-84.
- Hochstenbach, F., F.M. Klis, H. van den Ende, E. van Donselaar, P.J. Peters, and R.D. Klausner. 1998. Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:9161-6.

- Horisberger, M., M. Vonlanthen, and J. Rosset. 1978. Localization of alpha-galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol.* 119:107-11.
- Hoya, M., F. Yanguas, S. Moro, C. Prescianotto-Baschong, C. Doncel, N. de Leon, M.A. Curto, A. Spang, and M.H. Valdivieso. 2017. Traffic Through the Trans-Golgi Network and the Endosomal System Requires Collaboration Between Exomer and Clathrin Adaptors in Fission Yeast. *Genetics.* 205:673-690.
- Humbel, B.M., M. Konomi, T. Takagi, N. Kamasawa, S.A. Ishijima, and M. Osumi. 2001. In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 18:433-44.
- Huyton, T., P.A. Bates, X. Zhang, M.J. Sternberg, and P.S. Freemont. 2000. The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutat Res.* 460:319-32.
- Ikeda, K., S. Morigasaki, H. Tatebe, F. Tamanoi, and K. Shiozaki. 2008. Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle.* 7:358-64.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 153:163-8.
- Iwaki, T., A. Hosomi, S. Tokudomi, Y. Kusunoki, Y. Fujita, Y. Giga-Hama, N. Tanaka, and K. Takegawa. 2006. Vacuolar protein sorting receptor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology.* 152:1523-32.
- Jin, N., Y. Jin, and L.S. Weisman. 2017. Early protection to stress mediated by CDK-dependent PI3,5P2 signaling from the vacuole/lysosome. *J Cell Biol.* 216:2075-2090.
- Kabeche, R., M. Madrid, J. Cansado, and J.B. Moseley. 2015. Eisosomes Regulate Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P2) Cortical Clusters and Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Signaling upon Osmotic Stress. *J Biol Chem.* 290:25960-73.
- Katayama, S., D. Hirata, M. Arellano, P. Perez, and T. Toda. 1999. Fission yeast alpha-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.* 144:1173-86.
- Kawai, M., A. Nakashima, M. Ueno, T. Ushimaru, K. Aiba, H. Doi, and M. Uritani. 2001. Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr Genet.* 39:166-74.
- Keeney, J.B., and J.D. Boeke. 1994. Efficient targeted integration at leu1-32 and ura4-294 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* 136:849-56.
- Kimmig, P., M. Diaz, J. Zheng, C.C. Williams, A. Lang, T. Aragon, H. Li, and P. Walter. 2012. The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. *Elife.* 1:e00048.
- Kita, A., R. Sugiura, H. Shoji, Y. He, L. Deng, Y. Lu, S.O. Sio, K. Takegawa, M. Sakaue, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2004. Loss of Apm1, the micro1 subunit of the clathrin-associated adaptor-protein-1 complex, causes distinct phenotypes and synthetic lethality with calcineurin deletion in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 15:2920-31.
- Kita, A., C. Li, Y. Yu, N. Umeda, A. Doi, M. Yasuda, S. Ishiwata, A. Taga, Y. Horiuchi, and R. Sugiura. 2011. Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome trafficking through functional interaction with adaptin in Fission Yeast. *PLoS One.* 6:e16842.

- Kita, A., M. Higa, A. Doi, R. Satoh, and R. Sugiura. 2015. Imp2, the PSTPIP homolog in fission yeast, affects sensitivity to the immunosuppressant FK506 and membrane trafficking in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 457:273-9.
- Kovar, D.R., J.R. Kuhn, A.L. Tichy, and T.D. Pollard. 2003. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol.* 161:875-87.
- Kowalczyk, K.M., and J. Petersen. 2016. Fission Yeast SCYL1/2 Homologue Ppk32: A Novel Regulator of TOR Signalling That Governs Survival during Brefeldin A Induced Stress to Protein Trafficking. *PLoS Genet.* 12:e1006041.
- 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.
- Kushner, S.R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. *Elsevier, North Holland, Amsterdam.*
- Laplante, M., and D.M. Sabatini. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149:274-93.
- Lawrence, C.L., H. Maekawa, J.L. Worthington, W. Reiter, C.R. Wilkinson, and N. Jones. 2007. Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *J Biol Chem.* 282:5160-70.
- Leupold, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. Vol. 24. 381-480.
- Levine, T., and C. Rabouille. 2005. Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Curr Opin Cell Biol.* 17:362-8.
- Liu, J., X. Tang, H. Wang, and 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.
- Liu, J., X. Tang, H. Wang, S. Oliferenko, and M.K. Balasubramanian. 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, S., Y. Hou, W. Liu, C. Lu, W. Wang, and S. Sun. 2015. Components of the calcium-calceineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot Cell.* 14:324-34.
- Loewith, R., A. Hubberstey, and D. Young. 2000. Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 113 (Pt 1):153-60.
- Ma, Y., M. Takeuchi, R. Sugiura, S.O. Sio, and T. Kuno. 2009. Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. *Genes Cells.* 14:1015-28.
- Ma, Y., R. Sugiura, A. Koike, H. Ebina, S.O. Sio, and T. Kuno. 2011. Transient receptor potential (TRP) and Cch1-Yam8 channels play key roles in the regulation of cytoplasmic Ca²⁺ in fission yeast. *PLoS One.* 6:e22421.
- Madrid, M., T. Soto, H.K. Khong, A. Franco, J. Vicente, P. Perez, M. Gacto, and J. Cansado. 2006. Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 281:2033-43.

- Madrid, M., A. Nunez, T. Soto, J. Vicente-Soler, M. Gacto, and J. Cansado. 2007. Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol Biol Cell*. 18:4405-19.
- Madrid, M., R. Jimenez, L. Sanchez-Mir, T. Soto, A. Franco, J. Vicente-Soler, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2015. Multiple layers of regulation influence cell integrity control by the PKC ortholog Pck2 in fission yeast. *J Cell Sci*. 128:266-80.
- Madrid, M., B. Vazquez-Marin, A. Franco, T. Soto, J. Vicente-Soler, M. Gacto, and J. Cansado. 2016. Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Sci Rep*. 6:37515.
- 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.
- Martin-Cuadrado, A.B., E. Duenas, M. Sipiczki, C.R. Vazquez de Aldana, and F. del Rey. 2003. The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*. 116:1689-98.
- Martin-Cuadrado, A.B., J.L. Morrell, M. Konomi, H. An, C. Petit, M. Osumi, M. Balasubramanian, K.L. Gould, F. Del Rey, and C.R. de Aldana. 2005. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell*. 16:4867-81.
- Martin-Garcia, R., A. Duran, and M.H. Valdivieso. 2003. In *Schizosaccharomyces pombe* chs2p has no chitin synthase activity but is related to septum formation. *FEBS Lett*. 549:176-80.
- Martin-Garcia, R., and M.H. Valdivieso. 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*. 119:2768-79.
- Martin-Garcia, R., N. de Leon, M.R. Sharifmoghadam, M.A. Curto, M. Hoya, P. Bustos-Sanmamed, and M.H. Valdivieso. 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*. 68:2907-17.
- Martin-Garcia, R., P.M. Coll, and P. Perez. 2014. F-BAR domain protein Rga7 collaborates with Cdc15 and Imp2 to ensure proper cytokinesis in fission yeast. *J Cell Sci*. 127:4146-58.
- Martin, V., J.C. Ribas, E. Carnero, A. Duran, and Y. Sanchez. 2000. bgs2+, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol*. 38:308-21.
- Martin, V., B. Garcia, E. Carnero, A. Duran, and Y. Sanchez. 2003. Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 2:159-69.
- Matsuo, T., Y. Kubo, Y. Watanabe, and M. Yamamoto. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *Embo J*. 22:3073-83.
- McCollum, D., and K.L. Gould. 2001. Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell Biol*. 11:89-95.
- McLeod, M., M. Stein, and D. Beach. 1987. The product of the *mei3+* gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *Embo J*. 6:729-36.

- Millar, J.B., V. Buck, and M.G. Wilkinson. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* 9:2117-30.
- Mitchell, A.P. 2008. A VAST staging area for regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:7111-2.
- Mitchison, J.M., and P. Nurse. 1985. Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 75:357-76.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194:795-823.
- Motegi, F., M. Mishra, M.K. Balasubramanian, and I. Mabuchi. 2004. Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by Mid1 in fission yeast. *J Cell Biol.* 165:685-95.
- Mulvihill, D.P., S.R. Edwards, and J.S. Hyams. 2006. A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63:149-61.
- Munoz, J., J.C. Cortes, M. Sipiczki, M. Ramos, J.A. Clemente-Ramos, M.B. Moreno, I.M. Martins, P. Perez, and J.C. Ribas. 2013. Extracellular cell wall beta(1,3)glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J Cell Biol.* 203:265-82.
- Nakano, K., R. Arai, and I. Mabuchi. 1997. The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells.* 2:679-94.
- Neklesa, T.K., and R.W. Davis. 2009. A genome-wide screen for regulators of TORC1 in response to amino acid starvation reveals a conserved Npr2/3 complex. *PLoS Genet.* 5:e1000515.
- Nguyen, A.N., A. Lee, W. Place, and K. Shiozaki. 2000. Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol Biol Cell.* 11:1169-81.
- Nishikawa, T., H. Aiba, and T. Mizuno. 1999. The *cta3⁺* gene that encodes a cation-transporting P-type ATPase is induced by salt stress under control of the Wis1-Sty1 MAPKK-MAPK cascade in fission yeast. *FEBS Lett.* 455:183-7.
- Ogden, J.E., and P.A. Fantes. 1986. Isolation of a novel type of mutation in the mitotic control of *Schizosaccharomyces pombe* whose phenotypic expression is dependent on the genetic background and nutritional environment. *Curr Genet.* 10:509-14.
- Osumi, M. 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* 29:207-33.
- Otsubo, Y., and M. Yamamoto. 2008. TOR signaling in fission yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 43:277-83.
- Otsubo, Y., A. Nakashima, M. Yamamoto, and A. Yamashita. 2017. TORC1-Dependent Phosphorylation Targets in Fission Yeast. *Biomolecules.* 7.
- Owen, D.J., B.M. Collins, and P.R. Evans. 2004. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:153-91.
- Paczkowski, J.E., B.C. Richardson, A.M. Strassner, and J.C. Fromme. 2012. The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *Embo J.* 31:4191-203.

- Paczkowski, J.E., and J.C. Fromme. 2014. Structural basis for membrane binding and remodeling by the exomer secretory vesicle cargo adaptor. *Dev Cell*. 30:610-24.
- Paczkowski, J.E., B.C. Richardson, and J.C. Fromme. 2015. Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol*. 25:408-16.
- Paoletti, A., and F. Chang. 2000. Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 11:2757-73.
- Papanikou, E., and B.S. Glick. 2014. Golgi compartmentation and identity. *Curr Opin Cell Biol*. 29:74-81.
- Perez, P., and J. Cansado. 2010. Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci*. 11:680-92.
- Perez, P., J.C. Cortes, R. Martin-Garcia, and J.C. Ribas. 2016. Overview of fission yeast septation. *Cell Microbiol*. 18:1201-7.
- Petersen, J., and P. Nurse. 2007. TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol*. 9:1263-72.
- Petkova, M.I., Pujol-Carrion, N and de la Torre-Ruzi, M. A. 2010. Signal flow between CWI/TOR and CWI/RAS in budding yeast under conditions of oxidative stress and glucose starvation. *Commun Integr Biol*. 3:555-7.
- Petkova, M.I., Sundaram, V, Martinez, T. and Ruiz de Villegas, P. and Angeles de la Torre-Ruzi, M. 2013. Mtl1 protein plays a role in quiescence through TOR downregulation and through the activation of Bcy1 inhibitory function, both effects promote chronological life span extension. *Yeast*.
- Pinar, M., P.M. Coll, S.A. Rincon, and P. Perez. 2008. *Schizosaccharomyces pombe* Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 19:1727-38.
- Promlek, T., Y. Ishiwata-Kimata, M. Shido, M. Sakuramoto, K. Kohno, and Y. Kimata. 2011. Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Mol Biol Cell*. 22:3520-32.
- Ren, L., A.H. Willet, R.H. Roberts-Galbraith, N.A. McDonald, A. Feoktistova, J.S. Chen, H. Huang, R. Guillen, C. Boone, S.S. Sidhu, J.R. Beckley, and K.L. Gould. 2015. The Cdc15 and Imp2 SH3 domains cooperatively scaffold a network of proteins that redundantly ensure efficient cell division in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 26:256-69.
- Ritz, A.M., M. Trautwein, F. Grassinger, and A. Spang. 2014. The prion-like domain in the exomer-dependent cargo Pin2 serves as a trans-Golgi retention motif. *Cell Rep*. 7:249-60.
- Roberts-Galbraith, R.H., J.S. Chen, J. Wang, and K.L. Gould. 2009. The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *J Cell Biol*. 184:113-27.
- Rockenbach, U., A.M. Ritz, C. Sacristan, C. Roncero, and A. Spang. 2012. The complex interactions of Chs5p, the ChAPs, and the cargo Chs3p. *Mol Biol Cell*. 23:4402-15.
- Sambrook, J.R., D. W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. *CSHL Press*.

- Sanchatjate, S., and R. Schekman. 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*. 17:4157-66.
- Sanchez-Mir, L., A. Franco, M. Madrid, J. Vicente-Soler, M.A. Villar-Tajadura, T. Soto, P. Perez, M. Gacto, and J. Cansado. 2012. Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast. *J Biol Chem*. 287:26038-51.
- Sanchez-Mir, L., A. Franco, R. Martin-Garcia, M. Madrid, J. Vicente-Soler, T. Soto, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2014a. 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*. 34:2745-59.
- Sanchez-Mir, L., T. Soto, A. Franco, M. Madrid, R.A. Viana, J. Vicente, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2014b. Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS One*. 9:e88020.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Santos, B., A. Duran, and M.H. Valdivieso. 1997. CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 17:2485-96.
- Santos, B., and M. Snyder. 1997. Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol*. 136:95-110.
- Satoh, R., T. Morita, H. Takada, A. Kita, S. Ishiwata, A. Doi, K. Hagihara, A. Taga, Y. Matsumura, H. Tohda, and R. Sugiura. 2009. Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 20:2473-85.
- Scott, C.C., and J. Gruenberg. 2010. Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *Bioessays*. 33:103-10.
- Scott, C.C., F. Vacca, and J. Gruenberg. 2014. Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol*. 31:2-10.
- Scrimale, T., L. Didone, K.L. de Mesy Bentley, and D.J. Krysan. 2009. The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 20:164-75.
- Schlecht, U., M. Miranda, S. Suresh, R.W. Davis, and R.P. St Onge. 2012. Multiplex assay for condition-dependent changes in protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:9213-8.
- Sengar, A.S., N.A. Markley, N.J. Marini, and D. Young. 1997. Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*. 17:3508-19.
- Sharifmoghadam, M.R., and M.H. Valdivieso. 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*. 284:11070-9.
- Sharifmoghadam, M.R., M.A. Curto, M. Hoya, N. de Leon, R. Martin-Garcia, C. Doncel, and M.H. Valdivieso. 2012. The integrity of the cytokinesis machinery under stress conditions requires the glucan synthase Bgs1p and its regulator Cfh3p. *PLoS One*. 7:e42726.

- Shieh, J.C., H. Martin, and J.B. Millar. 1998a. Evidence for a novel MAPKKK-independent pathway controlling the stress activated Sty1/Spc1 MAP kinase in fission yeast. *J Cell Sci.* 111 (Pt 18):2799-807.
- Shieh, J.C., M.G. Wilkinson, and J.B. Millar. 1998b. The Win1 mitotic regulator is a component of the fission yeast stress-activated Sty1 MAPK pathway. *Mol Biol Cell.* 9:311-22.
- Shimobayashi, M., and M.N. Hall. 2014. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:155-62.
- Shiozaki, K., and P. Russell. 1995. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *Embo J.* 14:492-502.
- Shiozaki, K., M. Shiozaki, and P. Russell. 1997. Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell.* 8:409-19.
- Shiozaki, K., M. Shiozaki, and P. Russell. 1998. Heat stress activates fission yeast Spc1/Styl MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 9:1339-49.
- Simanis, V. 2003. Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J Cell Sci.* 116:4263-75.
- Sohrmann, M., C. Fankhauser, C. Brodbeck, and V. Simanis. 1996. The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev.* 10:2707-19.
- Soto, T., M.A. Villar-Tajadura, M. Madrid, J. Vicente, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2010. Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem.* 285:11516-25.
- Sugawara, T., M. Sato, T. Takagi, T. Kamasaki, N. Ohno, and M. Osumi. 2003. In situ localization of cell wall alpha-1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc (Tokyo).* 52:237-42.
- Sugiura, R., T. Toda, H. Shuntoh, M. Yanagida, and T. Kuno. 1998. *pmp1+*, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *Embo J.* 17:140-8.
- Sugiura, R., T. Toda, S. Dhut, H. Shuntoh, and T. Kuno. 1999. The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature.* 399:479-83.
- Sugiura, R., S.O. Sio, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2002. Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells.* 7:619-27.
- Sundaram, V., M.I. Petkova, N. Pujol-Carrion, J. Boada, and M.A. de la Torre-Ruiz. 2015. Tor1, Sch9 and PKA downregulation in quiescence rely on Mtl1 to preserve mitochondrial integrity and cell survival. *Mol Microbiol.* 97:93-109.
- Tajadura, V., B. Garcia, I. Garcia, P. Garcia, and Y. Sanchez. 2004. *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall beta-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J Cell Sci.* 117:6163-74.
- Takada, H., M. Nishimura, Y. Asayama, Y. Mannse, S. Ishiwata, A. Kita, A. Doi, A. Nishida, N. Kai, S. Moriuchi, H. Tohda, Y. Giga-Hama, T. Kuno, and R. Sugiura. 2007. Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 18:4794-802.

- Tanaka, N., Y. Fujita, S. Suzuki, M. Morishita, Y. Giga-Hama, C. Shimoda, and K. Takegawa. 2005. Characterization of O-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:813-20.
- Tarassov, K., V. Messier, C.R. Landry, S. Radinovic, M.M. Serna Molina, I. Shames, Y. Malitskaya, J. Vogel, H. Bussey, and S.W. Michnick. 2008. An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science.* 320:1465-70.
- Tatebe, H., S. Morigasaki, S. Murayama, C.T. Zeng, and K. Shiozaki. 2010. Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Curr Biol.* 20:1975-82.
- Toda, T., S. Dhut, G. Superti-Furga, Y. Gotoh, E. Nishida, R. Sugiura, and T. Kuno. 1996. The fission yeast *pmk1⁺* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol.* 16:6752-64.
- Trautwein, M., C. Schindler, R. Gauss, J. Dengjel, E. Hartmann, and A. Spang. 2006. Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *Embo J.* 25:943-54.
- Trimble, R.B., C. Lubowski, C.R. Hauer, 3rd, R. Stack, L. McNaughton, T.R. Gemmill, and S.A. Kumar. 2004. Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology.* 14:265-74.
- Valdivia, R.H., and R. Schekman. 2003. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10287-92.
- Vazquez, B., T. Soto, J.E. del Dedo, A. Franco, J. Vicente, E. Hidalgo, M. Gacto, J. Cansado, and M. Madrid. 2015. Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast. *Cell Signal.* 27:2534-42.
- Velivela, S.D., and P.M. Kane. 2018. Compensatory Internalization of Pma1 in V-ATPase Mutants in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Calcium- and Glucose-Sensitive Phosphatases. *Genetics.* 208:655-672.
- Viana, R.A., M. Pinar, T. Soto, P.M. Coll, J. Cansado, and P. Perez. 2013. Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics.* 195:421-32.
- Vilella, F., E. Herrero, J. Torres, and M.A. de la Torre-Ruiz. 2005. Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem.* 280:9149-59.
- Villar-Tajadura, M.A., P.M. Coll, M. Madrid, J. Cansado, B. Santos, and P. Perez. 2008. Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol Microbiol.* 70:867-81.
- Wang, C.W., S. Hamamoto, L. Orci, and R. Schekman. 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.* 174:973-83.
- Wang, H., X. Tang, and M.K. Balasubramanian. 2003. Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* 164:1323-31.

- Wang, S., and D.T. Ng. 2010. Evasion of endoplasmic reticulum surveillance makes Wsc1p an obligate substrate of Golgi quality control. *Mol Biol Cell*. 21:1153-65.
- Weisman, R., and M. Choder. 2001. The fission yeast TOR homolog, *tor1⁺*, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *J Biol Chem*. 276:7027-32.
- Weisman, R., I. Roitburg, M. Schonbrun, R. Harari, and M. Kupiec. 2007. Opposite effects of *tor1* and *tor2* on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics*. 175:1153-62.
- Wendland, B. 2002. Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:971-7.
- Wilkinson, M.G., M. Samuels, T. Takeda, W.M. Toone, J.C. Shieh, T. Toda, J.B. Millar, and N. Jones. 1996. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev*. 10:2289-301.
- Willer, T., M. Brandl, M. Sipiczki, and S. Strahl. 2005. Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol*. 57:156-70.
- Willet, A.H., N.A. McDonald, K.A. Bohnert, M.A. Baird, J.R. Allen, M.W. Davidson, and K.L. Gould. 2015. The F-BAR Cdc15 promotes contractile ring formation through the direct recruitment of the formin Cdc12. *J Cell Biol*. 208:391-9.
- Wood, V., R. Gwilliam, M.A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles, S. Baker, D. Basham, S. Bowman, K. Brooks, D. Brown, S. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, M. Collins, R. Connor, A. Cronin, P. Davis, T. Feltwell, A. Fraser, S. Gentles, A. Goble, N. Hamlin, D. Harris, J. Hidalgo, G. Hodgson, S. Holroyd, T. Hornsby, S. Howarth, E.J. Huckle, S. Hunt, K. Jagels, K. James, L. Jones, M. Jones, S. Leather, S. McDonald, J. McLean, P. Mooney, S. Moule, K. Mungall, L. Murphy, D. Niblett, C. Odell, K. Oliver, S. O'Neil, D. Pearson, M.A. Quail, E. Rabbinowitsch, K. Rutherford, S. Rutter, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, J. Skelton, M. Simmonds, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, R.G. Taylor, A. Tivey, S. Walsh, T. Warren, S. Whitehead, J. Woodward, G. Volckaert, R. Aert, J. Robben, B. Grymonprez, I. Weltjens, E. Vanstreels, M. Rieger, M. Schafer, S. Muller-Auer, C. Gabel, M. Fuchs, A. Dusterhoft, C. Fritzc, E. Holzer, D. Moestl, H. Hilbert, K. Borzym, I. Langer, A. Beck, H. Lehrach, R. Reinhardt, T.M. Pohl, P. Eger, W. Zimmermann, H. Wedler, R. Wambutt, B. Purnelle, A. Goffeau, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. 415:871-80.
- Wu, H., B.S. Ng, and G. Thibault. 2014. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep*. 34.
- Wu, J.Q., J.R. Kuhn, D.R. Kovar, and T.D. Pollard. 2003. Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell*. 5:723-34.
- Yoko-o, T., S.K. Roy, and Y. Jigami. 1998. Differences in in vivo acceptor specificity of two galactosyltransferases, the *gmh3⁺* and *gma12⁺* gene products from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem*. 257:630-7.
- Yoko-o, T., K. Tsukahara, T. Watanabe, N. Hata-Sugi, K. Yoshimatsu, T. Nagasu, and Y. Jigami. 2001. *Schizosaccharomyces pombe och1(+)* encodes alpha-1,6-mannosyltransferase that is involved in outer chain elongation of N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett*. 489:75-80.

- Yoshida, T., T. Toda, and M. Yanagida. 1994. A calcineurin-like gene *ppb1⁺* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J Cell Sci.* 107 (Pt 7):1725-35.
- Yu, Y., A. Kita, M. Udo, Y. Katayama, M. Shintani, K. Park, K. Hagihara, N. Umeda, and R. Sugiura. 2012. Sip1, a conserved AP-1 accessory protein, is important for Golgi/endosome trafficking in fission yeast. *PLoS One.* 7:e45324.
- Yu, Y., C. Li, A. Kita, Y. Katayama, K. Kubouchi, M. Udo, Y. Imanaka, S. Ueda, T. Masuko, and R. Sugiura. 2013. Sip1, an AP-1 accessory protein in fission yeast, is required for localization of Rho3 GTPase. *PLoS One.* 8:e68488.
- Zaitsevskaya-Carter, T., and J.A. Cooper. 1997. Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *Embo J.* 16:1318-31.
- Zhang, Y., R. Sugiura, Y. Lu, M. Asami, T. Maeda, T. Itoh, T. Takenawa, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2000. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. *J Biol Chem.* 275:35600-6.
- Zhang, Y., R. Liu, M. Ni, P. Gill, and A.S. Lee. 2010a. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem.* 285:15065-75.
- Zhang, Y., C.C. Tseng, Y.L. Tsai, X. Fu, R. Schiff, and A.S. Lee. 2013. Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocalization of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. *PLoS One.* 8:e80071.
- Zhang, Z., K. Kulkarni, S.J. Hanrahan, A.J. Thompson, and D. Barford. 2010b. The APC/C subunit Cdc16/Cut9 is a contiguous tetratricopeptide repeat superhelix with a homo-dimer interface similar to Cdc27. *Embo J.* 29:3733-44.
- Zhou, C., Y. Yang, and A.Y. Jong. 1990. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques.* 8:172-3.
- Zhou, X., Y. Ma, R. Sugiura, D. Kobayashi, M. Suzuki, L. Deng, and T. Kuno. 2010. MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)-dependent and -independent activation of Sty1 stress MAPK in fission yeast. *J Biol Chem.* 285:32818-23.
- Zimmermann, R., S. Eyrisch, M. Ahmad, and V. Helms. 2011. Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1808:912-24.

