

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de toxicidad de
lípidos antitumorales sintéticos
en *Saccharomyces cerevisiae***

Álvaro Cuesta Marbán

**Director de tesis:
Faustino Mollinedo García**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – CSIC**



Dr. **Faustino Mollinedo García**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y miembro del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria “**Mecanismo de acción de lípidos antitumorales sintéticos en *Saccharomyces cerevisiae***” presentado por **Álvaro Cuesta Marbán**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 21 de Junio de 2013.

Firmado: Dr. Faustino Mollinedo García

*Para mis padres y Cris,
que me trajeron hasta aquí.*

Índice de contenidos

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Abreviaturas y acrónimos | 13 |
|---------------------------------|-----------|

| | |
|---------------------|-----------|
| Introducción | 17 |
|---------------------|-----------|

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Lípidos antitumorales | 17 |
|------------------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------|-----------|
| Historia | 17 |
|-----------------------|-----------|

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Estructura y propiedades | 19 |
|---------------------------------------|-----------|

| | |
|----------------------------|----|
| ATLs de primera generación | 19 |
|----------------------------|----|

| | |
|----------------------------|----|
| ATLs de segunda generación | 19 |
|----------------------------|----|

| | |
|---|----|
| Determinantes estructurales de la toxicidad | 19 |
|---|----|

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Mecanismo de acción | 21 |
|----------------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------|----|
| Propiedades generales | 21 |
|-----------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| Metabolismo lipídico | 22 |
|----------------------|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| Estrés en el retículo endoplásmico | 24 |
|------------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| Interferencia con rutas de señalización | 24 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Activación de la ruta extrínseca de la apoptosis | 26 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Múltiples mecanismos de acción están implicados en la toxicidad por ATLs | 26 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| La incorporación de ATLs es relevante para su selectividad | 28 |
|--|----|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Uso en clínica | 30 |
|-----------------------------|-----------|

| | |
|---|-----------|
| Procesos biológicos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de interés para el presente trabajo | 31 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| Transporte de aminofosfolípidos por flipasas | 32 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| Formación de microdominios de membrana <i>lipid raft</i> | 35 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| Tráfico vesicular en el <i>trans</i>-Golgi | 37 |
|---|-----------|

| | |
|--|----|
| Formación de vesículas recubiertas de clatrina | 39 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Las GAPs de ARF regulan su actividad y actúan de efectores | 40 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Requerimientos lipídicos del tráfico vesicular en el TGN | 41 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Vía secretora de la ATPasa de membrana Pma1 | 43 |
|---|----|

| | |
|---|-----------|
| Tráfico vesicular en los endosomas | 44 |
| Complejo ESCRT y formación del cuerpo multivesicular | 45 |
| Maduración de los endosomas | 47 |
| Reciclaje mediante transporte retrógrado | 50 |
| Mitocondria | 52 |
| Importancia de las mitocondrias para las células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 52 |
| Morfodinámica de las mitocondrias | 53 |
| Bioenergética mitocondrial | 55 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo para el estudio de fármacos | 56 |
| La colección de mutantes de delección | 57 |
| Mecanismo de acción de los ATLs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 60 |
| Objetivos | 63 |
| <hr/> | |
| Resultados | 65 |
| <hr/> | |
| Toxicidad de los lípidos antitumorales en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 67 |
| Escrutinio de mutantes resistentes y sensibles a ATLs | 74 |
| Realización del escrutinio de mutantes resistentes a edelfosina y miltefosina | 75 |
| Realización del escrutinio de mutantes sensibles a edelfosina | 77 |
| Análisis bioinformático de los genes identificados en los <i>screenings</i> | 78 |
| Análisis de los genes implicados en resistencia a edelfosina | 79 |
| Análisis de los genes implicados en sensibilidad a edelfosina | 81 |
| Análisis de los genes implicados en resistencia a miltefosina y comparación con el <i>screening</i> de resistencia a edelfosina | 82 |
| Mecanismos de incorporación de ATLs | 83 |
| Incorporación de ATLs mediante flipasas de membrana | 83 |
| Otros genes implicados en la incorporación de edelfosina | 86 |
| Localización subcelular de edelfosina | 86 |
| Implicación de la endocitosis en la incorporación, localización y mecanismo citotóxico de edelfosina | 89 |
| Implicación del transporte retrógrado en la incorporación, localización y mecanismo citotóxico de edelfosina | 91 |
| Localización subcelular de miltefosina | 92 |
| Disponibilidad de ergosterol y toxicidad por ATLs | 93 |
| Transporte endosomal y toxicidad de ATLs | 95 |
| Genes endosomales implicados en toxicidad de edelfosina | 95 |
| Mecanismos de transporte retrógrado | 96 |
| Mecanismos de formación de cuerpos multivesiculares | 97 |

| | |
|---|------------|
| Otros mecanismos de tráfico endosomal | 98 |
| Internalización de la H⁺-ATPasa Pma1 | 98 |
| Relevancia fisiológica de la internalización de Pma1 | 106 |
| Mecanismos celulares de internalización de Pma1 | 111 |
| Origen de la Pma1 internalizada | 115 |
| Mitocondria y toxicidad de ATLS | 118 |
| Papel de la fosforilación oxidativa en la respuesta a ATLS | 118 |
| Genes de la fosforilación oxidativa mitocondrial implicados en la toxicidad a edelfosina | 118 |
| Diferencias en la incidencia de la fosforilación oxidativa en la toxicidad de edelfosina y miltefosina | 119 |
| Resistencia a ATLS de células ρ^- | 122 |
| Influencia de la fuente de carbono en la toxicidad por ATLS | 125 |
| Estrés oxidativo durante el tratamiento con ATLS | 126 |
| Origen mitocondrial del estrés oxidativo | 129 |
| Naturaleza del estrés oxidativo y relevancia para la toxicidad | 129 |
| Intervención de la cadena de transporte de electrones en el estrés oxidativo | 133 |
| Fragmentación mitocondrial provocada por ATLS | 135 |
| Análisis del potencial de membrana mitocondrial durante el tratamiento con ATLS | 141 |
| Incorporación de DiOC ₆ (3) en controles sin tratar. Condiciones para el análisis de tratamientos con ATLS | 142 |
| Incorporación de DiOC ₆ (3) en células tratadas con edelfosina | 145 |
| Incorporación de DiOC ₆ (3) en células tratadas con miltefosina | 148 |
| Incorporación de DiOC ₆ (3) en células tratadas con perifosina | 149 |
| Otros fenotipos de células tratadas con ATLS | 152 |
| Estrés del retículo endoplásmico | 152 |
| Fragmentación vacuolar | 155 |
| Marcadores de apoptosis de levadura | 158 |
| Screening de sobreexpresión | 160 |
| Condiciones del <i>screening</i> | 160 |
| Identificación y análisis de los genes presentes en los plásmidos | 162 |
| Resistencia a ATLS por sobreexpresión de <i>AGE1</i> | 164 |
| Discusión | 167 |
| Genes que determinan la toxicidad a ATLS | 167 |
| Los genes fundamentales para la toxicidad por edelfosina participan en un número limitado de procesos celulares | 167 |

| | |
|--|------------|
| Un número reducido, de entre los mutantes resistentes a edelfosina o miltefosina, es resistente a ambos compuestos..... | 168 |
| Saccharomyces cerevisiae es un modelo para el estudio de los mecanismos moleculares de incorporación de ATLS..... | 169 |
| Los ATLS se incorporan a través de flipasas de membrana..... | 170 |
| Los ATLS son transportados desde la membrana plasmática al retículo endoplásmico y/o a la vacuola..... | 171 |
| AGP2 y DOC1 participan en la incorporación de edelfosina..... | 175 |
| Relevancia fisiológica de la internalización de edelfosina al retículo endoplásmico | 176 |
| Perspectivas del estudio de la incorporación de ATLS en células tumorales empleando la levadura como modelo..... | 178 |
| La internalización y degradación de Pma1 es un elemento crítico del mecanismo tóxico de edelfosina | 181 |
| La endocitosis es necesaria para el efecto tóxico de la edelfosina | 181 |
| Los ATLS provocan la internalización de Pma1p | 182 |
| La degradación de Pma1 es clave para la toxicidad de edelfosina | 183 |
| La internalización de Pma1 tiene lugar mediante tráfico vesicular a través del endosoma..... | 187 |
| Transporte retrógrado | 188 |
| La progresión por la vía endosomal degradativa, con el endosoma tardío como punto de no retorno, determina la toxicidad por edelfosina | 189 |
| Mutantes en genes de la vía endocítica presentan un mayor reciclaje a la membrana plasmática | 191 |
| Los ATLS se incorporan a los <i>lipid rafts</i> y alteran sus propiedades..... | 194 |
| La presencia de los ATLS en los <i>lipid rafts</i> desestabiliza la asociación de Pma1 con los microdominios..... | 197 |
| Un modelo hipotético de la internalización y degradación de Pma1 por edelfosina..... | 199 |
| Origen de la Pma1 internalizada | 201 |
| Mitocondria..... | 202 |
| El estrés oxidativo generado y su relevancia en la toxicidad es una diferencia fundamental entre los ATLS | 202 |
| Los ROS generados por edelfosina, pero no miltefosina, requieren de la mitocondria..... | 205 |
| Se desconoce la relevancia de la fragmentación mitocondrial inducida por ATLS para la toxicidad celular..... | 210 |

Materiales y métodos **215**

| | |
|--|------------|
| Condiciones generales | 215 |
| Cepas..... | 215 |
| Plásmidos..... | 216 |
| Medios y condiciones de cultivo..... | 216 |
| Compuestos químicos empleados..... | 217 |
| Instrumentos | 218 |
| Experimentos | 218 |
| Análisis de la toxicidad celular | 218 |
| Curvas de crecimiento | 218 |
| Réplica en medio sólido de diluciones seriadas | 219 |
| Ensayo clonogénico | 219 |
| Integridad de la membrana plasmática | 219 |
| Ciclo celular | 220 |
| Screenings genómicos | 220 |
| Screenings empleando la colección de mutantes de delección | 220 |
| Análisis bioinformático | 221 |
| Screening de sobreexpresión | 221 |
| Microscopía de fluorescencia | 225 |
| Observación de proteínas y marcadores fluorescentes | 225 |
| Tinción con quinacrina | 226 |
| Fraccionamiento celular y western blot | 226 |
| Incorporación de [³H]-edelfosina | 228 |
| Función mitocondrial | 228 |
| Citometría de flujo – ROS y Ψ_m | 228 |
| Tratamiento con antioxidantes e inhibidores | 228 |

Bibliografía **229**

Tablas suplementarias **242**

Índice de figuras **255**

| | |
|---------------------|-----|
| Ilustraciones | 255 |
| Tablas | 256 |

Agradecimientos **257**

Abreviaturas y acrónimos

| | |
|---|--|
| AEP Alquileter fosfolípido (del inglés <i>alkyl-ether phospholipid</i>) | CRC Complejo de reconocimiento de carga del retrómero |
| ALP Alquil lisofosfolípido (del inglés <i>alkyl lysophospholipid</i>) | DAG Diacilglicerol |
| AG Aparato de Golgi | DAmP Disminución de la abundancia por perturbación del RNA _m (del inglés <i>Decreased Abundance by mRNA Perturbation</i>) |
| APC Alquil fosfocolina (del inglés <i>alkyl phosphocholine</i>) | DIC Microscopía de Nomarski o diferencial de contraste de interferencia |
| αTF α-tocoferol | DiOC₆(3) Ioduro de 3,3'-dihexiloxocarbocianina |
| ATL Lípido antitumoral (del inglés <i>antitumor lipid</i>) | DO Densidad óptica |
| CCCP carbonil cianuro <i>m</i> -clorofenilhidrazona | DRM Membranas resistentes a la extracción con detergentes no iónicos a 4 °C (del inglés <i>detergent-resistant membranes</i>) |
| CCT CTP:fosfocolina citidiltransferasa | EE Endosoma temprano (del inglés <i>early endosome</i>) |
| CHX Cicloheximida | EEM Error estándar de la media |
| CMC Concentración micelar crítica | |
| CORVET <i>Vps Class C Core Vacuole/Endosome Tethering</i> | |

| | |
|---|--|
| ESCRT <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i> | LE Endosoma tardío (del inglés <i>late endosome</i>) |
| FACS Citometría de flujo, concretamente la técnica de clasificación de células activada por fluorescencia (del inglés <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>) | LPC Lisofosfatidilcolina (del inglés <i>lysophosphatidylcholine</i>) |
| FE Factor de Enriquecimiento: coeficiente que multiplica la frecuencia con la que aparece una categoría funcional en un listado de genes respecto a la frecuencia esperada para esa misma categoría en una muestra aleatoria de genes tomada del mismo organismo. | LR Microdominio de membrana enriquecido en esfingolípidos y esteroles (del inglés <i>lipid raft</i>) |
| FM 4-64 Dibromuro de N-(3-trietilamonio)propil-4-(6'-(4''-(dietilamino)fenil)hexatrienil)piridinio, marcador fluorescente de endocitosis lipofílico | LY <i>Lucifer Yellow</i> (marcador fluorescente de endocitosis de fase fluida) |
| GAP Proteína activadora de la GTPasa (del inglés <i>GTPase activating protein</i>) | MAP <i>Mitogen-activated protein</i> |
| GARP <i>Golgi-associated retrograde protein</i> | MβCD Metil β-ciclodextrina |
| GEF Factor intercambiador del nucleótido de guanina (del inglés <i>guanine-nucleotide exchange factor</i>) | MCC/MCP Compartimento de membrana C/P (del inglés <i>membrane compartment C/P</i>) |
| GFP Proteína fluorescente verde (del inglés <i>green fluorescent protein</i>) | MP Membrana plasmática |
| GO <i>Gene Ontology</i> (inglés); en el presente trabajo se refiere al código que identifica una categoría de la base de datos homónima | MVB Cuerpo multivesicular (del inglés <i>multivesicular body</i>) |
| HOPS <i>Homotypic Fusion and Protein Sorting</i> | OSH <i>Oxysterol binding protein homolog</i> |
| IP Ioduro de propidio | P Valor P del contraste de hipótesis |
| KO <i>Knock-out</i> (inglés); un mutante de delección de un único gen | PC Fosfatidilcolina (del inglés <i>phosphatidylcholine</i>) |
| | PI4P Fosfatidilinositol 4-fosfato |
| | PKC Proteína quinasa C (del inglés <i>protein kinase C</i>) |
| | PLC/PLD Fosfolipasa C/D (del inglés <i>phospholipase C/D</i>) |

| | | | |
|----------------|---|-----|--|
| $\Delta\Psi_m$ | Potencial transmembrana mitocondrial | UFC | Unidad formadora de colonias |
| RE | Retículo endoplásmico | UPR | Respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés <i>unfolded protein response</i>) |
| RFP | Proteína fluorescente roja (del inglés <i>red fluorescent protein</i>) | VMA | <i>Vacuolar Membrane ATPase</i> |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>) | VPS | <i>Vacuolar Protein Sorting</i> |
| TGN | Red del <i>trans</i> -Golgi (del inglés <i>trans-Golgi network</i>) | WT | Tipo silvestre (del inglés <i>wild type</i>) |

Los símbolos que identifican los genes de *Saccharomyces cerevisiae* se escriben en mayúsculas y cursiva cuando se trata del alelo dominante o presente en el tipo silvestre (p. ej. *LEM3*). Otros alelos recesivos se denotan con el mismo símbolo en cursiva, en minúsculas (*lem3*, *lem3Δ*, *lem3-1*). La proteína correspondiente a un gen se denota con el mismo símbolo sin cursiva, seguido de la letra “p” y con únicamente la primera letra en mayúscula (Lem3p). En el presente trabajo esta última regla se ha observado siempre que, en un mismo texto, se hiciera referencia a genes y proteínas. Cuando sólo se hacía referencia a proteínas y no cabía por tanto confusión, se ha omitido la “p” final (Lem3) para una mayor legibilidad.

Introducción

Lípidos antitumorales

Los lípidos antitumorales (ATLs) son compuestos sintéticos con una estructura semejante a los fosfolípidos. Estos compuestos son activos frente a diversos organismos y tipos celulares, incluidos células tumorales, lo que ha suscitado interés en su potencial clínico. En el presente trabajo se estudia el mecanismo de acción de varios lípidos antitumorales, empleando como modelo experimental la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta primera sección de la introducción presentará, por tanto, los aspectos teóricos básicos acerca de estos compuestos descritos en la literatura existente.

Historia

Los ATLs tuvieron su origen en estudios sobre la respuesta del sistema inmune. Fueron sintetizados por vez primera a finales de los años 60, para estudiar el efecto de la lisofosfatidilcolina (LPC) sobre los macrófagos. La lisofosfatidilcolina (ilustración 1 A) se había demostrado como un potente activador de la fagocitosis en estas células¹. Sin embargo, la activación resultante era transitoria y de difícil estudio, al ser la LPC rápidamente metabolizada en otras moléculas. Buscando una activación más prolongada que permitiera el estudio de la señalización, se sintetizaron análogos de la LPC más estables metabólicamente. Los compuestos denominados alquil-lisofosfolípidos, como la edelfosina, mantienen la misma estructura general pero presentaban una diferencia fundamental: en lugar del ácido graso esterificado de la LPC poseían una cadena alifática, unida mediante un éter, en la posición *sn*-1 del glicerol (ilustración 1 B, →). Esta sustitución los protegía de las reacciones de

hidrólisis a las que son susceptibles los enlaces éster. La posición *sn2* está ocupada por distintos grupos en los varios alquil-lisofosfolípidos existentes; la edelfosina presenta un radical metoxi (ilustración 1 B, ►). Esto impide la acilación con otro ácido graso, reacción a la que sería susceptible el radical hidroxilo presente en la LPC (ilustración 1 A, ►).

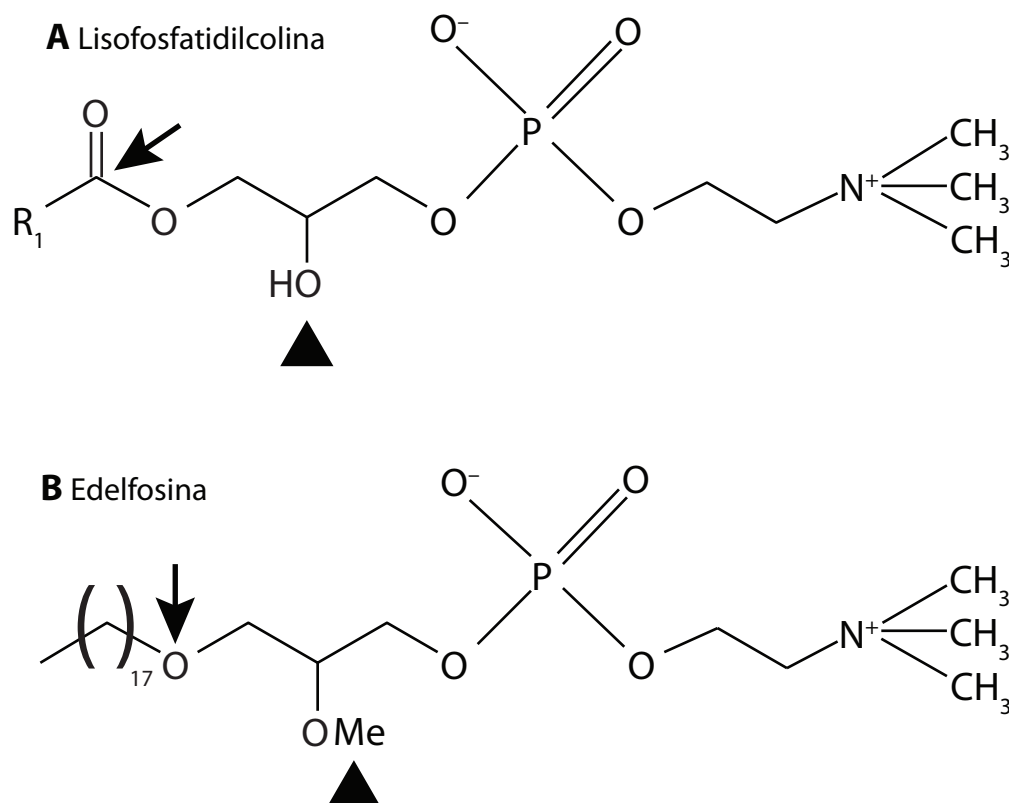


Ilustración 1: estructuras de la lisofosfatidilcolina (**A**) y la edelfosina (**B**).►: enlace entre el glicerol y la cadena alifática en *sn*-1. R₁: cadena alifática (variable, según el ácido graso esterificado en *sn*-1). ►: radical en *sn*-2.

Las propiedades antitumorales, tanto de la LPC como de varios análogos, fueron descritas en 1978^{2,3}. Estos estudios demostraban una doble acción antitumoral: indirecta, que se achacaba a la estimulación de los macrófagos que a su vez atacaban a las células tumorales, pero también directa sobre esas mismas células, como se observaba en ensayos *in vitro* en los que no había macrófagos presentes. Posteriores estudios *in vitro* confirmaron la acción antitumoral de diversos análogos de la LPC en líneas derivadas de tumores tanto hematológicos como sólidos³⁻⁸. Desde los años 80 los ATLs han sido objeto de estudio en múltiples aspectos, tratados con mayor detalle en secciones posteriores. Se sintetizaron también nuevas moléculas como la miltefosina⁹ o la perifosina¹⁰, buscando mejorar las propiedades de los compuestos. Se han descrito otras aplicaciones de los ATLs, entre las que cabe destacar el tratamiento frente a protozoos parásitos¹¹⁻¹³. Los primeros ensayos clínicos fueron realizados en los años 80 con edelfosina^{14,15}, con resultados poco satisfactorios. Otros usos de los ATLs fueron más eficaces: la miltefosina fue aprobada para el tratamiento de metástasis cutánea de cáncer de mama y, posteriormente, para el tratamiento de la leishmaniasis.

Estructura y propiedades

ATLs de primera generación

Los primeros ATLs en sintetizarse fueron los análogos de la lisofosfatidilcolina. Su característica definitoria es la presencia de enlaces éter en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol. Ya que varios ATLs poseen una cadena corta (metoxi) en *sn*-2, estos compuestos también son conocidos como análogos alquil-lisofosfolípidos (ALPs). En la ilustración 2 se recogen las fórmulas de los ALPs edelfosina (A) e ilmfosina (B), que sustituye el éter por un enlace semejante de tipo tioéter¹⁶.

ATLs de segunda generación

Una nueva clase de ATLs resultó de la simplificación de la primera generación de estos compuestos en sus componentes esenciales. Las modificaciones químicas realizadas sobre la molécula inicial de fosfatidilcolina –enlace éter en *sn*-1, eliminación del hidroxilo reactivo en *sn*-2– dan a los ALPs una gran estabilidad química una vez se incorporan a la célula. Esta característica es imprescindible para la toxicidad de estos compuestos. Eibl y Unger plantearon una nueva clase de moléculas, que al igual que los ALPs serían alquilfosfolípidos y en las que podría mantenerse dicha estabilidad si se eliminaba completamente la molécula de glicerol y los enlaces resultantes⁹. En esta nueva clase se mantendría el grupo polar, formado por la fosfocolina, directamente unido a una cadena alifática de longitud semejante a la empleada en los ALPs. La segunda generación de ATLs consiste por tanto en alquilfosfocolinas (APCs). El prototipo de las APCs es la miltefosina (ilustración 2 C). La erucilfosfocolina (ilustración 2 D) presenta una cadena alifática de mayor longitud y con una insaturación. En la perifosina (ilustración 2 E) se sustituye en el grupo polar la colina (un compuesto de amonio cuaternario unido a una cadena lineal) por una *N,N*-dimetilpiperidina (un compuesto de amonio cuaternario dentro de un heterociclo)

Determinantes estructurales de la toxicidad

En las estructuras químicas de los ATLs de ambas generaciones se encuentran características comunes. La arquitectura mínima del lípido esencial para su actividad comprende el grupo polar unido a la cadena alquilo⁹. La ausencia del grupo polar o la sustitución de la colina por otra especie completamente distinta conllevan pérdida de actividad¹⁷. Determinadas sustituciones menores no alteran sin embargo la actividad de los compuestos, como demuestra la perifosina con su compuesto cuaternario de amonio en un heterociclo. El alquilo puede tener una extensión variable. Varios ATLs tienen cadenas de 16-18 C, que se han demostrado igualmente efectivas^{2,3,9,17}; sin embargo, un ALP con un alquilo de 12 C requirió una concentración alrededor de diez veces mayor para lograr el mismo efecto antitumoral que con 18 C³.

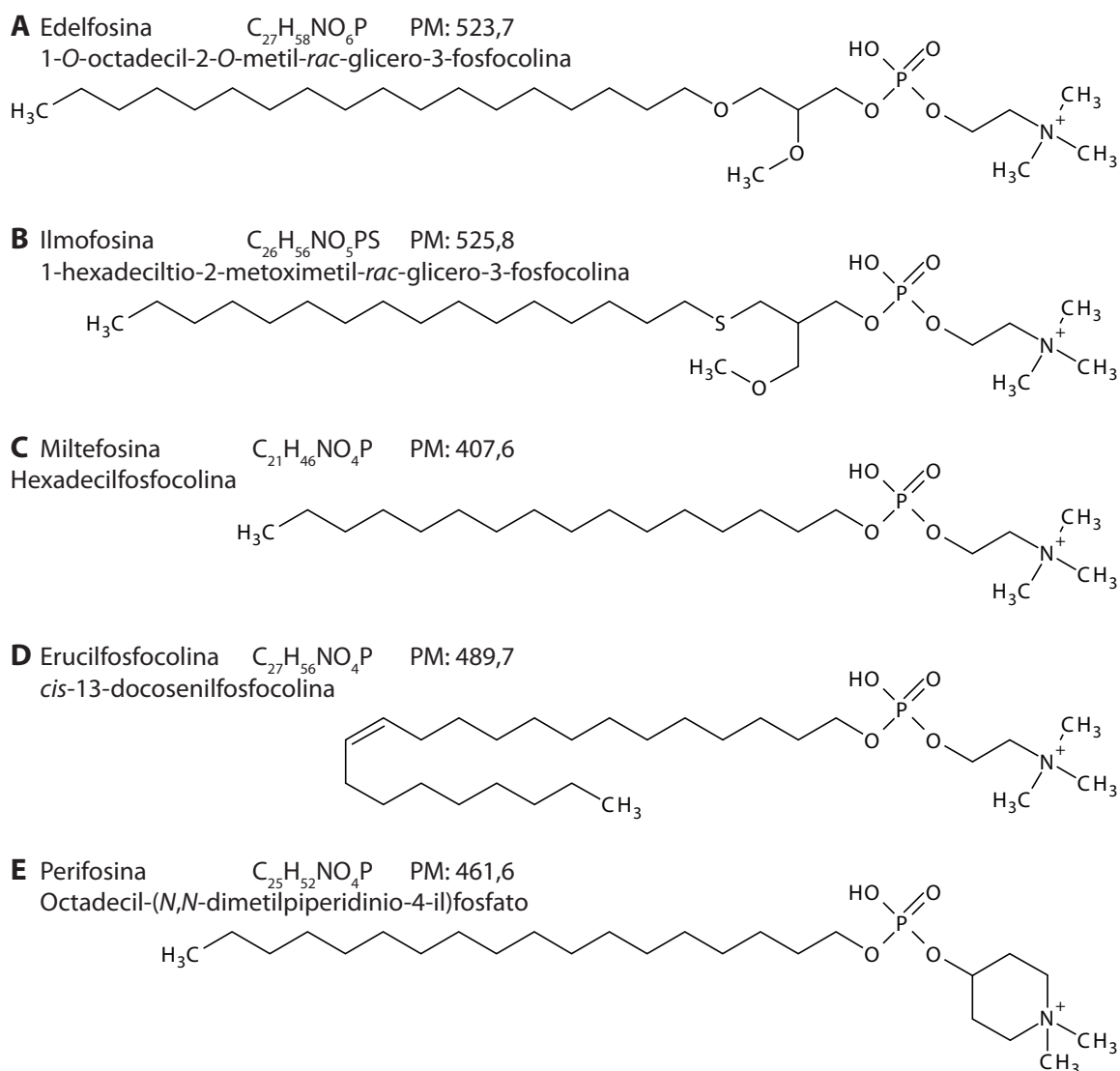


Ilustración 2: estructura química, fórmula empírica y nomenclatura sistemática de diversos lípidos antitumorales. A: edelfosina. B: ilmofosina. C: miltefosina. D: erucilfosfocolina. E: perifosina. PM: peso molecular.

Hay múltiples evidencias de que la actividad antitumoral de los compuestos esta necesariamente ligada a su estabilidad metabólica. Durante la síntesis de los primeros APLs se tuvo en cuenta que la LPC era sustrato de dos actividades enzimáticas, encargadas de mantenerla a una concentración reducida en las membranas biológicas: la lisofosfolipasa, que hidroliza el enlace éster en *sn*-1 (ilustración 3 A) formando ácido fosfatídico, y la aciltransferasa, que forma un éster entre un ácido graso y el grupo hidroxilo en *sn*-2 (ilustración 3 B) formando fosfatidilcolina. Por tanto se realizaron modificaciones químicas en esas posiciones para aumentar la estabilidad metabólica de los análogos de LPC. El enlace éter en *sn*-1 de la edelfosina no puede ser hidrolizado por la lisofosfolipasa. Su sustitución por un enlace éster permite la actividad del enzima y lleva a la pérdida de actividad del compuesto³. La edelfosina tiene también un metoxilo en la posición *sn*-2, lo que bloquea la transferencia de un grupo acilo. Si se sustituye por un hidroxilo, la molécula puede sufrir acilación y pierde su actividad³. Los enlaces *O*-alquilo en la posición *sn*-1 de un glicerofosfolípido sí pueden

ser degradados por una monooxigenasa¹⁸. Esta actividad enzimática está sin embargo restringida fundamentalmente al hígado, y depende también del grupo presente en la posición *sn*-2: el radical metoxilo de la edelfosina impide de hecho su degradación por este enzima¹⁹. Por su parte, las APCs, al carecer del glicerol y tener su grupo alquilo directamente unido al ácido fosfórico, no son sustratos de ninguno de estos enzimas. La LPC y sus análogos (ALPs y APCs) tienen además un fosfodiéster susceptible de ser degradado por fosfolipasas de clase C o D (ilustración 3, C y D respectivamente). Tratando células con edelfosina tritiada se puede monitorizar la transformación del compuesto. Tras 24 horas de tratamiento se observó una escasa transformación: menos del 2% del compuesto original había perdido la fosfocolina¹⁹. La estabilidad del fosfodiéster se observa en otros compuestos como la miltefosina⁹. La gran estabilidad metabólica de los ATLs indica además que los efectores de la toxicidad son las moléculas originales y no metabolitos derivados de las mismas. De acuerdo con esta idea, un análogo de edelfosina cuyo grupo fosfato fue modificado en un fosfonato, no hidrolizable por las fosfolipasas C o D, mantuvo la actividad antitumoral a concentraciones semejantes a la edelfosina²⁰. Así mismo, se comprobó que la molécula resultante de la acción de la fosfolipasa C sobre la edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metoxiglicerol) no era tóxica para células sensibles a edelfosina^{17,21}, y por tanto que la edelfosina no actuaba como profármaco.

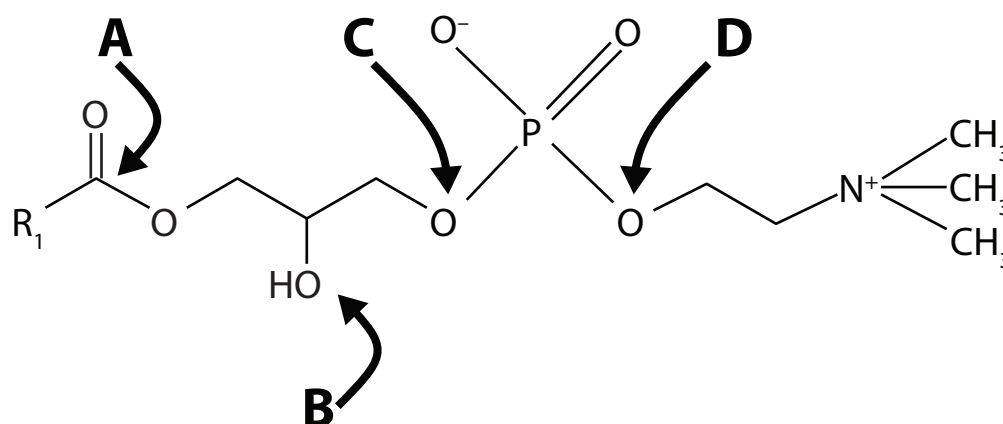


Ilustración 3: actividades enzimáticas capaces de degradar la LPC. A: lisofosfolipasa. B: aciltransferasa. C: fosfolipasa C. D: fosfolipasa D.

Mecanismo de acción

Propiedades generales

Debido a su naturaleza lipídica, los ATLs en una solución acuosa tienden a interactuar con las membranas biológicas. Las moléculas anfipáticas de pequeño tamaño como los ATLs tienden, a concentraciones elevadas, a asociarse entre sí en vez de con membranas preexistentes, formando micelas en la solución acuosa. El reparto entre estas dos fases depende de la concentración: por encima de la denominada concentración micelar crítica (CMC) de la molécula, esta se encuentra

mayoritariamente en micelas. Una CMC muy baja indica que una sustancia tiene preferencia por formar micelas consigo mismo, en vez de micelas mixtas con otros compuestos. Esto se asocia a detergentes ineficientes, pues la solubilización de membranas por detergentes consiste en la formación de micelas mixtas detergente-membrana. La edelfosina tiene una CMC baja (5-10 μM), indicativa de que sus moléculas se asocian preferentemente entre sí y no con otros lípidos²², y a concentraciones semejantes a su CMC no ejerce un gran poder detergente. Aunque el efecto detergente de la LPC y diversos análogos es semejante, sólo la edelfosina posee actividad antitumoral²³. La miltefosina presenta una CMC del mismo orden de magnitud²⁴. Esto descarta una correlación entre ambas propiedades: no parece que la actividad biológica de los ATLS esté relacionada con la solubilización de las membranas, que sólo provocan a concentraciones elevadas.

Los ATLS interaccionan a bajas concentraciones con las membranas biológicas, alterando diversos procesos celulares e induciendo toxicidad celular. Difieren por tanto de fármacos tradicionalmente empleados en quimioterapia del cáncer cuya diana molecular es el ADN, como los agentes alquilantes, análogos de bases nitrogenadas, inhibidores de topoisomerasas, bleomicina o antraciclinas. Muchos de estos agentes provocan un estrés por daño celular, que induce apoptosis y lleva en última instancia a la muerte celular²⁵. Esto indica que las células tumorales poseen una maquinaria apoptótica suficientemente funcional y susceptible de ser activada en determinadas condiciones, pero son capaces de evadir los mecanismos fisiológicos de control celular que, en células sanas, provocarían su muerte por apoptosis²⁶. El mecanismo de acción de la edelfosina implica la activación de la apoptosis^{27,28}, propiedad que posteriormente se ha extendido a otros ATLS^{29,30}. La edelfosina es capaz de inducir una apoptosis selectiva en las células tumorales y su acción proapoptótica se asocia con la incorporación del éter lípido en la célula cancerígena¹⁷. Dada la peculiar naturaleza de las dianas moleculares de estos compuestos es de gran interés conocer cómo inducen apoptosis estos compuestos. Sin embargo, la respuesta está lejos de ser simple.

Metabolismo lipídico

La fosfatidilcolina (PC) es el lípido más abundante en las membranas biológicas³¹. Además de esta función estructural, la PC es el sustrato para la síntesis de moléculas que intervienen en procesos de señalización, como el diacilglicerol y la ceramida³¹. Ya en uno de los primeros estudios sobre el modo de acción de la edelfosina se postuló que interfería con el metabolismo lipídico⁵. La edelfosina provoca una caída de la concentración celular de PC, al inhibir la síntesis del lípido a partir de colina^{5,32}. La LPC y los ATLS inhiben la CTP:fosfolina citidiltransferasa³³⁻³⁵ (ilustración 4, CCT). La inhibición por LPC supone un beneficio para la célula, al disponerse de una ruta alternativa de síntesis de PC (mediante la acilación de LPC; ilustración 4, AT/TA) menos costosa energéticamente. Sin embargo, los ATLS no son sustratos de aciltransferasas/transesterasas para la síntesis de PC, e incluso reducen la

conversión de la LPC presente en la célula en PC al actuar como inhibidores competitivos⁵. Por tanto, la inhibición de la CCT por ATLS se acompaña de un descenso en la producción de PC.

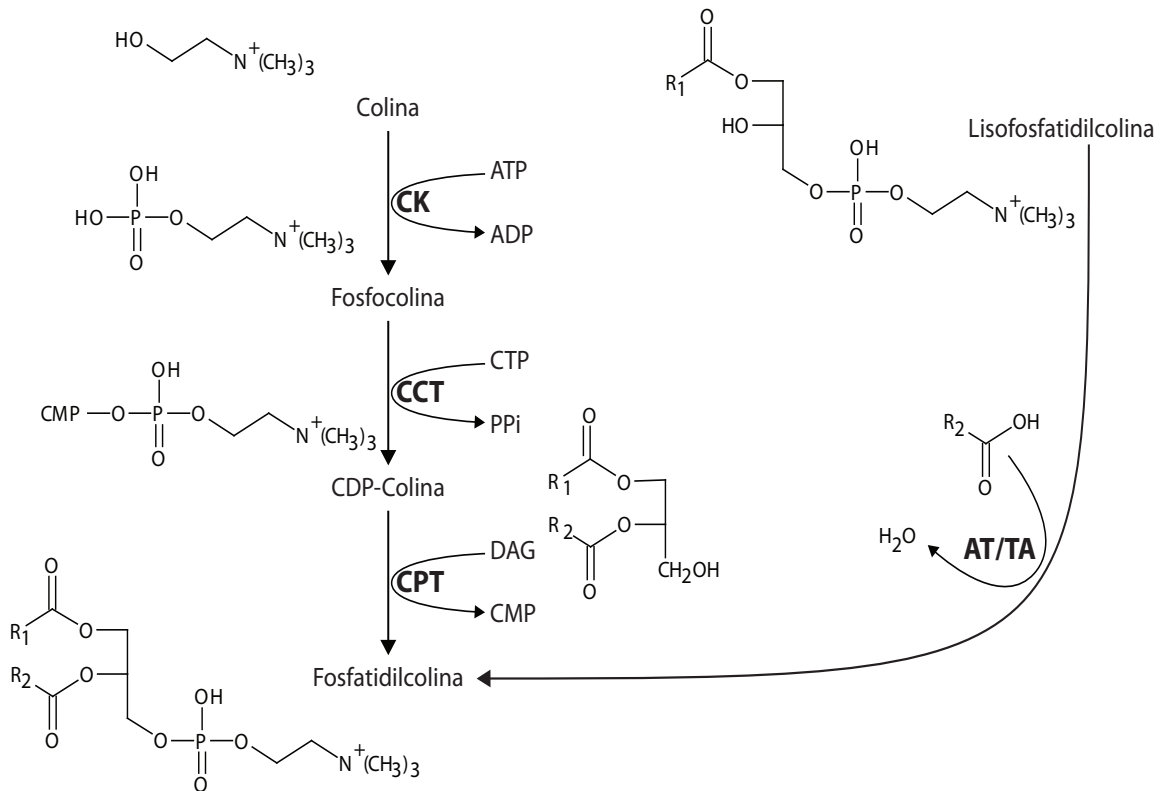


Ilustración 4: síntesis de fosfatidilcolina y metabolismo de lípidos relacionados. CK: colina quinasa. CCT: CTP-fosfocolina citidiltransferasa. CPT: colina fosfotransferasa. AT/TA: aciltransferasa/transacilasa.

Este efecto inhibitorio puede ser fundamental en la toxicidad de los ATLS: la presencia en el medio de cultivo de LPC como una fuente alternativa de PC o la sobreexpresión de la CCT son capaces de mitigar el efecto citotóxico de los compuestos^{33,36,37}. Pero la mera inhibición de CCT no es suficiente en todas las ocasiones para inducir toxicidad celular. La estimulación de ese enzima con ácido oleico, en células MCF-7 tratadas con edelfosina, restauró la síntesis de PC, pero no el crecimiento celular³⁸. En ese mismo estudio se indicó que la edelfosina sí interfiere en el metabolismo lipídico de las células A549, que sin embargo son resistentes al compuesto³⁸. Otro trabajo comparó el efecto del tratamiento con miltefosina en células silvestres tratadas respecto a la muerte inducida en un mutante termosensible de CCT. Los perfiles lipídicos de ambas células y los mecanismos de muerte implicados fueron distintos³⁹. Esto indicó que en la toxicidad por miltefosina intervenían otros procesos celulares, además de la inhibición del metabolismo lipídico. Aunque la inhibición de CCT parece un mecanismo común a diversos ATLS, la importancia de este proceso en la citotoxicidad final depende del contexto celular.

Estrés en el retículo endoplásmico

Varias aproximaciones experimentales han revelado un papel del retículo endoplásmico (RE) en la inducción de apoptosis por ATLs. El RE participa en la biosíntesis de lípidos y proteínas, en la maduración de éstas y en la homeostasis del calcio celular. Las alteraciones en estos procesos provocan un estrés en el orgánulo. La célula responde a este estrés activando la llamada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR): se detiene la síntesis proteica, se incrementan las chaperonas que permiten el correcto plegamiento de las proteínas y la degradación de las mal plegadas. La UPR busca restaurar la homeostasis del RE; sin embargo, si la UPR no es capaz de evitar un estrés de RE prolongado, se puede activar una respuesta apoptótica^{40,41}. La CTP:fosfolina citidiltransferasa reside en el retículo endoplásmico, y se ha hipotetizado que la inhibición de la CCT puede inducir en sí misma un estrés de retículo⁴². En algunos tipos celulares se observa esta perturbación del metabolismo lipídico, que sin embargo no es capaz sin embargo de inducir apoptosis⁴³. Dado que se ha observado acumulación de análogos fluorescentes de la edelfosina en ese orgánulo⁴⁴, se ha sugerido por tanto que los ATLs son capaces de producir estrés de RE mediante otros mecanismos, como la incorporación a las membranas del orgánulo y la desregulación del calcio acumulado en su interior^{43,45}. El estrés continuado provocado por los compuestos induce apoptosis mediante la activación de caspasas y la participación de la mitocondria. Tiene también un papel importante la MAP quinasa JNK^{43,45,46}, que puede inducir apoptosis (ver siguiente sección).

Interferencia con rutas de señalización

Una de los primeros efectos de los ATLs observados fue la inhibición de la función proteína quinasa C (PKC). La familia PKC comprende varias quinasas con patrones de expresión tejido específicos que regulan por fosforilación la actividad de otras proteínas. Las isoenzimas PKC actúan sobre diversas proteínas, a través de las cuales regulan rutas de señalización muy diversas, en algunas ocasiones de efectos contrapuestos. La mayoría de las isoenzimas comparten la capacidad de ser activadas por diacilglicerol (DAG)⁴⁷. A pesar de la diversidad de funciones de la familia, es bien conocido que su estimulación con análogos del DAG promueve la progresión tumoral⁴⁷, lo que ha llevado a considerar la inhibición de PKC –o de isoformas específicas– como una potencial terapia contra el cáncer⁴⁸. La inhibición por edelfosina de PKC fue uno de los primeros mecanismos de acción propuestos para la actividad antitumoral del fármaco⁴⁹. Las PKC se activan mediante su unión a membranas biológicas enriquecidas en DAG, y la incorporación de ATLs a dichas membranas podría alterar esta interacción con las quinasas, resultando en la inhibición observada. Existen sin embargo, además de estudios que muestran inhibición de PKC⁴⁹, otros que muestran en el mismo tipo celular activación de la quinasa⁵⁰ y que la toxicidad por edelfosina es independiente de la actividad quinasa⁵¹. Los estudios del efecto de edelfosina sobre PKC han sido revisados⁵², resultando poco claras e incluso

contradictorias las evidencias experimentales. La participación de PKC en la toxicidad por ATLS no se puede aseverar con certeza.

Los ATLS también pueden inhibir las fosfolipasas que generan lípidos mensajeros implicados en rutas de señalización. La fosfolipasa C (PLC) específica de fosfoinosítidos actúa sobre el fosfoéster que une el glicerol con el ácido fosfórico en esos lípidos (el mismo enlace que el indicado en la ilustración 3, posición C). Se ha comprobado que la edelfosina es un potente inhibidor de dicha PLC⁵³, postulándose que interfiere en la unión de la fosfolipasa con su proteína G activadora⁵⁴. También se ha observado esta inhibición por miltefosina⁵⁵. La hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato genera dos mensajeros, DAG e inositol-1,4,5-trifosfato. El DAG es, como se ha mencionado, un activador de las proteína-quinasa C: la inhibición de estas quinasa observada en determinados estudios podría ser causada indirectamente por la inhibición de la PLC, al menos parcialmente. El tratamiento prolongado con edelfosina inhibe también la liberación de inositol-1,4,5-trifosfato⁵⁶, que provoca a su vez la liberación de un segundo mensajero (calcio intracelular). La fosfolipasa D (PLD) actúa sobre el otro fosfoéster de los fosfolípidos generando ácido fosfatídico, que puede ser convertido posteriormente en DAG. Ambos lípidos intervienen en la regulación del transporte vesicular (comentado en la sección *Requerimientos lipídicos del tráfico vesicular en el TGN*). Distintos ATLS son capaces de inhibir la PLD^{57,58}; el mecanismo exacto de esta inhibición no está bien caracterizado, y puede deberse en parte a la regulación que ejerce PKC sobre la fosfolipasa⁵⁸.

Un tercer mecanismo para el funcionamiento de los ATLS que se ha propuesto es su interferencia en las rutas de transducción de señales por MAP quinasa. La quinasa ERK1/2 promueve supervivencia celular, siendo las alteraciones en su ruta de señalización frecuentes en varios cánceres⁵⁹, y el tratamiento con distintos ATLS disminuye la actividad de la ruta^{30,60}. Un posible origen de esta disminución se encuentra al inicio de la ruta, en la MAP quinasa quinasa quinasa Raf. La activación de Raf depende de su unión a la membrana plasmática, y para esa unión es fundamental que Raf interactúe con la proteína G Ras⁵⁹. La edelfosina interfiere en la interacción Ras-Raf⁶¹, lo que podría explicar la reducción que provoca en la unión de Raf a la membrana⁶⁰. Los ATLS también pueden interferir en la ruta de señalización por la MAP quinasa JNK, induciendo su activación prolongada^{30,46,62}. El factor de transcripción c-Jun, al que JNK fosforila y activa, parece jugar un papel importante en la toxicidad por ATLS en esos casos^{30,46}. La ruta de JNK se activa en respuesta a diversas señales de estrés, y su activación prolongada puede inducir una respuesta apoptótica⁶³. Las alteraciones provocadas por los ATLS y potencialmente responsables de la activación de JNK son numerosas (revisadas por Van Blitterswijk y Verheij⁶⁴). La inhibición del metabolismo lipídico o el estrés del RE⁴³ se ha asociado con la señalización por JNK. Alteraciones en las membranas podrían provocar, en determinados casos, reclutamiento de chaperonas, estabilización de JNK y una activación prolongada de la misma⁶⁵. Por tanto, los ATLS pueden afectar de dos maneras distintas a la señalización por MAP quinasa: inhibiendo una ruta pro-supervivencia (ERK) y activando una ruta pro-apoptótica (JNK). Este efecto

dual es de especial interés ya que se ha postulado que el destino de la célula (supervivencia o muerte por apoptosis) depende precisamente del equilibrio entre ambas señales⁶⁶.

La perifosina inhibe la ruta de señalización por la quinasa Akt⁶⁷, capacidad que ha sido extendida a otros ATLS⁶⁸⁻⁷⁰. La fosforilación por Akt de diversos sustratos promueve la supervivencia celular, induce la degradación de efectores de la apoptosis e inhibe este proceso. Diversos tumores presentan alteraciones en la ruta de señalización por Akt, y se considera esta ruta una potencial diana para el tratamiento del cáncer⁷¹. La activación de Akt requiere de su asociación a la membrana mediante la interacción con fosfolípidos específicos (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato)⁷¹. Los ATLS interfieren con esta unión: un marcador, consistente en una proteína fluorescente fusionada al dominio de interacción de lípidos de Akt, pierde en presencia de perifosina la capacidad de translocarse a las membranas^{67,72}. Por otro lado, una forma miristoilada de Akt (que interacciona constitutivamente con las membranas, sin depender de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) no sufre inhibición por perifosina⁶⁷. Por tanto, se ha propuesto que la perifosina inhibe Akt interfiriendo en su asociación con las membranas.

Activación de la ruta extrínseca de la apoptosis

La estimulación extracelular del receptor de muerte Fas induce su trimerización, el reclutamiento de la proteína adaptadora Fadd y, a través de esta, el reclutamiento y la activación de los efectores de apoptosis caspasa 8/10. Se conoce a esta ruta de transducción de señales como ruta extrínseca de la apoptosis, distinta de la ruta intrínseca mediada por la mitocondria⁷³. La apoptosis promovida por edelfosina depende, en determinados tipos celulares, de la incorporación del compuesto y de la expresión de Fas⁷⁴, lo que indica un papel de este receptor en el mecanismo de muerte. La edelfosina provoca el desplazamiento de Fas a microdominios de membrana *lipid raft*, la concentración de los mismos^{74,75} y el reclutamiento de Fadd y caspasa 8/10^{76,77}. Tanto la activación de las caspasas como la participación de la mitocondria es esencial para la apoptosis en este proceso⁷⁸. En concordancia con ese papel se observó reclutamiento a los *lipid rafts* de Bid, una proteína capaz de comunicar la ruta extrínseca con la intrínseca⁷⁶. La implicación de la mitocondria encaja con el efecto protector ejercido por las proteínas mitocondriales antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L¹⁷. Estas observaciones se aplican también a la APC perifosina⁷⁹.

Múltiples mecanismos de acción están implicados en la toxicidad por ATLS

En la literatura científica concerniente a los ATLS es frecuente encontrar una frase como la siguiente: “*El mecanismo exacto de acción del ATL aún no se conoce, aunque estudios previos han implicado la ruta...*”. La ruta en cuestión puede, de hecho, ser una entre muchas: como se ha resumido en la sección anterior, los ATLS interfieren con procesos biológicos muy diversos. La interacción directa de un compuesto químico con una proteína generalmente indica que ambas moléculas tienen

una geometría molecular compatible. Tal interacción explica la especificidad de los fármacos por sus dianas moleculares. Este no parece ser el caso de los ATLS, y su misma naturaleza lipídica explica, en parte, la variabilidad de sus efectos. La incorporación de los ATLS a las membranas celulares modifica las propiedades de las mismas. Como resultado, se ve alterada la función de proteínas que se asocian a membranas, un grupo muy diverso. El estudio del mecanismo de acción de estos compuestos debe distinguir entre alteraciones celulares que afecten directamente a la viabilidad y aquellas no relevantes para la supervivencia celular. Debe evaluarse, entre las primeras, qué importancia tiene cada una en la toxicidad celular, así como las posibles relaciones causales entre las mismas.

La variabilidad observada en los resultados de distintos grupos se explica además por otro factor: la heterogeneidad de condiciones experimentales empleadas. La historia del estudio de los ATLS muestra una constante diversificación. Los compuestos empleados eran en principio ALPs, fundamentalmente edelfosina, para luego extenderse a la miltefosina y posteriormente a otras APCs. Ciertas características funcionales parecen ser compartidas por todos los ATLS; sin embargo, un catálogo completo de los mecanismos de acción y el peso de cada uno en la toxicidad final no se ha llevado a cabo ni siquiera para un solo ATL prototipo. La falta de tal prototipo entraña un riesgo a la hora de comparar compuestos distintos, sus efectos y relacionarlos con los mecanismos moleculares que los causan.

Otro factor de variabilidad es el amplio espectro de sistemas biológicos empleado en el estudio de los ATLS. Ya las primeras observaciones del efecto antitumoral de estos compuestos se realizaron en una variedad de sistemas: líneas celulares derivadas de sarcoma^{2,5} o ratones inoculados con las mismas², células leucémicas aisladas de pacientes³ y líneas derivadas de tumores sólidos⁶. Todo ello sin tener en cuenta modelos biológicos completamente distintos, como protozoos u hongos, también sensibles a los compuestos. En general se observan respuestas variables a los ATLS en las distintas líneas celulares, como corresponde a tipos celulares con grandes diferencias genéticas y metabólicas. Los estudios que comparan varias líneas buscan relacionar la distinta respuesta al compuesto con alguna característica diferencial; pero corren el riesgo, si no se contemplan todas las diferencias entre líneas celulares o el conocimiento de las mismas es incompleto, de hacer una interpretación incompleta, o confundir correlación con causalidad.

Finalmente, el conocimiento del metabolismo y las rutas de supervivencia y muerte celular se ha incrementado progresivamente en las cinco décadas transcurridas desde la invención de los primeros ATLS. En este periodo se ha ido comprobado progresivamente que múltiples rutas intervienen en la toxicidad por ATLS. Esta expansión del campo ha llevado a un mejor conocimiento de cómo actúan estos compuestos. Sin embargo, el énfasis en uno de los mecanismos de los compuestos –según la preferencia y experiencia de los distintos grupos implicados en el campo– puede llevar a no considerar

la influencia de mecanismos alternativos. La falta de estudios comparativos lleva a una atomización del conocimiento sobre los ATLs que hace más difícil validar los resultados de otros investigadores.

La incorporación de ATLs es relevante para su selectividad

Un compuesto antitumoral con utilidad terapéutica debe reunir dos propiedades: toxicidad (capacidad de matar células) y selectividad (capacidad de atacar preferentemente las células tumorales, respetando las células sanas). Una selectividad elevada permite incrementar la dosis con efectos secundarios reducidos. La distinta respuesta de células sanas y tumorales implica, además, que existe alguna característica, diferencial entre ambos tipos celulares y que participa o interacciona con el mecanismo de acción del compuesto. Por tanto, el estudio del modo de acción de un compuesto selectivo puede revelar posibles dianas farmacológicas, con independencia de su utilidad clínica final. En este sentido los ATLs presentan un gran interés. Se ha demostrado que la edelfosina es eficaz ante líneas celulares derivadas de distintos tipos tumorales, pero no tóxicas frente a células normales^{3,17,74}, y los estudios de modelos animales y ensayos clínicos revelaron que los ATLs poseen una reducida toxicidad en los tejidos sanos (ver sección *Uso en clínica*). Existen sin embargo algunas excepciones: células tumorales resistentes⁸⁰ y células sanas sensibles a ATLs⁸¹.

Como se ha comentado previamente, son varios los mecanismos celulares susceptibles de ser alterados por los ATLs y así inducir la toxicidad celular. Un paso imprescindible previo a la activación de estos mecanismos es la incorporación de los compuestos a las células. Diversos experimentos han mostrado una correlación entre incorporación del ATL y toxicidad celular^{17,4,82,74}, y una falta de incorporación en células sanas^{17,74}. Un bloqueo de la incorporación del compuesto provocaría así resistencia. Células que no incorporan naturalmente edelfosina mueren por apoptosis cuando se les microinyecta el compuesto^{74,76}. Por otro lado, mediante incubación prolongada en presencia del ATL se generaron líneas resistentes; esta resistencia se debía, en muchos casos, a defectos en la incorporación del ATL (revisados por van Blitterswijk y Verheij⁶⁴). Todo esto parece indicar que la incorporación de los compuestos es un paso crítico para su toxicidad y que puede determinar su selectividad.

Se ha propuesto varias vías de incorporación de los ATLs. El tratamiento con inhibidores de endocitosis, como la monensina, produce una reducción en la incorporación de edelfosina^{83,84}, sin embargo, las células mantienen cierto nivel de incorporación no saturable⁸³. Esto podría indicar la presencia de un mecanismo de incorporación paralelo e independiente de la endocitosis, y de hecho se ha demostrado en algunos tipos celulares que la incorporación es completamente independiente de las vías endocíticas conocidas^{85,86}. En el estudio comparativo entre una línea celular sensible a edelfosina y otra resistente, generada de la primera, se halló el origen de la resistencia en un defecto en la incorporación del ATL⁸³. No obstante, la línea resistente mostraba una incorporación de marcadores

de endocitosis, tanto de fase fluida como mediada por receptor, idéntica a la línea sensible. Los autores de este estudio plantearon que esta aparente contradicción sería fruto del transporte de ATLS por una vía endocítica alternativa, proponiendo un mecanismo de endocitosis mediado por microdominios de membrana o *lipid rafts*. De hecho, han comprobado que la disrupción de estas estructuras previene la incorporación y toxicidad por ATLS^{75,76,79,83,87}.

La interacción de ATLS con *lipid rafts* ha sido observada independientemente por otros grupos^{75,79}, habiéndose propuesto dichos dominios *lipid rafts* como una nueva diana terapéutica en el tratamiento del cáncer⁸⁸. Estudios con membranas modelo sugieren que estos compuestos tienen una alta afinidad por el colesterol^{22,23}, que se concentra en los *lipid rafts*. La incorporación de los ATLS a las membranas estaría así mediada por dichos microdominios, y su asociación con los mismos provocaría cambios en su estructura física⁸⁹. Sin embargo, los microdominios proporcionan regiones de la membrana para el anclaje de proteínas específicas y funcionan como plataformas de señalización. En ese sentido la incorporación de ATLS a *lipid rafts* se ha asociado a la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis mediante el receptor Fas^{75,79}. La disrupción de *lipid rafts* podría afectar a otras proteínas y procesos, además de la endocitosis, que evitaran la toxicidad por ATLS. Se ha propuesto que la incorporación por endocitosis es una propiedad de las células leucémicas y diferente del mecanismo de incorporación presente en células de carcinoma⁶⁴ (ver párrafo siguiente). Esta hipótesis no explica, sin embargo, resultados semejantes e indicativos de incorporación por endocitosis que se han obtenido con células HeLa⁹⁰, mientras que en otras células leucémicas la participación de este mecanismo ha sido rechazado⁸⁵. En una línea derivada de un carcinoma hepático la endocitosis parecía ser el mecanismo de incorporación del compuesto: un inhibidor de la endocitosis o la disrupción de *lipid rafts* eran capaces de reducir la incorporación de perifosina⁹¹. En cualquiera de las dos condiciones sin embargo se mantenía una incorporación mínima de alrededor de un 40%, mientras que marcadores de endocitosis se reducían a 0%. Con ambas condiciones además la reducción era semejante a 37 °C y a 0 °C, y a esta última temperatura la endocitosis está básicamente bloqueada. La conclusión de este estudio fue que existía, en esa línea celular, otro mecanismo de incorporación independiente de la endocitosis. Este mecanismo también se veía afectado por el inhibidor empleado o la técnica de disrupción de *lipid rafts*. Por tanto, el uso en otros estudios de estas dos técnicas podría no ser adecuado para estimar la participación de la endocitosis en la incorporación de los compuestos. Este extremo quedó confirmado mediante el silenciamiento específico de componentes del citoesqueleto: mientras que sí se reducía la incorporación de marcadores de endocitosis, la incorporación de perifosina permanecía prácticamente constante⁹¹. El mecanismo alternativo, posteriormente identificado, es de hecho independiente de la endocitosis⁹². Estos resultados ponen en cuestión las evidencias experimentales previas que sugieren una incorporación de los ATLS por endocitosis en ciertos tipos celulares. No puede descartarse automáticamente que la endocitosis juegue un papel en la incorporación celular de ATLS; sin embargo, se hace necesario revisar los estudios existentes con

técnicas más delicadas para interpretar inequívocamente la aportación real de la endocitosis en la incorporación de los compuestos.

Estudios en levadura (revisados con mayor detalle en la sección posterior *Transporte de aminofosfolípidos por flipasas*), y posteriormente en células humanas, demostraron la implicación de la familia P4 de ATPasas de membrana en la incorporación de ATLS. Estas P4-ATPasas son proteínas translocadoras de lípidos hacia la cara citosólica de las membranas⁹³. Debido al carácter anfipático de los lípidos que componen las membranas, tal movimiento (*flip*) es energéticamente desfavorable. Las P4-ATPasas son flipasas: catalizan el transporte activo específico para ciertas clases de lípidos (revisados por Riekhof y Voelker⁹⁴), y generan una asimetría en la composición entre las dos capas de las membranas biológicas que es esencial para la función de las mismas. Las flipasas de levadura deben formar heterodímeros para ser funcionales: la subunidad catalítica, que media el transporte del lípido en sí, se asocia a una subunidad accesoria que provee estabilidad y localización al dímero⁹⁵. Sus sustratos son fosfolípidos, incluyendo derivados fluorescentes con modificaciones en la cola de los ácidos grasos⁹⁶⁻⁹⁸, pero también moléculas análogas: lisofosfolípidos^{99,100} y ATLS^{101,102} (ilustración 5). En el genoma humano existen 14 miembros putativos de la familia de las subunidades catalíticas de las P4-ATPasas (ATP8A1/2, ATP8B1/2/3/4, ATP9A/B, ATP10A/B/D, ATP11A/B/C) y 3 de las subunidades accesorias (TMEM30A/B/C, también llamados CDC50A/B/C)¹⁰³. Se ha comprobado la interacción con subunidades accesorias de al menos las seis primeras subunidades catalíticas, y que es esencial para su correcta localización¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. ATP8B1 media de hecho la translocación de fosfolípidos en la membrana plasmática, en colaboración con una subunidad de la familia CDC50¹⁰⁴. La subunidad CDC50A participa también en la incorporación de edelfosina¹⁰⁷ y perifosina, en combinación con al menos ATP8B1⁹². Las flipasas humanas tienen, en comparación con *S. cerevisiae*, una mayor diversidad, y sólo recientemente han comenzado a ser caracterizadas. No obstante, parecen ser estructural y funcionalmente semejantes a las de levadura, y participar en la incorporación de fosfolípidos –y moléculas semejantes como ATLS– en al menos algunos tipos celulares. Apoya esta idea el que en parásitos protozoarios – otro de los tipos celulares que pueden ser tratados con ATLS– existen homólogos, tanto de una subunidad catalítica como de la accesoria. Mutaciones en las mismas evitan la incorporación de ATLS y provocan resistencia^{108,109}. Quedan sin embargo múltiples cuestiones por resolver: si este es el único mecanismo o el mayoritario, a qué tipos celulares es extensible, y cuáles de entre las 14 flipasas participan realmente en la incorporación de ATLS.

Uso en clínica

Al descubrirse la capacidad antitumoral in vitro de los ATLS se planteó su potencial empleo en el tratamiento del cáncer. Estudios en animales mostraron eficacia frente a diversos tipos de tumores por parte de edelfosina, ilmofosina, miltefosina o perifosina^{10,45,110-115}, a concentraciones que producían una toxicidad reducida. Los ATLS, al ser surfactantes naturales, tienen efecto hemolítico, prefiriéndose

la administración por vía oral a inyecciones intravenosas. Los efectos hemolíticos pueden atenuarse mediante la administración de los compuestos en liposomas¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Los ensayos clínicos realizados con ATLs como único agente no han tenido la eficacia esperada. Entre los efectos secundarios habituales se encuentran náuseas, irritación gastrointestinal y vómitos. Los limitados estudios realizados con edelfosina e ilmofosina no demostraron una mejoría significativa en los pacientes^{14,15,119}. La edelfosina provoca una alta toxicidad en células leucémicas con una elevada especificidad, afectando en menor grado a las células progenitoras de la hematopoyesis sanas. Una de las aplicaciones propuestas de la edelfosina es la purga de células cancerosas de la médula ósea, empleada en trasplante autólogo en pacientes con leucemia. Un ensayo clínico en fase II arrojó resultados positivos¹²⁰. La miltefosina y la perifosina han sido también objeto de ensayos clínicos de fase II frente a varios tipos de cáncer, sin resultados positivos¹²¹⁻¹²⁷. A día de hoy la única de estas aplicaciones de un ATL que han entrado en la clínica es tratamiento de metástasis cutáneas de cáncer de mama mediante administración por vía tópica de miltefosina^{128,129}. Se desconoce la razón de la diferencia entre los resultados observados en modelos animales y en pacientes humanos. Se ha especulado que, al contrario que en cultivos celulares *in vitro*, los ATLs son significativamente metabolizados *in vivo* en el hígado, lo que reduciría la biodisponibilidad efectiva de los compuestos¹³⁰. A pesar de su baja eficiencia se ha propuesto que los ATLs podrían, a través de los diversos efectos que ejercen en las células, sensibilizar las células a otros tratamientos más eficaces¹³¹.

El tratamiento con ATLs es eficaz *in vitro* contra parásitos del género *Leishmania*¹¹⁻¹³, en modelos animales¹³² y en pacientes humanos. De hecho, la aplicación clínica más extendida de un ATL es el tratamiento con miltefosina de la leishmaniasis visceral, empleada en los últimos años en la India para el tratamiento de enfermos¹³³. Otros parásitos han mostrado también sensibilidad frente a ATLs: *Trypanosoma* sp.¹³⁴ o *Entamoeba histolytica*¹³⁵.

Procesos biológicos en *Saccharomyces cerevisiae* de interés para el presente trabajo

En esta tesis doctoral se ha empleado la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para el estudio de tres lípidos antitumorales. El fin de los experimentos realizados ha sido obtener una descripción lo más detallada posible de los mecanismos celulares, en dicho organismo, a través de los cuales actúan los compuestos. El número de procesos biológicos señalados por los resultados como relevantes fue reducido; no obstante, cubren aspectos muy diversos de la fisiología celular, haciendo necesaria una descripción de los fundamentos de cada uno. En esta

sección se da una introducción a cada proceso. No pretende ser una revisión detallada sino centrarse en los aspectos de mayor interés para la posterior interpretación de los resultados. Un segundo fin es servir de referencia de cuáles son los componentes moleculares específicos de levadura, así como de las particularidades que se dan en este organismo modelo.

Transporte de aminofosfolípidos por flipasas

Las células eucariotas poseen membranas asimétricas en su composición¹³⁶, y *Saccharomyces cerevisiae* no es una excepción. La cara citosólica de las membranas de levadura concentra la mayoría de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinosítidos. La fosfatidilcolina es el fosfolípido mayoritario en las membranas, de lo que se deduce que se concentra en la cara externa¹³⁷. El carácter anfipático de los lípidos determina la estructura de las membranas biológicas: los lípidos de ambas caras orientan sus colas alifáticas apolares hacia el centro de la membrana, quedando aisladas del medio acuoso por dos láminas formadas por las cabezas hidrofílicas. Tal estructura impone una elevada barrera energética al movimiento transmembrana de lípidos, lo que favorece el mantenimiento de la asimetría: la translocación espontánea de lípidos entre ambas caras es extremadamente infrecuente¹³⁸.

Las células poseen además proteínas transportadoras específicas de fosfolípidos, que pueden participar en la creación o mantenimiento de esta simetría. Las proteínas encargadas de la translocación lipídica hacia la cara extracelular de las membranas (movimiento de *flop*) son transportadores del grupo ABC, mientras que el movimiento en sentido opuesto (movimiento *flip*) está mediado por las ATPasas del grupo P4 ya mencionadas¹³⁹. La incorporación al interior celular de análogos fluorescentes de fosfolípidos (ilustración 5 C) se reduce en mutantes de estas ATPasas^{93,96,98}, lo que supone la principal evidencia de que son realmente flipasas. Se ha planteado alternativamente que su función podría ser la regulación del tráfico vesicular, ya que algunas se localizan en el citoplasma y no en la membrana plasmática, y sus mutantes poseen defectos en la vía secretora¹⁴⁰⁻¹⁴³. Según esta hipótesis, la reducida incorporación de análogos observada en los mutantes de las ATPasas se debería a un efecto indirecto, posiblemente la incorrecta secreción o localización de los verdaderos transportadores¹⁴³. Sin embargo, la translocación lipídica propia de la actividad flipasa puede observarse en vesículas intracelulares purificadas, y depende de la presencia de los genes de las ATPasas^{97,144}. Ha sido posible además reconstituir una actividad flipasa en liposomas tras la incorporación a los mismos de una de las ATPasas (*Drs2p*)¹⁴⁵, lo que parece constituir una prueba definitiva de que estas proteínas median realmente la translocación de fosfolípidos.

El genoma de *S. cerevisiae* codifica cinco de estas flipasas¹⁴¹ (*DRS2*, *DNF1*, *DNF2*, *DNF3*, *NEO1*). Estas subunidades catalíticas se asocian en un heterodímero con una subunidad accesoria esencial para su localización y función⁹⁵. Existen tres unidades accesorias en levadura⁹⁸ (*CDC50*, *LEM3*, *CRF1*). Aunque existe cierta redundancia funcional entre las subunidades catalíticas^{141,146}, los fenotipos de los mutantes en cada una de ellas y los patrones de localización no son iguales¹⁴⁶. *DNF1* y

DNF2 son las principales flipasas de la membrana plasmática⁹⁶ y catalizan al menos la incorporación de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. *LEM3* codifica la subunidad accesoria que se asocia con *DNF1/2*: forma complejos con estas proteínas^{95,147}, se localiza parcialmente en la membrana plasmática⁹⁸ y es esencial para la incorporación de fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina exógena^{98,101}. Por el contrario, *DRS2* codifica una flipasa asociada mayormente con membranas internas, al igual que su subunidad accesoria *CDC50*^{95,140}. *DRS2* tiene especificidad por fosfatidilserina⁹⁷ y es esencial para el tráfico vesicular en la red *trans*-Golgi (TGN)^{140,142}. *DNF3* tiene a *CRF1* como subunidad accesoria¹⁴⁷, y podría participar en concierto con *DRS2* en la organización del tráfico vesicular en el TGN¹⁴⁴. *NEO1* también parece participar en el transporte vesicular y se localiza en el TGN y en los endosomas¹⁴⁸. No se ha observado asociación de esta flipasa con subunidades accesorias.

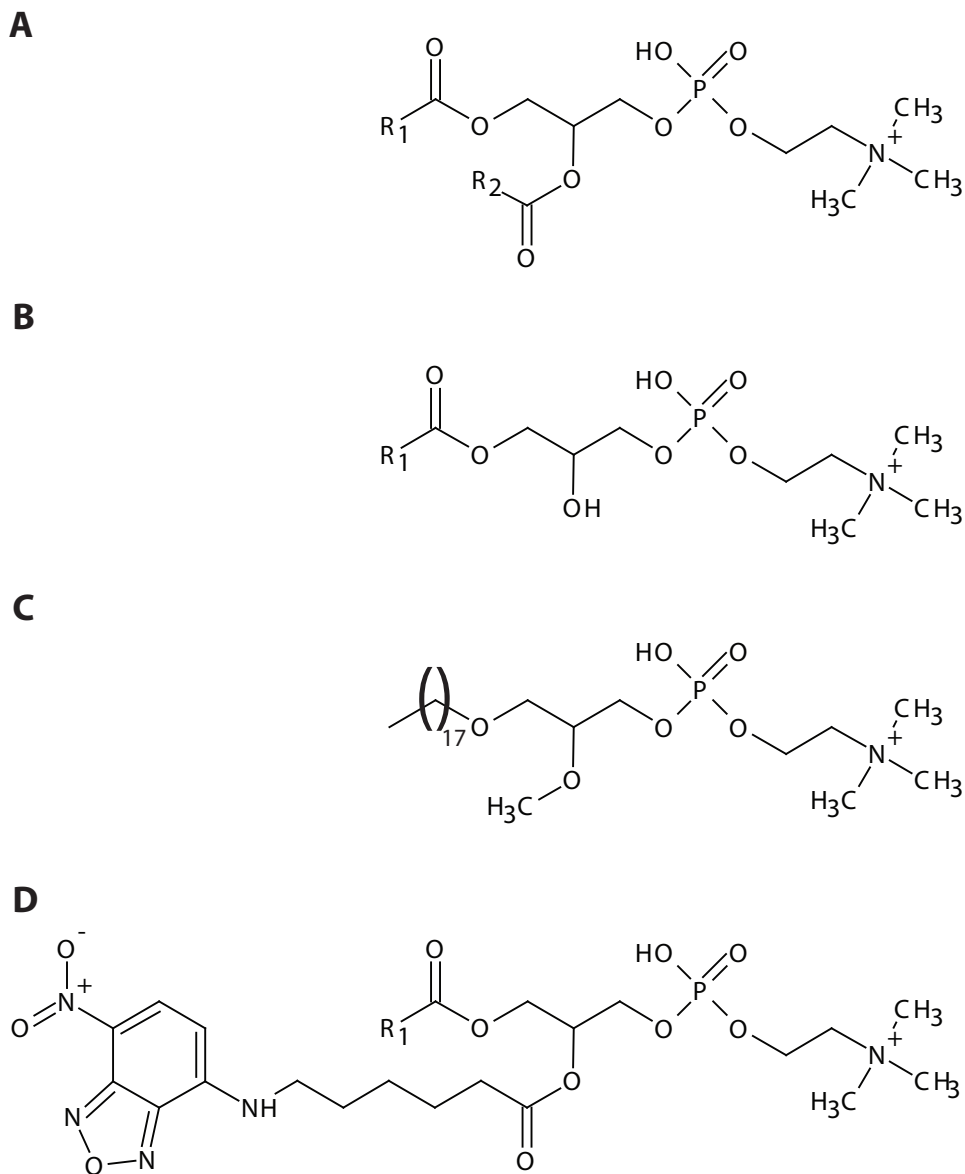


Ilustración 5: clases de sustratos de flipasas. Entre paréntesis, ejemplo representado en la ilustración. **A:** fosfolípidos (fosfatidilcolina). **B:** lisofosfolípidos (lisofosfatidilcolina). **C:** ATLS (edelfosina). **D:** análogos fluorescentes de fosfolípidos (NBDC₆-fosfatidilcolina). Adaptado de Riekhof y Voelker, 2009⁹⁴.

La principal actividad flipasa de la membrana plasmática (MP) depende de *DNF1/2*, acompañadas de la subunidad *LEM3*. Sus sustratos preferentes –fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina– tienen una distribución opuesta: mientras la fosfatidiletanolamina abunda en la cara citosólica de la membrana plasmática, la fosfatidilcolina está enriquecida en la cara extracelular¹³⁷, una distribución opuesta a la que promueve la flipasa. Esto podría indicar que las flipasas de MP, a pesar de ser capaces de translocar fosfolípidos de membrana, tienen otras funciones fisiológicas. Voelker y Riekhof han propuesto como función alternativa la incorporación de lípidos exógenos⁹⁴. Dicho proceso sería menos costoso energéticamente que la síntesis *de novo* a partir de componentes fundamentales (colina, etanolamina). Las levaduras crecen en la naturaleza en materiales en descomposición, un medio en el que los lípidos estarían disponibles, por lo que tendría sentido que poseyeran mecanismos específicos para su aprovechamiento. En distintos trabajos se demostró que las flipasas de MP permitían la incorporación de lisofosfatidiletanolamina⁹⁹ y lisofosfatidilcolina¹⁰⁰ (ilustración 5). La célula es capaz, una vez translocados estos lisofosfolípidos, de transformarlos muy rápidamente en los correspondientes fosfolípidos y transportarlas a orgánulos celulares. Según ese modelo, por tanto, las flipasas mediarían la translocación de lisofosfolípidos exógenos, que sería un primer paso esencial para su posterior transformación y transporte. Una consecuencia secundaria de la presencia de este mecanismo sería la rápida incorporación de moléculas análogas, como los ATLS (ilustración 5). Tanto edelfosina como miltefosina requieren de *LEM3* para su incorporación a la célula¹⁰¹, y *DNF1* participa en la incorporación de edelfosina¹⁰².

Esta función adicional de las flipasas de MP sin embargo no excluye su participación activa en el mantenimiento de la asimetría de la misma. La translocación por su parte de lípidos que sin embargo son mayoritarios en la cara extracelular podría tener lugar, siempre que existieran mecanismos que compensaran este transporte. Cabe señalar que la distribución de lípidos entre las dos caras depende no sólo de la actividad de las flipasas, sino también de las proteínas que median la translocación opuesta (flopasas). En este sentido, Pomorski y colaboradores monitorizaron la internalización de uno de los lípidos presentes en la MP (fosfatidiletanolamina) mediante derivatización química. En células con la membrana intacta la reacción de derivatización sólo puede afectar a los lípidos expuestos al medio extracelular. Un mutante *dnf1Δdnf2Δ* mostró, respecto al tipo silvestre, acumulación de fosfatidiletanolamina en la capa externa⁹⁶. La misma técnica mostró que un mutante en dos transportadores con actividad flopasa (*PDR5*, *YOR1*) exponía una menor cantidad en la membrana externa⁹⁶. La distribución de fosfatidiletanolamina entre ambas capas depende por tanto del equilibrio entre dos mecanismos opuestos, lo que podría ser extensible al resto de fosfolípidos de membrana. El papel de las flipasas de MP en el mantenimiento de la asimetría se ha determinado también mediante otras técnicas. Los péptidos citolíticos producen poros en la superficie celular, y su unión a la MP es dependiente de la presencia de fosfolípidos concretos. El péptido Ro, dependiente de fosfatidiletanolamina, es más tóxico en mutantes *dnf1Δdnf2Δ*⁹⁶ y *lem3Δ*⁹⁸, mientras que el péptido

PapB, dependiente de fosfatidilserina, es más tóxico en un mutante *dnf1Δdnf2Δ*¹⁴³. Esto indica que las flipasas de MP internalizan estos dos lípidos, participando en parte al menos en mantener niveles bajos de los mismos en la cara extracelular. Otro marcador de la presencia de fosfatidilserina en la cara externa es la proteína Anexina V, que se une al mismo. Los mutantes *dnf1Δdnf2Δ* y *lem3Δ* presentaron una mayor unión a Anexina V que el tipo silvestre¹⁴³. Existen, en resumen, diversas evidencias experimentales de que las flipasas *DNF1/2*, junto con *LEM3*, translocan los lípidos existentes en la membrana plasmática y participan en el mantenimiento de la asimetría de composición.

Existen evidencias contradictorias acerca de la participación de *DRS2* en la actividad flipasa de la MP. El mutante *drs2Δ* presenta incorporación reducida de fosfolípidos, que es aditiva con las mutaciones *dnf1Δdnf2*^{93,96,143}. Aunque Drs2p se localiza fundamentalmente en el TGN¹⁴⁰, una población de esta flipasa podría alcanzar la membrana plasmática y ejercer allí su función. No obstante, el mutante *drs2Δ* muestra también defectos en el tráfico vesicular, que a su vez podrían ser responsables de perturbar el tráfico de fosfolípidos normal. En ese sentido, en el mutante *drs2Δ* se observó mediante derivatización y unión a anexina V una translocación reducida de fosfatidilserina. Esa misma reducción se observó en otros mutantes en genes de endocitosis, exocitosis y recubrimiento de clatrina¹⁴³. Se ha sugerido que *DRS2* afectaría el tráfico vesicular provocando, mediante cambios en la composición lipídica de la membrana, modificaciones en su curvatura o asociación con proteínas reguladoras del transporte¹⁴⁶, y así participar en la formación de vesículas de secreción en el TGN. Esta función será presentada con mayor detalle en la siguiente sección.

Formación de microdominios de membrana *lipid raft*

Las membranas biológicas tienen una compleja composición de lípidos, que además se distribuyen heterogéneamente. Esta heterogeneidad se da entre las dos capas de las membranas (asimetría de membrana) y también en la distribución lateral de los lípidos. Los *lipid rafts* son microdominios cuya composición singular les confiere propiedades diferenciadas del resto de la membrana. Ya a principios de la década de los 80 se postuló la agrupación de ciertos lípidos en fases más ordenadas, formando microdominios que se moverían dentro de una fase más fluida compuesta por el resto de la membrana¹⁴⁹. Se propuso posteriormente que estos microdominios podrían formarse ya en la vía secretora y promover el reclutamiento de proteínas específicas. A partir de estas plataformas surgiría una vía secretora especializada que explicaría que determinadas regiones de la membrana plasmática tuvieran una composición lipídica y proteica diferenciada del resto¹⁵⁰. Estos microdominios, denominados *lipid rafts* (LR), fueron definidos como agrupaciones de esfingolípidos y esteroides que se asocian a proteínas específicas, como aquellas unidas covalentemente a glicofosfatidilinositol¹⁵¹. Esta composición lipídica implica un mayor empaquetamiento, comportándose los microdominios como fases ordenadas o de tipo gel frente a la membrana circundante, más desordenada (de ahí el término *raft*, balsa). Puede distinguirse distintos dominios de membrana con estas propiedades: desde

microdominios de unos 10-200 nm, dinámicos y con una vida media breve, hasta agrupaciones de los anteriores con mayor tamaño, visibles por técnicas convencionales de microscopía y que forman plataformas más estables en las membranas¹⁵².

Dos técnicas se han empleado habitualmente en el estudio de los LR. Las membranas resistentes a detergentes (DRM), que pueden aislarse mediante fraccionamiento celular, se han identificado con los LR, que por su composición son insolubles en detergentes no iónicos a 4 °C. Se ha considerado también que el tratamiento de las células con metil-β-ciclodextrina, un compuesto capaz de extraer los esteroides de las membranas, induce la desorganización de los LR¹⁵¹. El empleo de estas técnicas para determinar, de manera inequívoca, la asociación de proteínas con LR, la participación de estos microdominios en procesos biológicos o incluso la existencia de los mismos, ha sido motivo de controversia. El aislamiento de DRM es un proceso artificial, susceptible de artefactos experimentales y que podría agrupar membranas provenientes de distintos compartimentos celulares. La extracción de esteroides, por su parte, puede desorganizar los LR pero también inducir otros cambios celulares que podrían ser responsables de los resultados observados¹⁵². La existencia de los LR ha sido sin embargo confirmada mediante el empleo de técnicas avanzadas de microscopía, lipidómica o biofísica¹⁵².

Los DRM aislados en *Saccharomyces cerevisiae* presentan las características típicas de estos dominios. Contienen esfingolípidos y ergosterol, presentando una proporción de fosfolípidos menor que el resto de membranas, y se asocian a las proteínas ancladas a glicerofosfatidilinositol –como Gas1– así como a la ATPasa de membrana Pma1¹⁵³. Otras múltiples proteínas se han encontrado asociadas a los DRM, entre ellas Sur7, Can1 y Fur4¹⁵⁴. En los experimentos de fraccionamiento de la membrana plasmática la gran mayor parte de las proteínas se asocian de hecho con los DRM¹⁵³. La existencia en la MP de microdominios ordenados ha sido además comprobada *in vivo* por métodos biofísicos¹⁵⁵. Ciertas proteínas se asocian a regiones específicas de la MP, que podrían representar microdominios o agrupaciones de los mismos y pueden observarse por microscopía. Las fusiones de una proteína fluorescente con Can1 muestran un patrón de distribución en la superficie celular en parches¹⁵⁶. Este mismo patrón se ha observado para otras proteínas localizadas en los DRM¹⁵⁴. Se ha estimado que el tamaño de estos parches es de alrededor de 300 nm. Este tamaño es mayor que lo convencionalmente establecido para los microdominios. Si los LR de levadura se comportan de igual manera que en otros organismos, los parches probablemente constituyan agregados estables de LR.

Existen al menos dos poblaciones de LR diferenciadas, caracterizadas por asociarse a las proteínas Can1 (compartimento de membrana C, MCC) o Pma1 (compartimento de membrana P, MCP)¹⁵⁶. MCP tiene una morfología de retículo que rodea y se intercala entre los parches de MCC: los dos dominios no colocalizan. Los parches de MCC son además estables durante al menos 90 minutos¹⁵⁶ y su mantenimiento no depende del citoesqueleto o la pared celular¹⁵⁴. El ergosterol de la MP se acumula preferentemente en el MCC¹⁵⁷, así como una gran parte de las proteínas asociadas a

los DRM¹⁵⁸. Se ha detectado sin embargo la presencia de microdominios compuestos preferentemente por esfingolípidos y carentes en gran medida de ergosterol en la MP¹⁵⁵. La asociación de Pma1 con los DRM parece depender de los esfingolípidos y no del ergosterol¹⁵⁹, y de hecho la depleción de ergosterol tuvo un efecto limitado sobre la asociación de Pma1 con los DRM, mientras que los esfingolípidos resultaron esenciales para esta asociación¹⁵³. Sin embargo, los DRMs de *Saccharomyces cerevisiae* concentran esfingolípidos y ergosterol¹⁵³. Los anteriores resultados sugieren la presencia de al menos dos tipos de *lipid raft* en la membrana plasmática. Pma1 se asociaría con microdominios enriquecidos en esfingolípidos y fundamentalmente presentes en el compartimento MCP; por el contrario, Can1 (entre otras proteínas) se asociaría con microdominios enriquecidos en ergosterol y presentes en el compartimento MCC. Ambos dominios conformarían los DRM, y se extraerían juntos en experimentos de fraccionamiento celular.

La organización de los parches de MCC parece depender de unos complejos denominados eisosomas: los parches colocalizan con componentes de los eisosomas, y mutaciones en dichos componentes provocan la disgregación de los parches^{157,160}. Los eisosomas son complejos proteicos asociados a la cara citosólica de la MP en puntos estáticos de las mismas^{161,162}. Estos complejos participan en la regulación de la endocitosis mediante mecanismos aún por esclarecer completamente. Inicialmente se planteó que los eisosomas marcaban puntos permanentes de endocitosis en la MP¹⁶¹. El mecanismo de endocitosis en levadura implica una compleja secuencia de reclutamiento de proteínas¹⁶³. Sin embargo, los parches del MCC no colocalizan con marcadores tempranos ni tardíos de endocitosis^{158,164}. Se ha propuesto, por el contrario, que los eventos endocíticos se concentran en MCP y que la presencia de una proteína en MCC la protege de la endocitosis. Can1 y Fur4 son proteínas regulables, y puede estimularse su degradación mediante endocitosis. Cuando eso ocurre, pierden su asociación exclusiva con MCC. Su vida media es además más reducida en mutantes del eisosoma¹⁵⁸. Sin embargo, otros grupos no han sido capaces de reproducir estos resultados¹⁶⁴, por lo que la relación del MCC/eisosoma con la endocitosis carece todavía de una explicación firme. Los parches MCC comparten varias características con las caveolas de mamíferos: también se forman alrededor de una invaginación de la MP, presentan un recubrimiento (caveolina) en la cara citosólica de la membrana, y concentran microdominios de tipo *lipid raft* en agregados mucho mayores y estables¹⁶⁵. Se ha sugerido que los parches MMC y las caveolas podrían actuar de reservorios lipídicos y proporcionar flexibilidad a la MP¹⁶⁶.

Tráfico vesicular en el *trans*-Golgi

El *trans*-Golgi (TGN) reúne tres funciones esenciales: es el término de la vía de síntesis y maduración de proteínas que comienza en el retículo endoplásmico y continúa en el aparato de Golgi; un centro de distribución de las mismas en vesículas, mediante las cuales se organiza el tráfico intracelular; y la conexión entre el aparato de Golgi y los endosomas, de los que recibe componentes

que deben reciclarse¹⁶⁷. El tráfico vesicular originado en el TGN comprende distintos mecanismos (ilustración 6). Existen varios tipos de vesículas de secreción destinadas a la membrana plasmática, distinguibles por su densidad y por las proteínas que transportan^{168,169}. La formación de las vesículas que transportan invertasa depende del recubrimiento de clatrina¹⁶⁸; por el contrario, las vesículas de secreción que transportan la ATPasa de membrana Pma1 no emplean tal recubrimiento¹⁷⁰. Las vesículas destinadas a los endosomas tempranos, endosomas tardíos y vacuola se asocian con distintas proteínas, y en los dos primeros casos dependen también de clatrina¹⁷¹.

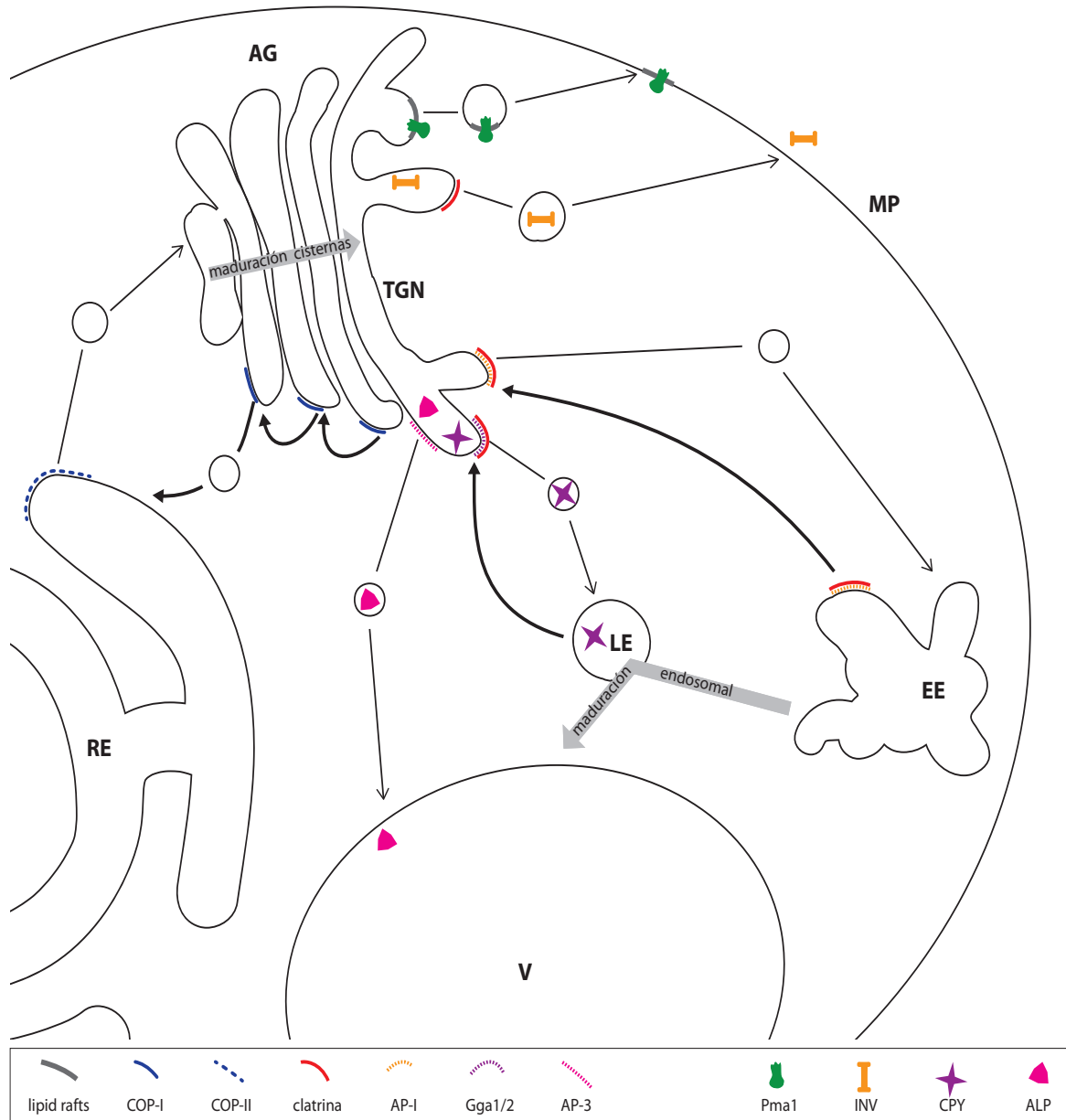


Ilustración 6: transporte vesicular a través del aparato de Golgi. RE: retículo endoplásmico. AG: aparato de Golgi. TGN: red del *trans*-Golgi. MP: membrana plasmática. EE: endosoma temprano. LE: endosoma tardío. V: vacuola. INV: invertasa (Suc2p). CPY: carboxipeptidasa Y (Prc1p). ALP: fosfatasa alcalina (Pho8p). Las flechas rectas con punta abierta indican transporte anterógrado y las flechas curvas con punta cerrada indican transporte retrógrado. Las proteínas adaptadoras, de recubrimiento y carga típicas de cada vía de transporte se indican en la leyenda. Adaptado de Muthusamy *et al*, 2009¹⁷¹.

La formación de vesículas en las membranas internas implica varios componentes. Las GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras son reguladores maestros: su activación permite que las proteínas de recubrimiento sean reclutadas y se asocien con las membranas. Los recubrimientos forman un armazón asociado a la vesícula nascente, interactúan con la carga proteica que debe ser transportada en la vesícula e inducen la curvatura y gemación de la misma. Los recubrimientos se asocian además con proteínas adaptadoras, que dotan de especificidad de carga y de función a las vesículas, aun cuando comparten un mismo recubrimiento. Finalmente, los lípidos presentes en las membranas intervienen mediante su interacción con las GTPasas, proteínas del recubrimiento y proteínas adaptadoras.

Formación de vesículas recubiertas de clatrina

Las GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras, a la que pertenece *ARF1*, actúan como interruptores de diversos procesos biológicos. El estado de las proteínas depende del nucleótido de guanina al que estén asociadas: cuando están unidas a GDP se han inactivas, y al unirse a GTP se activan, pudiendo interactuar con efectores específicos. Las proteínas pueden además asociarse a membranas mediante un grupo lipídico conjugado. Estas GTPasas se regulan modificando el nucleótido de guanina unido a la proteína (y, en algunos casos, la capacidad de la proteína de interactuar con membranas). Se denominan factores intercambiadores de nucleótido de guanina (GEF) a los reguladores (activadores) encargados de intercambiar GDP por GTP. Las mismas GTPasas son capaces de hidrolizar ese GTP a GDP lentamente; los reguladores (inactivadores) encargados de acelerar esa hidrólisis se denominan proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP). Una misma GTPasa, según su función o localización subcelular, puede ser modulada por GEFs y GAPs distintas. Esto permite una especificidad en la regulación de las GTPasas y los circuitos biológicos que éstas controlan.

ARF1 es esencial para múltiples procesos de transporte vesicular, y aunque existe en levadura otro gen homólogo de función redundante, *ARF2*, es fisiológicamente poco relevante al expresarse a niveles mucho menores¹⁷². *ARF1* participa en la formación de vesículas recubiertas con COPI, durante el transporte retrógrado entre las cisternas del Golgi o entre éste y el retículo endoplásmico¹⁷³ (ilustración 6). *ARF1* participa también en la formación de varios tipos de vesículas recubiertas con clatrina¹⁷⁴ (ilustración 6). Para ello, en el transporte retrógrado endosoma–Golgi recluta el complejo adaptador AP-1¹⁷⁵. En el transporte TGN–endosoma se asocia, en dominios diferenciados, a proteínas adaptadoras distintas¹⁷⁶. Se generan así vesículas con destinos distintos: endosoma tardío (proteínas adaptadoras Gga1/2^{177,178}) o endosoma temprano (complejo adaptador AP-1¹⁷⁹). Finalmente, la formación de las vesículas de secreción que transportan invertasa requiere del recubrimiento de clatrina¹⁶⁸ y de *ARF1*¹⁸⁰.

Las GAPs de ARF regulan su actividad y actúan de efectores

La secuencia del modelo estándar de formación de vesículas en el TGN establece que la GTPasa Arf, una vez activada (unida a GTP), interaccionaría con las proteínas del recubrimiento, que a su vez iniciarían la gemación de la vesícula. La inactivación de Arf por su GAP (que provocaría la hidrólisis del GTP) se produciría posteriormente, una vez formada la vesícula, provocando la disociación del recubrimiento. Este modelo no explica sin embargo las interacciones entre componentes del tráfico vesicular completamente, especialmente el papel de las ArfGAPs, por lo que ha sido cuestionado¹⁸¹. Estas proteínas deberían reducir la actividad de Arf si actuaran únicamente como reguladores negativos; sin embargo, en un mutante *arf1* con defectos de crecimiento, la sobreexpresión de ArfGAPs tienen el efecto contrario: son capaces de suprimir el defecto en el crecimiento¹⁸². Las ArfGAPs también interaccionan directamente con lípidos como el inositol-4-fosfato y el diacilglicerol, que promueven el tráfico vesicular (ver siguiente sección, *Requerimientos lipídicos del tráfico vesicular en el TGN*). De hecho, determinados defectos en el tráfico vesicular pueden complementarse con mutaciones que modulan la composición lipídica de las membranas internas, pero esta complementación requiere forzosamente de la presencia de ArfGAPs^{183,184}. Estas observaciones sugieren un modelo alternativo en que las ArfGAPs serían efectoras de Arf, con funciones esenciales en el reclutamiento de carga y de recubrimientos a las vesículas. En este modelo, Arf no actuaría como interruptor del proceso de formación de vesículas. Se produciría el reclutamiento secuencial de Arf, que a su vez reclutaría a sus GAPs. En su función reguladora las ArfGAPs inactivarían a su vez a Arf, que podría liberarse. Esta retroalimentación negativa del proceso facilitaría que Arf iniciara nuevos ciclos de formación de vesículas. En su función efectora, las ArfGAPs permanecerían asociadas a la vesícula, interaccionando con las proteínas del recubrimiento o de la carga¹⁸¹.

Existen cuatro GAPs de Arf en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*: *GCS1*, *GLO3*, *AGE1* y *AGE2*¹⁸². Los cuatro genes son redundantes al menos parcialmente, ya que ninguno de sus mutantes de delección es inviable¹⁸⁵. En los dobles mutantes de ArfGAPs únicamente muestra letalidad sintética *gcs1Δ*, con *glo3Δ* o *age2Δ*, y sólo el triple mutante que mantiene el gen *GCS1* es viable. En combinación con el mutante *arf1Δ* sólo aparece letalidad sintética con *gcs1Δ*¹⁸⁵. Esto parece indicar que *GCS1* juega un papel más fundamental como efector de Arf. Las localizaciones en las que Arf participa en el tráfico vesicular son dos. De hecho, *GCS1* es la única GAP que participa en los dos sitios de acción de Arf. En el transporte retrógrado entre el Golgi y el retículo endoplásmico interviene junto a *GLO3*¹⁸⁶. Experimentos de secreción de invertasa indican que *GCS1* también participa, con *AGE1* y *AGE2*, en el TGN¹⁸⁵. Aunque *GCS1* y *AGE2* son las principales ArfGAPs del TGN¹⁸³, *AGE1* también participa en el transporte en esa región, dado que su sobreexpresión puede complementar los defectos en un doble mutante en las otras dos ArfGAPs¹⁸⁴. Los defectos de transporte que presentan los mutantes de las tres ArfGAPs indican que éstas participan en, al menos, la secreción de invertasa¹⁸⁷, el transporte retrógrado endosoma temprano-TGN¹⁸⁴ y el transporte TGN-endosoma tardío¹⁸³.

Requerimientos lipídicos del tráfico vesicular en el TGN

Los distintos compartimentos de las rutas secretora y endosomal están enriquecidos en fosfoinosítidos característicos, que interactúan específicamente con las proteínas que actúan en dichos compartimentos¹⁸⁸. La especie más abundante en el TGN es el fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P)¹⁸⁸, y tiene un papel primordial en la formación de vesículas de secreción¹⁸⁹ y dirigidas al endosoma temprano¹⁷⁶ o tardío¹⁹⁰. PI4P dirige el tráfico vesicular facilitando el anclaje a las membranas de diversas proteínas implicadas en el tráfico vesicular del TGN: la proteína adaptadora Gga2¹⁹¹ (e, indirectamente, el complejo adaptador AP-1¹⁷⁶), la flipasa Drs2¹⁹², y las ArfGAPs Gcs1¹⁸³, Age2¹⁸³ y Age1¹⁸⁴, que poseen un dominio de unión a fosfoinosítidos (dominio pleckstrina)¹⁸³.

El transporte vesicular en el TGN depende también del equilibrio entre PC y DAG¹⁹³. La presencia de fosfolípidos con una cabeza polar poco voluminosa (DAG o su precursor ácido fosfatídico) en las membranas biológicas provoca su deformación. En membranas artificiales inmersas en un medio químicamente semejante al lumen del aparato de Golgi, estos lípidos son capaces de difundir entre capas e impartir a la membrana la curvatura necesaria para la formación de las vesículas¹⁹⁴. Por el contrario, la PC tiene una geometría cilíndrica que no promueve la deformación de las membranas. Una función adicional del DAG es interactuar directamente con proteínas implicadas en la formación de vesículas.

El equilibrio PC/DAG está fundamentalmente determinado por la acción de dos genes: *SEC14* y *SPO14*. *SEC14* codifica una proteína transportadora de lípidos, capaz de unirse a fosfatidilinositol o a fosfatidilcolina. Sec14p-fosfatidilcolina inhibe la síntesis de PC y, como consecuencia, aumenta la disponibilidad de DAG, dado que esa ruta biosintética consume DAG (ilustración 4). Por tanto, modula simultáneamente la disponibilidad de ambos lípidos en pos de una composición que favorezca el transporte vesicular¹⁹³. La otra forma de la proteína, Sec14p-fosfatidilinositol, estimula la transformación de PI en PI4P, que es necesario para la unión a proteínas de recubrimiento. Además, a partir del PI4P se genera fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, que recluta la fosfolipasa D (PLD), codificada por el gen *SPO14*¹⁹³. La PLD es el enzima responsable de convertir PC en ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico es a su vez el sustrato a partir del cual se genera DAG por hidrólisis del enlace fosfoéster. Tanto el ácido fosfatídico como el DAG promueven la curvatura de las membranas. La acción de la PLD conduce, por tanto, a una distribución de lípidos favorable al transporte vesicular, modulando el mismo equilibrio PC/DAG al igual que Sec14p-fosfatidilcolina aunque empleando para ello mecanismos distintos.

La influencia sobre las ArfGAPs del TGN de los dos lípidos, DAG y PI4P, es compleja. Como se comentó, *GCS1*, *AGE1* y *AGE2* poseen un dominio pleckstrina de unión a fosfoinosítidos. Gcs1p no es capaz de unirse a DAG y sí a PI4P; sin embargo, la suplementación con DAG exógeno sí es capaz de complementar a un mutante *gcs1* de función reducida¹⁸⁷. Esto parece indicar que PI4P podría

participar en el reclutamiento de Gcs1p, aunque no sería esencial, y que la curvatura inducida por DAG (y no la interacción directa con DAG) activaría a Gcs1p. Ambos supuestos se han extendido también a Age2p¹⁸³. Age1p sí se une a DAG, y su función es dependiente del mismo¹⁸⁴.

Un último requerimiento lipídico del transporte en el TGN se refiere no a la composición de las membranas sino a la distribución asimétrica de los lípidos, mediada por la flipasa *DRS2* y su subunidad accesoria *CDC50* (ya mencionadas en la sección *Transporte de aminofosfolípidos por flipasas*). Diversas evidencias indican que *DRS2* juega un papel esencial en la formación de vesículas en el TGN. Los mutantes *drs2* y *cdc50* tienen defectos en secreción y transporte TGN-endosomas semejantes a los observados en mutantes *arf1*^{140,143}. Así mismo, la mutación *drs2* presenta letalidad sintética con *arf1*¹⁷⁴, un alelo termosensible de la cadena pesada de clatrina *chc1*¹⁴⁰ o con la doble mutación *gga1gga2*¹⁹⁵. De modo semejante, el mutante *cdc50* presenta letalidad sintética con *arf1*¹⁴³ y *gcs1*¹⁹⁶. Por tanto, *DRS2* parece participar en la formación de vesículas recubiertas de clatrina en el TGN. De hecho el mutante *drs2* tiene una cantidad reducida de vesículas recubiertas de clatrina¹⁴⁰. De entre las rutas mediadas por vesículas recubiertas de clatrina, *DRS2* participa en el transporte anterógrado y retrógrado entre el TGN y el endosoma, asociado al adaptador AP-1¹⁹⁵, además de en la formación de vesículas secretoras¹⁴¹.

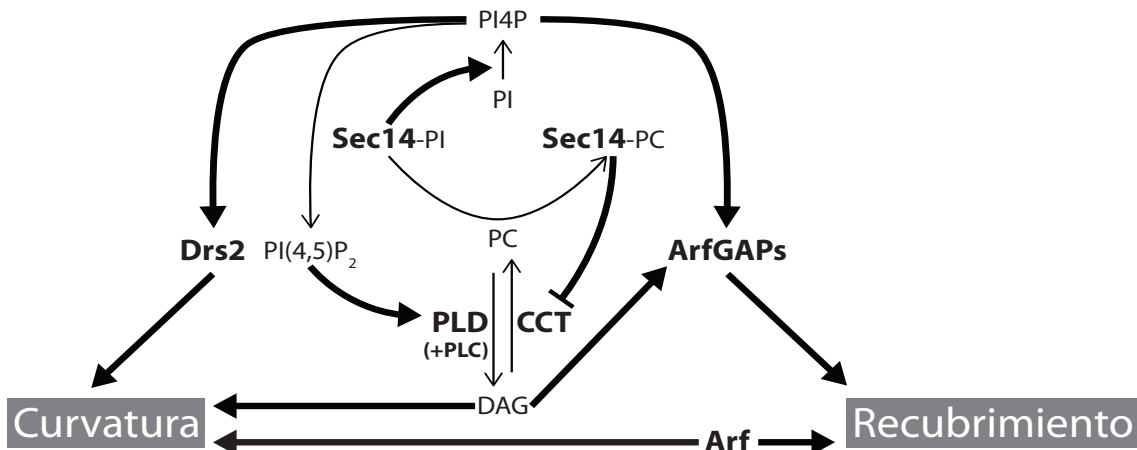


Ilustración 7: modulación lipídica de la formación de vesículas recubiertas de clatrina. En el esquema se incluyen también vías de transporte endosomales. Las flechas finas representan rutas resumidas de transformación de lípidos. Las flechas gruesas representan la modulación de procesos: activación/reclutamiento (cabezas triangulares) o inhibición (cabezas en T). Los lípidos se representan en letras normales, y las proteínas implicadas en negrita.

El mutante *drs2*, además de un número reducido de vesículas recubiertas de clatrina, acumula recubrimientos incompletos de clatrina que no están asociados a membrana¹⁴⁰. Sin embargo, *DRS2* no recluta directamente la clatrina o el complejo AP-1 al TGN, aunque se asocia transitoriamente con ambos¹⁹⁵. Se ha postulado por tanto que en la formación de vesículas en el TGN cooperan dos procesos: el mediado por *DRS2* y la formación del recubrimiento de AP-1 y clatrina. El recubrimiento se asocia con las membranas con independencia de *DRS2*, que sin embargo es esencial para que el proceso culmine en la gemación de la vesícula¹⁹⁵. En el modelo propuesto, el proceso adicional que

proporciona *DRS2* es la deformación de la membrana¹⁴⁶. Actuando como flipasa, *Drs2p* translocaría lípidos a la cara citosólica del TGN. Según la hipótesis de la bicapa lipídica acoplada, las membranas con un desequilibrio entre el número de moléculas lipídicas en ambas capas tienden a compensarlo curvándose hacia la cara con más moléculas¹⁹⁷. Por tanto, la actividad flipasa facilitaría, junto con el DAG, la curvatura de la membrana. Posteriormente, a través de *Arf1*, *ArfGAPs*, proteínas adaptadoras y recubrimiento, se incrementaría esta curvatura hasta formarse una vesícula¹⁴⁶. En la ilustración 7 se representa un modelo de los factores lipídicos que intervienen en la formación de vesículas recubiertas de clatrina en el TGN.

Vía secretora de la ATPasa de membrana Pma1

En el TGN se forman dos tipos de vesículas de secreción. Las vesículas con mayor densidad transportan proteínas específicas, como la invertasa, y en su formación interviene un recubrimiento de clatrina¹⁶⁸. Las vesículas de menor densidad se forman mediante un mecanismo diferente, que emplea *lipid rafts*¹⁷⁰ (ilustración 6). La carga proteica específica de vesículas de alta densidad se desplaza, en mutantes con defectos en la formación de estas vesículas, a la otra clase de vesículas de secreción¹⁶⁸. La carga proteica de las vesículas cuyo destino es el endosoma tardío o a la vacuola sufre, en mutantes con defectos en esas rutas, esa misma translocación¹⁶⁸. Las vesículas de baja densidad son por tanto el destino por defecto de la carga proteica en el TGN. Sólo la interacción de cargas específicas con proteínas adaptadoras y de recubrimiento provoca su incorporación a otros tipos de vesículas.

Las vesículas de secreción de baja densidad transportan, entre otras, a la ATPasa *Pma1p*¹⁹⁸, una de las proteínas más abundantes en la membrana plasmática. *Pma1p* consume ATP para bombear protones al medio extracelular. La translocación de cargas positivas en uniporte a través de la MP es electrogénica, y de hecho *Pma1p* es la principal responsable de la generación del potencial de membrana en *S. cerevisiae*¹⁹⁹. *PMA1* es uno de los mecanismos críticos para la homeostasis del pH celular²⁰⁰. El transporte de nutrientes está acoplado en múltiples casos al potencial electroquímico de membrana y por tanto depende también de *PMA1* como fuente de energía²⁰¹. Todo lo anterior explica que *PMA1* sea un gen esencial para la célula²⁰².

La asociación de proteínas de membrana con los LR comienza durante la vía secretora, ya en el RE¹⁵³ o en el AG²⁰³, y hay evidencias contradictorias respecto a en cuál dos orgánulos se produce la asociación de *Pma1* con los LR^{198,204}. Mutaciones en la síntesis de esfingolípidos e inhibidores de la misma evitan que *Pma1* se incorpore a la vía secretora normal a partir del AG, desviándose a través de la ruta endocítica a la vacuola, donde se degrada^{159,198,204}. La asociación de *Pma1* es dependiente de los esfingolípidos, pero no del ergosterol¹⁵⁹. Esto encaja con la exclusión de *Pma1* del compartimento MCC de la membrana plasmática, enriquecido en ergosterol¹⁵⁷. Los esfingolípidos de *S. cerevisiae* portan ácidos grasos de cadena larga, sintetizadas a partir de cadenas más cortas (C16/18) por las

elongasas codificadas por los genes *ELO2/FEN1* (hasta C22/24) y *ELO3/SUR4* (hasta C26)²⁰⁵. Estas cadenas largas son esenciales para la asociación de Pma1 en los LR y su estabilidad^{159,206}. De hecho, los esfingolípidos son prescindibles en presencia de una aciltransferasa mutada, capaz de incorporar ácidos grasos de cadena larga a inositolfosfolípidos. Mediante estos últimos lípidos, Pma1 es capaz de incorporarse a LR, adquirir estabilidad y alcanzar la membrana plasmática²⁰⁷.

Los primeros modelos de secreción mediada por LR ya postulaban que agregados de lípidos y proteínas en el TGN actuarían como plataformas para la formación de vesículas de secreción¹⁵⁰. Las vesículas de secreción de baja densidad que transportan Pma1 y otras proteínas asociadas a LR son las mismas²⁰⁸, y su composición lipídica revela un enriquecimiento en esfingolípidos y ergosterol²⁰⁸. Las membranas de estas vesículas tienen un mayor empaquetamiento que el TGN²⁰⁹, aunque los ácidos grasos de los lípidos de ambos compartimentos tienen un grado de insaturación y una longitud semejante²⁰⁸. Esta estructura más ordenada de las vesículas de secreción se ha asociado por tanto a su mayor concentración de esfingolípidos y ergosterol. Puede concluirse que los lípidos constituyentes de los LR y las proteínas asociadas a los mismos comparten las mismas vesículas secretoras. El hipotético reclutamiento de proteínas mediado por LR no se ha observado en el TGN directamente; sin embargo, la asociación de Pma1 con los microdominios lipídicos se produce o está ya presente en este orgánulo^{198,204}. Estos resultados apoyan un modelo en el que agregados de LR forman plataformas de reclutamiento en el TGN, a partir de las cuales surgen vesículas de secreción con una composición lipídica y proteica diferenciada¹⁷⁰.

La mecánica de la formación de vesículas de secreción de Pma1 en el TGN no se ha resuelto todavía. La misma existencia de agregados de LR de gran tamaño podría promover la curvatura o vesiculación, al generar una tensión en la interfase entre el agregado y la membrana circundante¹⁷⁰. Este mecanismo podría además colaborar con otros para promover la curvatura o la formación de vesículas (aunque no con recubrimiento de clatrina o proteínas adaptadoras, que no participan aquí). Las vesículas de secreción de Pma1 tienen un bajo contenido en fosfatidilcolina y están enriquecidas en ácido fosfático²⁰⁸, lo que podría indicar una composición lipídica favorable a la curvatura. Además, al igual que sucede con la formación de vesículas recubiertas de clatrina, Sec14 es necesaria para la secreción de Pma1²¹⁰. Por tanto, los mecanismos que promueven la formación de vesículas en el TGN son en al menos algunos casos compartidos por las vesículas secretoras de Pma1 y las vesículas recubiertas de clatrina.

Tráfico vesicular en los endosomas

Los endosomas son los elementos centrales de un circuito de entrada, reciclaje y degradación de moléculas biológicas que implica además a otros orgánulos²¹¹. Los endosomas tempranos (*early endosomes*, EEs) son compartimentos tubulovesiculares con diversos dominios de funciones especializadas. El transporte de entrada a los EEs tiene dos orígenes: vesículas endocíticas, provenientes

de la membrana plasmática, y vesículas portadoras de enzimas necesarios para la función endosomal, procedentes del TGN. Las regiones tubulares de los EEs forman un compartimento especializado de reciclaje²¹². Su función es devolver tanto a la MP como al TGN^{213,214} membranas, receptores y otros factores proteicos necesarios para el tráfico vesicular. El material restante que no sufre reciclaje se mantiene en las regiones vesiculares. De dichas regiones se derivan los endosomas que se especializan en la digestión de biomoléculas y sufren un proceso de maduración, pasando a denominarse endosomas tardíos (*late endosomes*, LEs).

Durante la maduración los LEs se alejan de la periferia celular, se fusionan entre sí, adquiriendo una forma más esférica²¹⁵, y se acumulan vesículas en su interior, aumentando la densidad del orgánulo. Se producen además en la membrana y lumen de los LEs cambios bioquímicos²¹¹, que determinan la especificidad de fusión de las membranas y permiten la función degradativa del orgánulo. En los endosomas tardíos, de manera análoga a lo que sucede en los tempranos, existen también procesos de reciclaje de moléculas al TGN.

Complejo ESCRT y formación del cuerpo multivesicular

El destino final de los LEs es la fusión con la vacuola y la liberación en su interior de los contenidos del lumen endosomal, que serán digeridos. Las proteínas que deban digerirse también pueden encontrarse en las membranas endosomales. En este caso se forman a partir de la membrana invaginaciones y, finalmente, vesículas intraluminales, que quedan retenidas en el endosoma generándose un cuerpo multivesicular (MVB). Las proteínas a degradarse quedan incorporadas en las vesículas intraluminales, que son a su vez degradadas del mismo modo que los componentes solubles del lumen. Durante el proceso y hasta que se completa su eliminación, las proteínas secuestradas en los MVBs quedan además aisladas de toda interacción con el resto de componentes del citoplasma. Aunque la formación de MVB comienza ya en los endosomas tempranos, una característica de los LEs es su agrupamiento y el aumento del número de vesículas²¹⁵.

Se denomina ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) al conjunto de recubrimientos y oligómeros proteicos²¹⁶⁻²¹⁹ que llevan a cabo la formación de vesículas del MVB y, por tanto, la incorporación de proteínas desde la membrana endosomal a esta ruta degradativa. Los componentes conocidos de cada complejo se resumen en la tabla 1. Existen interacciones directas (extensamente revisadas²²⁰⁻²²³) entre los distintos complejos ESCRT y con el resto de componentes celulares: fosfoinosítidos que se hallan enriquecidos en las membranas endosomales, y los sustratos a degradar, marcados por ubiquitinación.

Tabla 1: interacciones entre complejos proteicos ESCRT y con elementos de la membrana. Ub: ubiquitina. Adaptada de: Williams y Urbé, 2007²²¹; Hurley y Hanson, 2010²²³.

| Complejo | Gen | Interacciones |
|----------------|--------------|---|
| 0 | <i>VPS27</i> | Ub, PI3P, ESCRT-I (Vps23p), Clatrina |
| | <i>HSE1</i> | Ub |
| I | <i>VPS23</i> | ESCRT-0 (Vps27p), Ub |
| | <i>MVB12</i> | Ub |
| | <i>VPS37</i> | Membrana |
| | <i>VPS28</i> | ESCRT-II (Vps36p) |
| II | <i>VPS36</i> | Ub, PI3P, ESCRT-II (Vps28p) |
| | <i>VPS22</i> | |
| | <i>VPS25</i> | ESCRT-III (Vps20p) |
| III | <i>VPS2</i> | Interacción entre sí, con PI(3,5)P2 y con Vps4p |
| | <i>VPS20</i> | |
| | <i>VPS24</i> | |
| | <i>SNF7</i> | |
| Complejo Vps4p | <i>DID2</i> | |
| | <i>VPS60</i> | |
| | <i>IST1</i> | |
| | <i>VPS4</i> | Subunidades del ESCRT-III |
| | <i>VTA1</i> | |

La conjugación de una única ubiquitina (o una corta cadena de ubiquitinas) era conocida como una señal de degradación de varios sustratos (el receptor de feromona o transportadores de aminoácidos, entre otros) mediante su incorporación al endosoma²²⁴. El descubrimiento del ESCRT permitió relacionar la ubiquitinación con la formación del MVB y así explicar el funcionamiento de esta vía de degradación endosomal de proteínas^{216,225}. Los complejos ESCRT-0/I/II actúan de adaptadores entre los sustratos a degradar y el endosoma, a través de sus dominios de unión a ubiquitina y sus dominios de unión a fosfoinosítidos respectivamente. La naturaleza y número de los componentes de cada complejo es constante, e interaccionan entre sí por regiones específicas de unión (ilustración 8). El complejo ESCRT-0 (y, a través de él, el resto de complejos) puede interaccionar también con recubrimientos de clatrina, que se encuentran en dominios específicos del endosoma. Mediante esta interacción, los complejos ESCRT se concentran y forman agregados macromoleculares. Las interacciones entre cada complejo y los lípidos del endosoma o la ubiquitina son relativamente débiles. En los agregados macromoleculares, sin embargo, se producen numerosas interacciones en un espacio muy reducido, por lo que la interacción resultante es una unión cooperativa de mayor afinidad²²². Simultáneamente, la presencia de una cantidad reducida de moléculas sustrato de ESCRT puede inducir la progresiva concentración local de sustratos mediante un bucle de retroalimentación positiva. Los sustratos iniciales provocan el reclutamiento de ESCRT0/I/II mediante uniones de baja afinidad. Los agregados de complejos ESCRT que se forman entonces se pueden unir cooperativamente. A raíz de esta afinidad incrementada aumenta el reclutamiento de sustratos, que se concentran cada

vez más. Así, mediante las interacciones entre clatrina, ESCRT y los sustratos a degradar se logra la concentración local de los sustratos y de los complejos ESCRT.

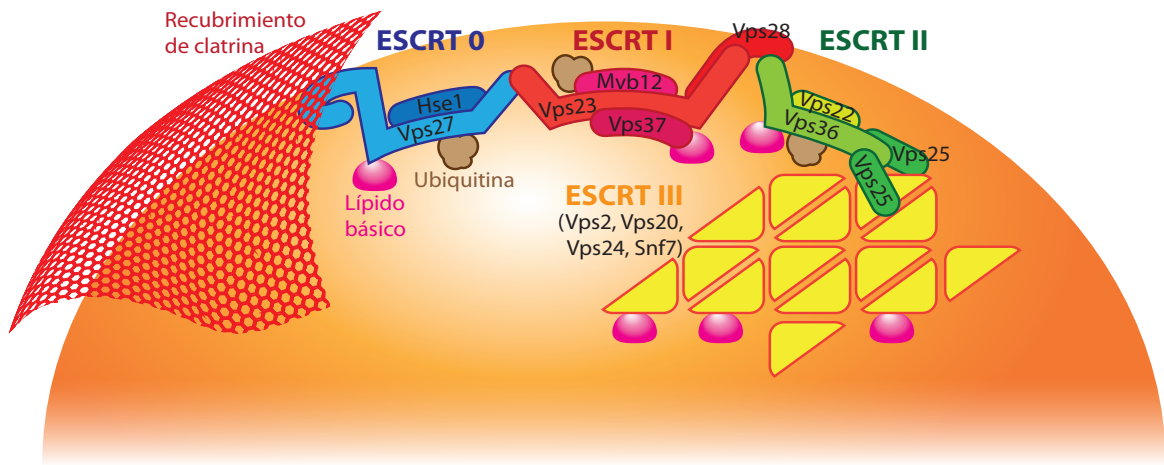


Ilustración 8: componentes e interacciones de los complejos ESCRT.

Según los modelos más recientes, ESCRT-I/II tienen otra función fundamental: la formación en la membrana endosomal de invaginaciones, que posteriormente se convertirán en las vesículas intraluminales del MVB²²³. ESCRT-0/I/II tienen funciones semejantes en la formación del MVB, lo que sugiere que no hay una secuencia estricta de reclutamiento en la que las moléculas reconocidas pasan de un complejo a otro²²¹. Sin embargo el complejo ESCRT-III sí actúa siempre en último lugar, ya que su función es finalizar la formación de las vesículas del MVB. A diferencia de los otros complejos, en el ESCRT-III intervienen varias proteínas con estructura semejante, que forman un recubrimiento de extensión y composición variable^{220,221} (ilustración 8). La función principal de ESCRT-III es el estrangulamiento de las invaginaciones, lo que lleva a la formación de las vesículas intraluminales definitivas²²⁶. El recubrimiento interactúa además con ubiquitín-proteasas como Doa4 (reclutada a través de Bro1)²²⁰. La desubiquitinación sucede antes de la incorporación de los sustratos a las vesículas, previene la degradación de la ubiquitina y permite su reciclaje. ESCRT-III facilita también el ensamblaje de la ATPasa multimérica Vps4 y sus unidades accesorias²²³. Vps4 cataliza la separación de los componentes del ESCRT-III del endosoma, interrumpiendo la formación de vesículas del MVB hasta que los complejos ESCRT vuelvan a ser reclutados en un nuevo ciclo de formación de vesícula.

Maduración de los endosomas

Las muy distintas características morfológicas y bioquímicas de los endosomas tempranos y tardíos (revisadas por Huotari y Helenius²¹¹) reflejan sus funciones diferenciadas. Los dominios tubulares del EE, desde donde se organiza el reciclaje por vesículas, no están presentes en el LE, cuya única función es la degradación de sus contenidos. El LE actúa como transportador de las hidrolasas digestivas a la vacuola y también como primer compartimento digestivo, razón por la que sufre una progresiva acidificación, siendo su pH intermedio entre el vacuolar y el de los EEs. La membrana del

LE está protegida frente a la acción degradativa de estas enzimas, al contrario que la membrana de las vesículas intraluminales. Por tanto, al acelerarse la formación de MVB se promueve una digestión plena de las vesículas y las proteínas en ellas incorporadas. Los LEs cambian además su especificidad, fusionándose sólo entre sí (fusión homotípica) y con su destino final, la vacuola.

El surgimiento del endosoma tardío a partir del temprano puede explicarse bien por un mecanismo de transformación y desplazamiento (maduración), bien por un mecanismo de intercambio de material entre compartimentos estables mediante vesículas (transporte). Modelos recientes han tratado de conjugar ambas explicaciones^{227,228}. En las regiones vesiculares de los EEs comienzan a producirse cambios bioquímicos como la sustitución de GTPasas Rab o el reclutamiento de ESCRT a las membranas (maduración). Los LEs surgen como vesículas de gran tamaño a partir de estas regiones (transporte) y sus características propias se acentúan posteriormente (maduración). Los LEs sufren además fusión homotípica, concentrándose y aumentando de tamaño. Los EEs y el material a degradar presente en los mismos se reconfiguran de este modo, a partir de un mecanismo que implica transporte, en LEs maduros.

Uno de los procesos claves en la transición EE-LE es la denominada *conversión de Rab*, consistente en la sustitución de la GTPasa de la familia Rab mayoritaria en la membrana endosomal^{227,228}. La GTPasa Rab5 (cuyo ortólogo en levadura es el gen *VPS21/YPT51*²²⁹, aunque hay otros 2 genes homólogos²³⁰) es un marcador del EE²³¹, mientras que los LEs están enriquecidos en Rab7²³² (en levaduras, el gen ortólogo *YPT7*²³³), que también se localiza en las vacuolas²³⁴. Las proteínas Rab coordinan diversos procesos del tráfico vesicular mediante el reclutamiento a las membranas de proteínas de recubrimiento y otros efectores²³⁵, determinando así el comportamiento y la naturaleza de dichas membranas. En las interacciones entre membranas, Rab5 interviene en la fusión de vesículas endocíticas y la formación del EE²³⁶, mientras que *YPT7* es esencial para la fusión homotípica entre vacuolas²³⁴ y para la maduración de los LEs y su fusión con la vacuola²³³. Entre los efectores dependientes de Rab (revisados por Nordmann *et al*²³⁷) cabe destacar la fosfatidil-inositol 3-quinasa Vps34p (ambas Rab), que genera el PI3P característico de las membranas endosomales; las proteínas del citoesqueleto, que sirven de guías para el transporte de los endosomas dentro de la célula; y el retrómero, que será comentado más adelante.

Existen dos mecanismos de regulación de las proteínas Rab²³⁵. Su actividad depende de su inserción en las membranas a través de una cola hidrofóbica añadida posttraduccionalmente (prenilación). Un inhibidor de la disociación de GDP (GDI) puede unirse a Rab y evitar el despliegue de esta prenilación, manteniendo la proteína soluble y en el citosol. Sólo cuando un factor de desplazamiento de GDI (GDF) retira el inhibidor se inserta la proteína en la membrana, lo que permite su posterior activación (ilustración 9 A). Además, como miembros de la superfamilia Ras de GTPasas, las Rab son proteínas de unión a un nucleótido de guanina. El paso de forma inactiva (unida a GDP) a activa

(unida a GTP) es mediado por factores intercambiadores del nucleótido de guanina (GEF). El paso opuesto es mediado por proteínas activadores de la GTPasa (GAP), que aceleran la capacidad GTPasa intrínseca de la proteína (ilustración 9 B). La forma activa de la proteína –insertada en la membrana y unida a GTP– es capaz de interactuar con sus efectores.

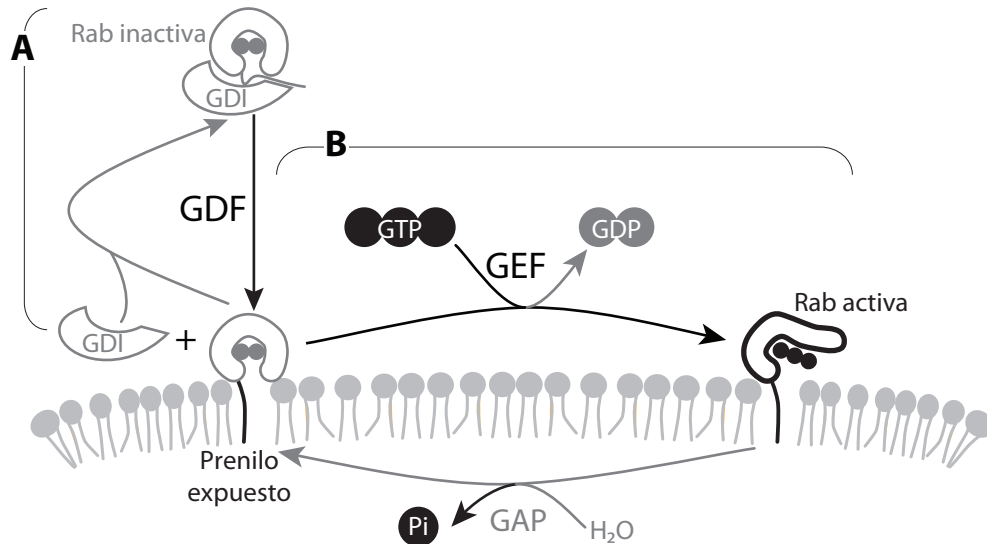


Ilustración 9: Regulación de las proteínas Rab. A: inserción de Rab-GDP en la membrana, dependiente de GDI y GDF. B: activación de Rab, dependiente de GDP/GTP y los reguladores GEF y GAP.

Investigaciones recientes han aclarado el papel de las proteínas Rab Vps21 e Ypt7 en la maduración de los endosomas (revisado por Lachman *et al*²³⁸). En el EE, el GEF Vps9 genera Vps21GTP (ilustración 10 A). Un efector de Vps21 es el complejo CORVET, consistente en un tetrámero central (clase C) y dos proteínas en sus extremos: Vps3²³⁹ y Vps8²⁴⁰. Ambas proteínas pueden unirse a Vps21-GTP, siendo así el CORVET un puente que amarra membranas y promueve su posterior fusión^{240,241} (ilustración 10 B). Como efector, CORVET promueve la primera fase de la maduración endosomal: la fusión del EE con otras vesículas endocíticas o provenientes del TGN; y, una vez formados los LE, las fusiones homotípicas iniciales entre los mismos²⁴⁰. Vps3 es además un GEF de Vps21²³⁹. En el EE, por tanto, Vps21-GTP recluta a un efector/regulador que, a su vez, incrementa aún más la forma activa de Vps21 (ilustración 10 C).

Sin embargo, Vps21 es sustituido por Ypt7 a medida que madura el LE, y el complejo CORVET es sustituido por otro complejo homólogo denominado HOPS. Ambos comparten el tetrámero central, y el complejo HOPS sustituye las subunidades Vps3/8 por los respectivos homólogos Vps39/41²³⁹, los cuales interactúan con Ypt7. La estructura del HOPS indica que a través de esas dos interacciones actúa de efector de Ypt7, promoviendo el amarre de membranas (ilustración 10 G), de manera presumiblemente análoga al CORVET, y el mantenimiento de la morfología endosomal²⁴². La conversión de Rab Vps21-Ypt7 se coordina con la sustitución CORVET-HOPS mediante el dímero Mon1/Ccz1²⁴³. Vps21 y CORVET (Vps8) reclutan Mon1/Ccz1 al LE, donde actúa de GEF de Ypt7

(ilustración 10 D). La presencia de Ypt7-GTP lleva a la adquisición de HOPS en las membranas. HOPS además activa a Mon1/Ccz1, que activa a su vez a Ypt7, en un bucle de activación de la Rab similar al que sucedía en el EE (ilustración 10 F). Mon1/Ccz1 también es capaz de desplazar del LE a Vps21 (ilustración 10 E) por un mecanismo aún no definido en levadura (el homólogo de Mon1 en *Caenorhabditis elegans*, SAND-1, desactiva a Rab5 mediante el secuestro de su GEF²²⁸).

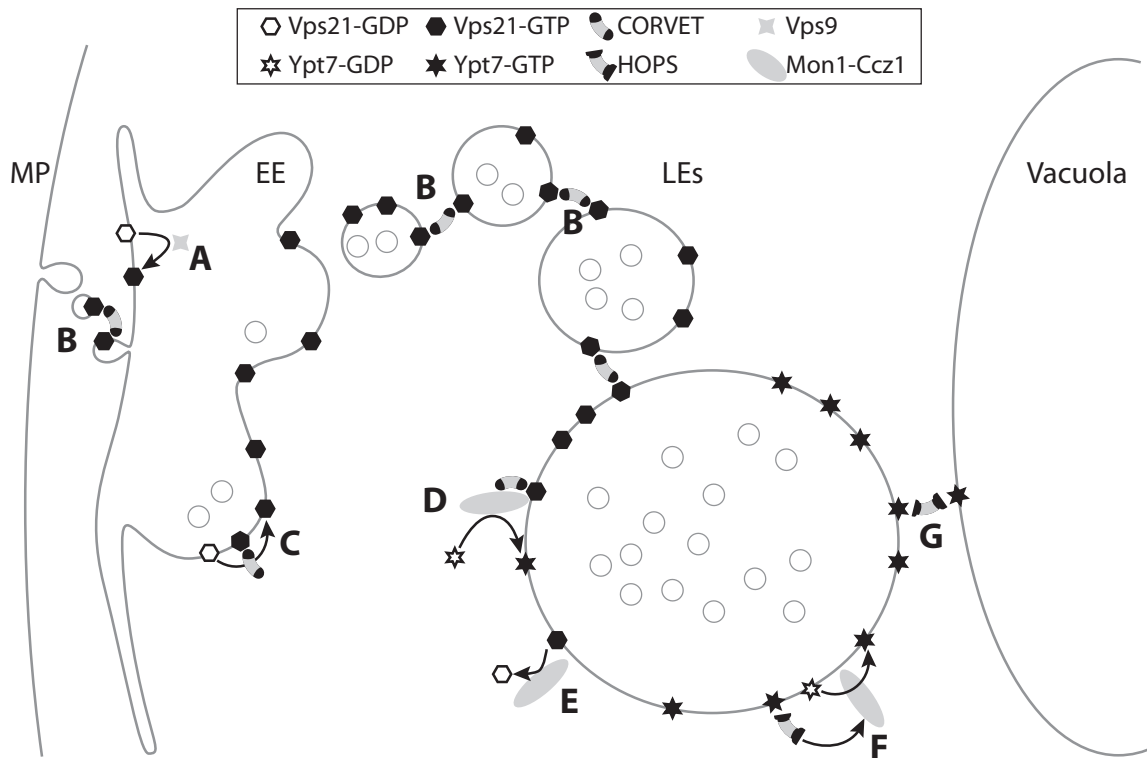


Ilustración 10: proteínas Rab durante la maduración del endosoma. **A:** Activación de Vps21 por Vps9. **B:** La función efectora del CORVET es facilitar la fusión de membranas del EE y primeros LE. **C:** En su función reguladora de Rab, CORVET (Vps3) activa Vps21. **D:** Vps21 y CORVET reclutan a Mon1/Ccz1, que activa a Ypt7. **E:** Mon1/Ccz1 desplaza Vps21 del LE. **F:** En su función reguladora, HOPS activa a Mon1/Ccz1, que a su vez activa a Ypt7. **G:** La función efectora de HOPS es facilitar la fusión homotípica de membranas del LE y con la vacuola.

Reciclaje mediante transporte retrógrado

El retrómero es un recubrimiento proteico que se localiza en el endosoma e interviene en el reciclaje de proteínas, por transporte retrógrado, al TGN²⁴⁴. El complejo de reconocimiento de membranas del retrómero es un dímero de proteínas Vps5 y Vps17^{245,246}. Ambas proteínas pertenecen a la familia de las nexinas, capaces de unirse –además de entre sí– al fosfatidilinositol-3-fosfato que se encuentra en los endosomas y a las membranas que presentan curvatura, como las regiones tubulares de los endosomas. No está claro que participen directamente en la formación de dichos túbulos, dado que sólo algunos miembros de dicha familia poseen esta segunda propiedad²⁴⁷. El complejo de reconocimiento de carga (CRC) del retrómero es un trímero de las subunidades Vps26, Vps29 y Vps35^{244,248,249}, e interacciona con el complejo de unión a membranas.

La identidad de los endosomas en los que actúa el retrómero es un tema controvertido. Dada la función de reciclaje del retrómero, se esperaría que actuara en los primeros pasos de la maduración del endosoma, antes de que las capacidades degradativas del orgánulo fueran completas. Los estudios iniciales mostraron asociación del retrómero en estructuras tubulares y su implicación en el reciclaje, lo que parecía indicar una localización en el EE²⁵⁰. Posteriores observaciones demostraron sin embargo un patrón más complejo de distribución del retrómero, que colocalizaba en células de mamífero no sólo con la proteína del EE Rab5, sino también con la proteína del LE Rab7²⁵¹. Estudios recientes han confirmado esta doble localización, proponiendo que el retrómero actúa en varias fases de la maduración del endosoma. Según este modelo, el punto en que coinciden ambas proteínas Rab es la transición del EE al LE, y en este punto alcanzaría un máximo la formación de las estructuras tubulares a las que se asocia el retrómero^{252,253}. Esta doble localización ha sido también planteada en *Saccharomyces cerevisiae*^{254,255}. El CRC del retrómero colocaliza en el EE con la proteína Vps21 y en el LE con Ypt7. Experimentos de inmunoprecipitación demostraron que el CRC interacciona, además, con la forma unida a GTP de Ypt7^{254,255}. El CRC por tanto presenta dos ligandos: la unión al complejo de reconocimiento de membranas (Vps5/17) lo dirige preferentemente al EE, mientras que la unión a Ypt7 lo dirige al LE e incluso a la vacuola. Se ha planteado que esto representa la secuencia de la vía del retrómero: unión al EE, unión a Ypt7 al transformarse en LE y activación por parte de esta proteína del retrómero, produciéndose finalmente en el LE los compartimentos tubulares de reciclaje²⁵⁵.

Los sustratos del retrómero son proteínas cuya función tiene lugar en un compartimento anterior al endosoma (el TGN) pero que pueden escaparse y alcanzar dicho orgánulo. La progresión de estas proteínas desde el endosoma implicaría su transporte a la vacuola y su posterior degradación. El retrómero impide dicha progresión y la pérdida de función de estas proteínas, permitiendo su circulación entre el endosoma y el TGN. Por tanto, cuando hay mutaciones en el retrómero, se pueden identificar como sustratos del mismo a proteínas que pierden su correcta localización. Este es el caso, en mutantes *vps5/26/35*, de la dipeptidil aminopeptidasa *STE13*, el receptor de hidrolasas *VPS10* y la serina proteasa *KEX2*²⁵⁶. Se ha demostrado además una interacción física directa entre las dos primeras proteínas y Vps35p²⁴⁸. Kex2p comparte con esas dos proteínas un motivo de localización hidrofóbico situado en la cola citosólica, imprescindible para su retención²⁵⁷⁻²⁵⁹. La carboxipeptidasa Kex1p es reciclada también del TGN al endosoma, proceso para el que depende de su cola citosólica²⁶⁰. *KEX1*, *KEX2* y *STE13* participan además en el mismo proceso (la maduración del factor- α ²⁶¹), lo que hace probable que su reciclaje implique también al retrómero. Los determinantes de selectividad para el retrómero no han sido completamente dilucidados, y se ha descrito además al menos una interacción retrómero-sustrato mediada por un adaptador²⁶², un mecanismo que podría aplicarse al reciclaje de otras proteínas. La identificación de los sustratos del retrómero es, posiblemente, aún incompleta.

Mitocondria

Las mitocondrias de *S. cerevisiae* tienen las mismas características generales (estructura, composición y función) que en otras células eucariotas. No obstante, presentan algunas peculiaridades resaltables. Esta sección revisa ambos aspectos de los fenómenos mitocondriales de mayor interés para este trabajo.

Importancia de las mitocondrias para las células de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es una levadura fermentativa facultativa, capaz de obtener energía de la fermentación alcohólica o de la respiración en las mitocondrias. En condiciones no limitantes de glucosa se comporta preferentemente como un organismo fermentativo, presentando unos niveles muy reducidos de respiración²⁶³, y es de hecho una de las pocas levaduras capaz de crecer en condiciones de anaerobiosis²⁶⁴. En condiciones de anaerobiosis *S. cerevisiae* se convierte en auxótrofa para el ergosterol y ácidos grasos insaturados^{265,266}, y sólo en estas condiciones expresa un sistema de incorporación de ergosterol exógeno²⁶⁷.

En medio rico en glucosa y con disponibilidad de oxígeno –condiciones habituales en el laboratorio– el crecimiento de la levadura es bifásico²⁶⁸. La primera fase se da mientras existe disponibilidad de glucosa, convertida en piruvato por glicólisis y, a su vez, en etanol por fermentación. En esta primera fase la respiración está reprimida. En una segunda fase, cuando se agota la glucosa, la célula comienza a obtener energía preferentemente mediante la respiración. Dado que la respiración es energéticamente más eficiente que la fermentación, y a la disponibilidad del etanol residual que puede incorporarse como fuente de carbono a la respiración, en esta segunda fase se reduce el consumo de glucosa. Se ha postulado que este comportamiento es una adaptación de *S. cerevisiae* a su medio natural, frutas en descomposición ricas en azúcares. A pesar de la baja eficiencia energética de la primera fase, permitiría a la levadura un crecimiento muy rápido, convertir los azúcares en una fuente de carbono que pueda aprovechar en el futuro y aumentar la acidez y la concentración de etanol, condiciones tóxicas para otros microorganismos. Por lo tanto, le proporcionaría una ventaja competitiva²⁶⁹.

Se denomina cambio diáuxico a la transición entre fases, que se acompaña de importantes cambios fisiológicos. Por tanto, la separación entre la fase fermentativa y la fase respiratoria requiere una estricta regulación metabólica. Esta se consigue mediante la represión por glucosa de la expresión de genes diana. Durante la represión por glucosa el factor de transcripción represor Mig1 se une al promotor de los genes diana, incluyendo el factor de transcripción activador Cat8 (ilustración 11 A). Ambos factores de transcripción están regulados coordinadamente por la quinasa Snf1. En condiciones limitantes de glucosa (ilustración 11 B), Snf1 fosforila a Mig1 (evitando su localización nuclear y por tanto su unión a los promotores) y a Cat8, activándolo. Así, retira la represión e

induce la expresión de los genes diana. La actividad quinasa de Snf1 requiere el activador Snf4 y una proteína armazón que facilite su interacción (Gal83, Sip1 o Sip2)²⁶⁸. Las dianas fundamentales de estos reguladores son genes del metabolismo de carbohidratos²⁶⁸. Durante la represión por glucosa las vías activas son la glucólisis (de glucosa a piruvato) y la fermentación alcohólica (de piruvato a etanol). Tras el cambio diáuxico, desaparece la represión de las vías que favorecen la respiración en la mitocondria: la oxidación del alcohol (de etanol a acetyl-CoA), el ciclo de Krebs (de acetyl-CoA a CO₂, generando equivalentes de reducción para la fosforilación oxidativa) y la gluconeogénesis (producción de glucosa empleando oxalacetato, un metabolito del ciclo de Krebs)²⁷⁰.

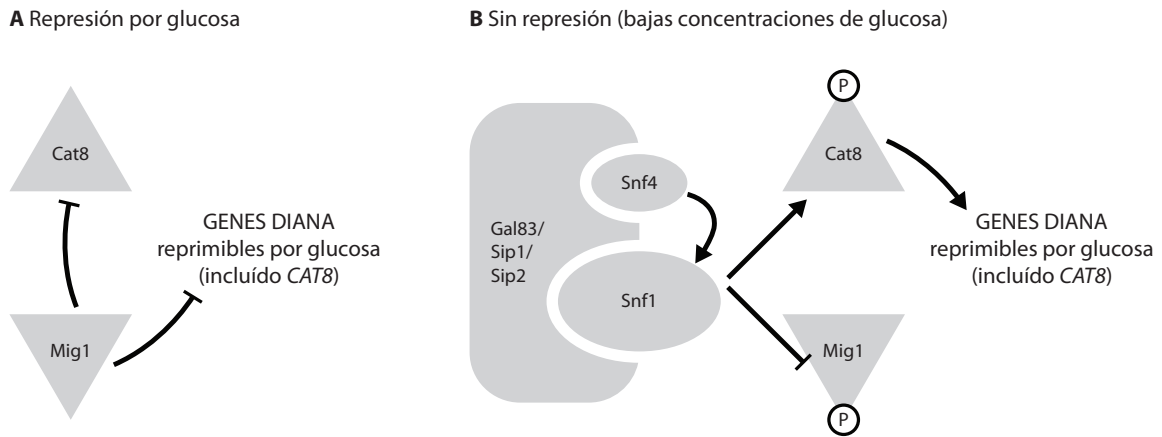


Ilustración 11: regulación mediante la quinasa Snf1 de la represión por glucosa. **A:** en presencia de glucosa, el factor de transcripción Mig1 reprime la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos (incluido el factor de transcripción CAT8, de efecto opuesto). **B:** en ausencia de glucosa la quinasa Snf1 fosforila a Mig1 y Cat8. Esto evita la acción del represor Mig1 y, a su vez, activa al activador Cat8. Como resultado se pierde la represión por glucosa de los genes diana, que pueden expresarse. Snf1 es activado por Snf4, lo que es posible gracias a su interacción con una de las 3 proteínas armazón (Gal83, Sip1, Sip2). Adaptado de Barnett y Entian, 2005²⁶⁸.

Morfodinámica de las mitocondrias

El metabolismo de carbohidratos determina también la morfología mitocondrial. En condiciones de anaerobiosis estricta, las células de *S. cerevisiae* presentan pocas mitocondrias con un bajo desarrollo de las crestas mitocondriales^{271,272}. Este estadio del orgánulo se denomina premitocondria y representan un estadio residual, presente en la célula en condiciones de baja respiración y a partir del cual pueden desarrollarse mitocondrias plenamente formadas. Las células crecidas en condiciones anaerobias sufren un aumento del volumen y complejidad mitocondrial al exponerse al oxígeno; el proceso contrario ocurre cuando células crecidas en presencia de oxígeno se pasan a crecer en anaerobiosis²⁷³. El aumento de tamaño (y complejidad) también se da durante distintas fases del crecimiento bifásico: en condiciones de represión por glucosa las mitocondrias representan una fracción menor del volumen celular y tienen una morfología más simple, pero tras el cambio diáuxico aumenta su tamaño y ramificación^{273,274}. Aunque las mitocondrias de la levadura pueden tener en micrografías aisladas apariencia de orgánulos individuales, las reconstrucciones tridimensionales

muestran que se interconectan, formando un retículo dinámico^{275,276}. En células crecidas en medio con glicerol (fuente de carbono no fermentable y que obligatoriamente induce la respiración) este retículo mostró por promedio cuatro veces más ramificaciones que las células crecidas en glucosa hasta la fase logarítmica, previa al cambio diáuxico²⁷⁶. Este estadio de tamaño y desarrollo incrementado sufre una última evolución cuando las células alcanzan la fase estacionaria y se adaptan prolongadamente a emplear etanol como fuente de carbono. El retículo mitocondrial sufre entonces una aparente disgregación en corpúsculos numerosos y de pequeño tamaño^{274,277}.

El condrioma de la levadura es una estructura dinámica: la apariencia reticular observada es el resultado de la fusión entre los distintos túbulos que lo componen, que también sufren continuos procesos de fisión²⁷⁸. Se ha planteado que esta dinámica promueve la mezcla de los orgánulos. Las mitocondrias acumulan, debido a su función energética, daño oxidativo en sus membranas, proteínas y ácidos nucleicos. La mezcla constante promovería la homogeneidad de los orgánulos intracelulares. La fusión mitocondrial tras la reproducción sexual dotaría al cigoto de un condrioma homogéneo que repartir entre su descendencia²⁷⁸.

La morfodinámica mitocondrial está controlada fundamentalmente por dos complejos de proteínas que promueven fisión (complejo Dnm1p) y fusión (complejo Fzo1p). El equilibrio entre ambos procesos determina la morfología final del condrioma²⁷⁹: en un mutante *dnm1Δ*, defectuoso en fisión²⁸⁰, la fusión sin oposición colapsa a las mitocondrias en cordones únicos, glóbulos o mallas; y un mutante *fzo1Δ*, defectuoso en fusión²⁸¹, sufre una fisión sin contrapeso que provoca la disgregación en multitud de mitocondrias separadas (ilustración 12). Dnm1p es una GTPasa de la familia de la dinamina que es reclutada a la mitocondria, donde polimeriza en estructuras que estrangulan los túbulos mitocondriales e inducen su fisión. Dos proteínas presentes en la membrana externa mitocondrial, Fis1p y Mdv1p, participan en este reclutamiento²⁸². La fusión mitocondrial se basa en la aproximación de mitocondrias distintas, hasta que se fusionan sus membranas. Este acercamiento está mediado por GTPasas de membrana. Las moléculas de la GTPasa presentes en una mitocondria interaccionan con las presentes en el otro orgánulo, facilitando el anclaje y aproximación de ambos. Fzo1p es una de estas proteínas situada en la membrana mitocondrial externa. Tras la fusión de la misma, Mgm1p cumple una función análoga en la membrana mitocondrial interna. El complejo de Fzo1p se completa con una tercera proteína (Ugo1p) que une ambas GTPasas y coordina la fusión de ambas membranas mitocondriales.

Existen otros determinantes de la morfología mitocondrial. Los complejos situados en las regiones de contacto entre el retículo endoplásmico y la mitocondria determinan la morfología mitocondrial. En los mutantes de estos complejos las mitocondrias se colapsan en estructuras globulares gigantes. El mecanismo es independiente a Dnm1/Fzo1 y podría implicar la interacción de las mitocondrias con los filamentos de actina y su movimiento^{283,284}. Finalmente, existen procesos

autofágicos específicos para las mitocondrias (mitofagia) en los que participan los genes *UTH1*, *AUP1* y *MDM38*²⁸⁵. La relación entre sí y con la inducción general de autofagia no se ha dilucidado aún. En células de mamífero la mitofagia es precedida por fragmentación de la mitocondria²⁸⁶. Este extremo no se ha confirmado en levadura. Un caso al menos de mitofagia (la mediada por la mutación *mdm38Δ*) es precedida por la fragmentación mitocondrial, y un mutante *mdm38Δdnm1Δ* no sufre mitofagia²⁸⁵.

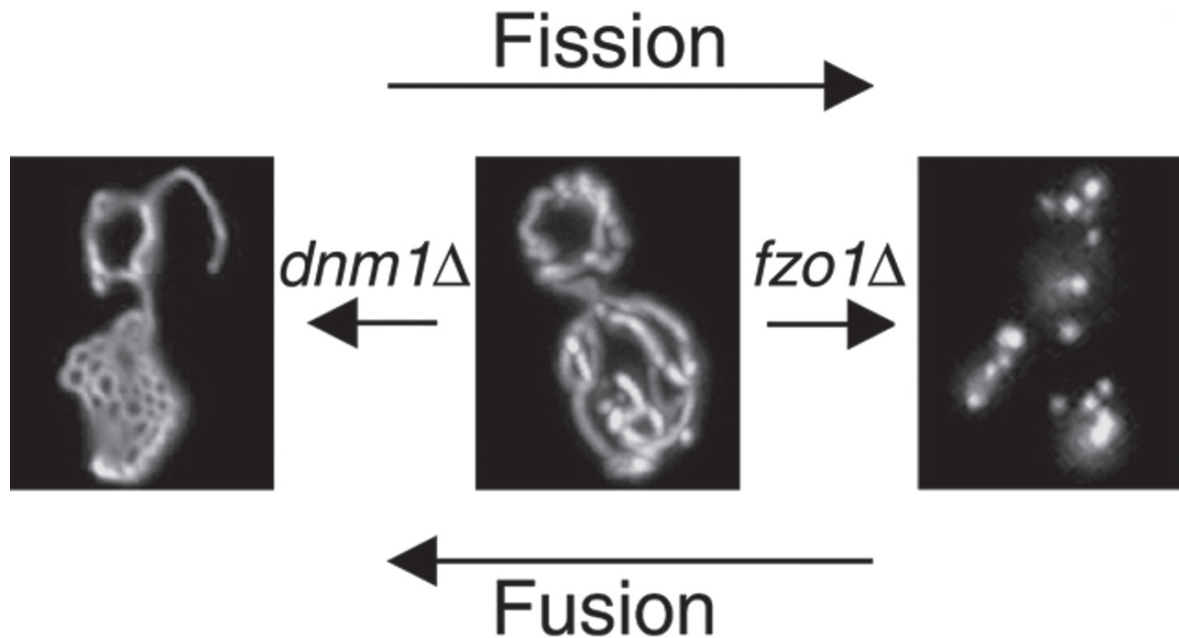


Ilustración 12: regulación de la dinámica mitocondrial a través del equilibrio entre la acción de *DNM1* (promueve fisión) y *FZO1* (promueve fusión). La mutación de uno de los genes altera el equilibrio, dejando al otro actuar sin contrapeso. Extraído de Mozdy *et al*, 2000²⁸².

Bioenergética mitocondrial

La fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria consta, de acuerdo con el modelo quimiosmótico²⁸⁷, de tres componentes. La cadena de transporte de electrones encadena reacciones de oxidoreducción (hasta llegar al aceptor final de electrones) que proveen la energía necesaria para desplazar protones a través de la membrana mitocondrial interna. El regreso de los protones a la matriz mitocondrial tiene lugar a través de la F_0F_1 -ATP sintasa, y provee de energía a la síntesis de ATP. La translocación de protones genera un gradiente químico que actúa de fuerza protón-motriz del flujo a través de la ATP sintasa. El gradiente de protones es, por tanto, el tercer componente que permite el acoplamiento de los otros dos. La existencia de este gradiente es posible por la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, con la excepción de los canales generados por la ATP sintasa. Al poseer los protones carga, el bombeo de los mismos resulta además electrogénico, apareciendo una diferencia de carga a ambos lados de la membrana. El potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) generado es por tanto inherente a la respiración mitocondrial.

La fosforilación oxidativa presente en *S. cerevisiae* se basa en un mecanismo semejante al de otras células eucariotas. La ATP sintasa consta de dos fracciones (F_0 y F_1) con los componentes y estructura

conservados. La cadena de transporte de electrones está formada por cuatro complejos (I: NADH deshidrogenasa; II: succinato deshidrogenasa; III: citocromo *c* reductasa; IV: citocromo *c* oxidasa), dos intermediarios (complejos I/II-III: ubiquinona; complejos III-IV: citocromo *c*) y O₂ como aceptor final de los electrones. El único componente inusual es el complejo I (NADH deshidrogenasa). En levadura no existe un complejo multiproteico, sino un enzima único capaz de transferir electrones del NADH a la ubiquinona pero no de bombear protones al espacio intermembrana de la mitocondria. Existen tres isoenzimas, localizadas en la membrana interna de la mitocondria: *NDI1*, con su centro catalítico orientado hacia la matriz mitocondrial, oxida el NADH proveniente del ciclo de Krebs; y *NDE1/2*, con su centro catalítico orientado hacia el espacio intermembrana y capaces de oxidar el NADH proveniente del citosol²⁸⁸. De acuerdo con esto, la respiración en levadura no requiere de sistemas de lanzadera para translocar equivalentes de reducción al interior de la mitocondria.

La fermentación de azúcares puede, en condiciones no limitantes de esa fuente de carbono, proveer a *S. cerevisiae* de prácticamente toda la energía que necesita. Esto facilita la existencia de mutantes viables que son incapaces de respirar. Estos mutantes son fermentativos obligatorios, por lo que un medio de cultivo con glicerol o etanol no permite su desarrollo. En comparación a células silvestres crecen además con lentitud, generando colonias de pequeño tamaño. Los primeros mutantes de esta clase fueron generados por tratamiento con acridinas como el bromuro de etidio, agentes intercalantes del ADN²⁸⁹. Se demostró posteriormente que este tratamiento producía la pérdida parcial (cepas ρ^-) o total (cepas ρ^0) del ADN mitocondrial²⁹⁰. Tal pérdida explica el defecto en la respiración de los mutantes. Existen en el genoma mitocondrial de levadura 8 genes que codifican proteínas, todas ellas con función en este orgánulo: *CYTB* (citocromo b, parte del complejo III); *COX1/2/3* (subunidades del complejo IV); *ATP6/8/9* (subunidades de la F₀F₁-ATP sintasa); y *VARI* (proteína ribosomal). Las tres subunidades de la ATP sintasa forman parte de la fracción F₀²⁹¹, y las tres subunidades del complejo IV forman el núcleo catalítico del mismo²⁹². Por tanto, las cepas ρ^- carecen de genes esenciales para la respiración.

***Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para el estudio de fármacos**

La levadura de gemación es uno de los modelos experimentales más extendidos en los laboratorios de biología. Los primeros estudios empleando levaduras aparecieron en los siglos XVIII-XIX, en relación a la naturaleza de las reacciones de fermentación. Pasteur demostró definitivamente que este proceso requería de un agente biológico identificado como la levadura, cuyas células habían sido

observada ya por Leeuwenhoek en el siglo XVII²⁹³. En los años 30 comenzó a emplearse *S. cerevisiae* como un modelo experimental para genética²⁸⁹. Quedo establecido, en esta época, que poseía un ciclo vital haplodiplonte (con generaciones haploide y diploide alternas y estables por reproducción vegetativa) y que la reproducción sexual implicaba dos tipos sexuales (**a** y α). Así mismo, se generaron los primeros mapas genéticos y protocolos de mutagénesis.

A finales de los años 70 la levadura se demostró un modelo válido para la biología molecular al desarrollarse dos técnicas básicas de la tecnología del ADN recombinante: la transformación de células con ADN y los primeros vectores de expresión, basados en el plásmido 2 μ natural del organismo²⁹⁴. Determinadas ventajas del sistema promovieron su uso en biología molecular: recombinación homóloga únicamente y con alta frecuencia; posibilidad de combinar mutaciones mediante reproducción sexual; un genoma compacto (12 Mb), con pocos genes (cerca de 6000), de pequeño tamaño (por promedio menor de 2 kb) y generalmente sin intrones²⁹⁵; posibilidad de crear mutantes en la mayoría de genes, al no ser esenciales; existencia de vectores episomales, integrativos y cromosomas artificiales. El uso de *S. cerevisiae* como modelo experimental en genética facilitó además la disponibilidad de mutantes y genes marcadores. La levadura debe gran parte de su éxito como organismo modelo a la facilidad y rapidez con las que se puede tanto modificar genéticamente como manejar y observar. Esto facilita los estudios funcionales que relacionan genes con fenotipos observables.

En 1996 el genoma de *S. cerevisiae* fue el primero de un organismo eucariota en ser secuenciado²⁹⁵. El grado de homología con los genes de *Homo sapiens* resultó ser elevado: más del 20% de los genes humanos implicados en enfermedad y secuenciados tienen homólogos en levadura²⁹⁶. Esto es indicativo de que la arquitectura celular básica de levadura está conservada en mamíferos superiores y que el conocimiento obtenido del estudio del modelo experimental puede ser trasladado a mamíferos superiores.

La colección de mutantes de delección

Una herramienta básica para establecer la función de un gen es estudiar las consecuencias de mutar dicho gen. Clásicamente, la estrategia era estudiar la función del mutante en primer lugar y después identificar el gen. Tras generar un conjunto de mutantes, se observaban determinados fenotipos que actuaban como marcadores del proceso biológico objeto de estudio. Aquellos mutantes con fenotipos de interés se cribaban del conjunto y se caracterizaban con detalle. Se observaba la interacción funcional de esta mutación con otras en genes conocidos, determinando así la relación del gen mutado con los elementos conocidos del proceso. Finalmente, los genes desconocidos se identificaban por técnicas de genética clásica y molecular. El desciframiento del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* significó el mapeo y secuenciación de todos los genes del organismo, entre ellos más de 4000 no identificados previamente²⁹⁵. Esto permitió plantear una segunda estrategia

opuesta: realizar mutaciones dirigidas en un gen y observar los efectos para determinar las funciones del gen.

Un consorcio de laboratorios europeos y norteamericanos asumió esta estrategia de un modo sistemático y emprendió la delección de todos los genes de levadura, con el objetivo final de construir una colección completa de mutantes de delección. La meta inmediata de esta colección era la caracterización funcional global de los genes del organismo: estudiando en paralelo todos los mutantes, se evalúa la implicación de cada gen en la característica observada²⁹⁷. Se puso además este amplio reservorio de cepas a disposición de toda la comunidad científica. Esto facilita los estudios funcionales de procesos específicos, al estar disponibles los mutantes de delección de los genes que participan en dichos procesos. La disponibilidad de la colección completa proporciona un valor añadido, ya que pueden aislarse subconjuntos de mutantes relevantes a partir de cada estudio. Mediante la identificación de estos mutantes puede no sólo confirmarse la implicación en el proceso de genes ya conocidos, sino encontrar nuevos genes. En ese sentido, la utilidad de la colección no está en la mera disponibilidad de una mezcla de cepas: cada mutante está clasificado y, además, marcado por un código de barras genético asociado a su delección específica.

La construcción de los mutantes se basó en la sustitución, en el gen a mutar, de su región codificante por el módulo génico *kanMX*, que otorga resistencia al antibiótico de selección geneticina²⁹⁸. El módulo se modificó incorporando en cada extremo una secuencia específica para cada cepa construida, empleada a modo de código de barras identificativo (ilustración 13). Dentro de todos los códigos de barras hay dos secuencias comunes en sus extremos. Estas secuencias están diseñadas para hibridarse a oligonucleótidos específicos, lo que puede emplearse para amplificar el código de barras o secuenciarlo y así identificar un mutante. La inserción se realizó por recombinación homóloga, por lo que para cada gen hubo que añadir al módulo secuencias específicas. En ambos extremos se incorporaron secuencias homólogas a las que flanquean en 5' y 3' la región codificante del gen a deleccionar. La presencia de dos regiones homólogas guía la recombinación del módulo con el *locus* a deleccionar²⁹⁹ (ilustración 13).

La colección completa consta de cuatro subcolecciones: cepas haploides del tipo sexual **a**, cepas haploides del tipo sexual α , células diploides homocigotas para la delección y células diploides heterocigotas para la delección. Un 18,7% de los genes resultaron esenciales para el crecimiento en medio rico con glucosa, por lo que sus mutantes sólo se encuentran en heterocigosis en cepas diploides. Los mutantes en genes no esenciales están presentes en todas las colecciones²⁹⁹.

La colección de mutantes se ha empleado para estudiar propiedades generales: viabilidad en distintos medios de cultivo, velocidad de crecimiento y aptitud competitiva de las cepas²⁹⁷, tamaño y forma celular²⁹⁹. Sólo una pequeña parte de los mutantes de la colección muestran, en cada *screening*, un fenotipo claro. No obstante, también pueden caracterizarse funcionalmente los mutantes

estudiando el qué efecto tienen condiciones externas más específicas. Ya la publicación que describía la colección de mutantes completa presentaba un análisis funcional del crecimiento en condiciones alteradas (disponibilidad de aminoácidos y fuente de carbono, salinidad, alcalinidad y resistencia al antifúngico nistatina)²⁹⁹. Los *screenings* frente a distintas condiciones permiten identificar subconjuntos específicos de mutantes. Cada subconjunto de mutantes se corresponde con un perfil de los genes implicados en la respuesta a las condiciones empleadas. Así, mediante la realización de suficientes *screenings* se lograría en teoría acumular suficientes perfiles que no se solapan, y asignar a cada gen al menos una función. En este sentido, el análisis de la colección de mutantes frente a 400 compuestos y condiciones ambientales arrojó la conclusión de que la práctica totalidad de los genes son esenciales para el crecimiento en una condición experimental como mínimo³⁰⁰.

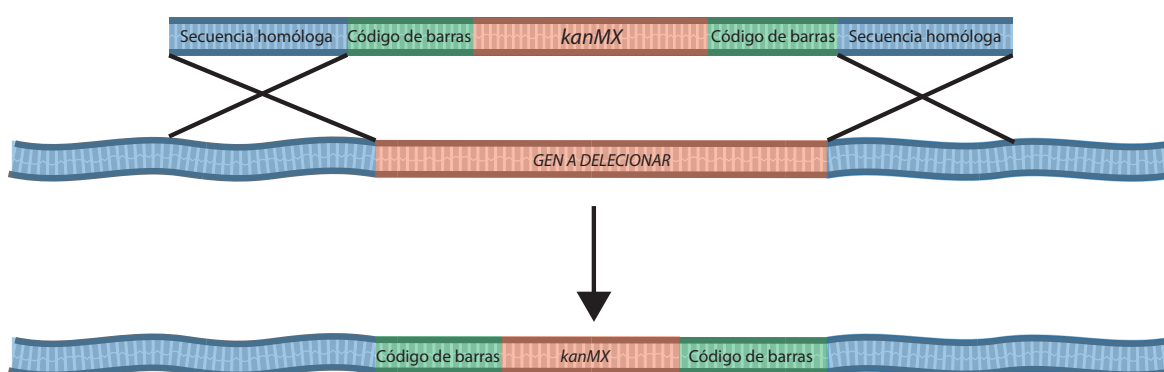


Ilustración 13: esquema de la construcción de los mutantes de la colección. El módulo génico de resistencia se construyó a partir del módulo *kanMX*, al que se le añadieron unas secuencias identificativas a modo de código de barras genético (no se muestran las secuencias internas de hibridación). Se añadieron a ambos extremos del módulo resultante unas secuencias homólogas a las que flanquean la región codificante del gen a deleccionar. Por recombinación homóloga entre estas secuencias, se sustituyó el gen diana por el módulo. Adaptado de Giaever *et al*, 2002²⁹⁹.

Para averiguar qué mecanismos moleculares intervienen en la respuesta a una condición, el enfoque más directo es cribar la colección en busca de mutantes que no respondan a esa condición con el mismo fenotipo que las células normales. Ciertas condiciones, como por ejemplo el tratamiento con compuestos tóxicos y fármacos, tienen como consecuencia la inhibición del crecimiento o letalidad. La resistencia de un mutante a tal tratamiento indica que el gen deleccionado en esa cepa interviene en el proceso de toxicidad inducido por el compuesto. El enfoque contrario es también posible: cribar mutantes que ante una condición limitada –que no provoca, en las células silvestres, un fenotipo observable– sí sufren ese fenotipo. Ante el tratamiento con un fármaco esto significaría toxicidad a una concentración baja que no afecta a las células silvestres (hipersensibilidad). La colección de mutantes, por supuesto, puede ser empleada para otras clases de *screenings* más complejos³⁰¹, que no son directamente relevantes para el presente trabajo.

Mecanismo de acción de los ATLS en *Saccharomyces cerevisiae*

La literatura concerniente a la acción de los ATLS sobre *S. cerevisiae* es limitada. Ruetz *et al* demostraron, en 1997, la sensibilidad de la levadura a un ATL (edelfosina)³⁰². Esta sensibilidad ha sido posteriormente extendida a otros géneros de hongos^{303,304}. *S. cerevisiae* es también sensible a miltefosina¹⁰¹.

La toxicidad de edelfosina y miltefosina depende de los genes *LEM3*¹⁰¹ y *DNF1*¹⁰², componentes de la flipasa de la MP encargada de la incorporación de aminofosfolípidos y compuestos análogos^{95,96,100}. La capacidad de la célula de expulsar los ATLS internalizados también determina su resistencia a los mismos. El transportador ABC *STE6*, que media transporte desde el citosol al medio extracelular, reduce la sensibilidad a edelfosina³⁰²; así mismo, los factores de transcripción *PDR1* y *PDR3* promueven la expresión de esta clase de transportadores, y su sobreexpresión reduce la sensibilidad a edelfosina¹⁰¹. Aunque la estabilidad de los ATLS no ha sido estudiada con detalle en levadura, la edelfosina no parece ser metabolizada significativamente tras 30 minutos de incubación³⁰².

La interferencia del metabolismo lipídico no parece ser la causa de la toxicidad de edelfosina en *S. cerevisiae*. El tratamiento con el ATL provocó una acumulación de fosfocolina³⁰⁵. Esto indica la inhibición del enzima CCT, que cataliza la transformación de fosfocolina en CDP-colina, en la ruta biosintética de fosfatidilcolina (ilustración 4). Este mismo enzima es inhibido por ATLS en células tumorales, y se ha propuesto que esta inhibición provoca la toxicidad de estos compuestos. Tal inhibición tiene sin embargo una relevancia fisiológica distinta en levadura, al existir una ruta alternativa de síntesis de fosfatidilcolina a partir de fostadiletanolamina³⁰⁶. De hecho el gen *PCT1*, que codifica el enzima CCT, no es esencial, y el mutante *pct1Δ* no muestra una mayor resistencia a edelfosina respecto a su WT³⁰⁵. Cabe deducir que la edelfosina afecta a otros procesos celulares distintos de la síntesis de fosfatidilcolina, a través de los cuales ejerce su toxicidad.

Se desconoce si alguna de las rutas de señalización que se han propuesto como mediadoras de la toxicidad de ATLS en células tumorales participa en la toxicidad sobre levadura. Existen en *S. cerevisiae* homólogos de algunas de las rutas de señalización que promueven, en células de mamífero, tanto la supervivencia celular como su muerte celular programada. Las rutas de señalización por MAP quinasas también median la transducción de señales y participan en la progresión del ciclo celular o la respuesta a estrés³⁰⁷. Aunque los componentes de la ruta Akt están conservados en levadura y humanos³⁰⁸, el supuesto ortólogo de Akt *SCH9* cumple sin embargo funciones más semejantes a las de la quinasa S6K1³⁰⁹. No parece probable que la toxicidad de los ATLS se deba a la inhibición de *SCH9*, ya que no es esencial para la viabilidad celular y carece además del dominio pleckstrina por el que Akt interacciona con las membranas³⁰⁸. Fenotipos propios de la apoptosis de metazoos sí han sido observados en células de levadura³¹⁰. Se ha postulado que la levadura puede sufrir una muerte celular programada en respuesta a diversos tipos de estrés: químico (peróxido de hidrógeno, ácido acético,

fármacos), físico (radiación ultravioleta, altas temperaturas, estrés hiperosmótico) o bioquímico (estimulación con feromona sin posibilidad de apareamiento, expresión heteróloga de proteínas proapoptóticas como Bax, estrés de retículo o envejecimiento de la célula)³¹¹. Los componentes de las rutas de señalización que activan este proceso son semejantes a los presentes en células animales: proteasas relacionadas con las caspasas, homólogos del factor inductor de apoptosis, producción de especies reactivas de oxígeno o la mitocondria³¹²⁻³¹⁵. Sin embargo, en el genoma de *S. cerevisiae* no están presentes genes homólogos de ninguno de los componentes de la vía extrínseca de la apoptosis.

En un trabajo previo del laboratorio se analizó la influencia del metabolismo de esfingolípidos en la toxicidad por edelfosina. Se observó hipersensibilidad al compuesto en mutantes de los genes *LCB1* (una serina palmitoiltransferasa que cataliza el primer paso en la síntesis de esfingolípidos), *FEN1* y *SUR4* (las dos elongasas que sintetizan los ácidos grasos de cadena larga que aparecen en los esfingolípidos)³⁰⁵. La correcta localización y la función de la ATPasa de membrana Pma1 es dependiente de estos genes: cuando están mutados, Pma1 no puede asociarse a los *lipid rafts* y se transloca a la vacuola, donde se degrada^{159,198,206}. Se comprobó que en células WT la edelfosina también producía una translocación de Pma1 a la vacuola³⁰⁵. La hipersensibilidad de los mutantes se explica como un efecto aditivo entre dos condiciones que individualmente contribuyen a esta translocación (defectos en el metabolismo de esfingolípidos y tratamiento con edelfosina). La sobreexpresión de Pma1 alivió la toxicidad por edelfosina, confirmando que la causa de la toxicidad celular era la pérdida de función de Pma1³⁰⁵. Por tanto en la toxicidad por edelfosina en *S. cerevisiae* participa un proceso distinto a los propuestos para células de mamíferos: la degradación de la ATPasa de membrana Pma1.

Objetivos

En este trabajo se busca estudiar el mecanismo de toxicidad de tres lípidos antitumorales (ATLs): edelfosina, miltefosina y perifosina. Los dos aspectos mediante los cuales se lleva a cabo este estudio son:

1. Identificación de los genes implicados en los procesos de toxicidad por ATLs.
 - 1.1. Identificación y análisis de los genes esenciales para esta toxicidad mediante *screenings* de resistencia y sensibilidad a partir de una colección de mutantes de delección.
 - 1.2. Identificación de genes adicionales relevantes mediante un *screening* de supresores de toxicidad a ATLs empleando una genoteca basada en vectores multicopia.
2. Caracterización de distintos fenotipos asociados a la toxicidad por ATLs.
 - 2.1. Estudio detallado de la incorporación de la ATPasa de la membrana plasmática Pma1p.
 - 2.2. Estudio de la función mitocondrial y la señalización por especies reactivas de oxígeno.

Resultados

Los compuestos estudiados en el presente trabajo –edelfosina, miltefosina y perifosina– son lípidos sintéticos antitumorales (ATLs). Esta actividad antitumoral se descubrió en la primera subclase sintetizada de ATLs: los alquil-lisofosfolípidos (ALPs), a los que pertenece la edelfosina. Posteriormente se sintetizaron, en un intento de mejorar las características de estos compuestos, nuevos análogos: las alquilfosfocolinas, a la que pertenecen la miltefosina⁹ y la perifosina¹⁰. Se comprobó que los ATLs ejercían su acción antitumoral frente a múltiples líneas celulares derivadas de tumores sanguíneos^{3,4,80} o sólidos⁶⁻⁸. Estos compuestos también resultaron tóxicos frente a parásitos protozoarios, como *Leishmania* sp.¹¹⁻¹³, o fúngicos³⁰³. Así mismo, la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* es sensible a los ATLs edelfosina³⁰² y miltefosina¹⁰¹.

El mecanismo de acción de los lípidos antitumorales es una cuestión aún abierta, y no se ha podido construir un modelo completo que determine claramente qué procesos celulares son críticos para la toxicidad y cuáles superfluos. Se han postulado diversas rutas celulares (metabolismo de la fosfatidilcolina³³, señalización por Fas⁷⁴, activación de Jun kinasa⁴⁶, señalización por Akt⁶⁸, estrés de retículo endoplásmico⁴³) mediante las cuales actúan los ATLs. La toxicidad podría ser resultado de la acción de uno de estos mecanismos o una combinación de los mismos, y esto podría cambiar en cada tipo celular. A la dificultad de considerar en paralelo el papel de todos los mecanismos y la relación entre los mismos se suma el uso, en los múltiples estudios científicos, de distintos compuestos de la familia y de una variedad de sistemas biológicos. Todos estos factores determinan una gran variabilidad de condiciones en los estudios que se han realizado en el campo de los ATLs, y como consecuencia no son siempre directamente comparables.

Una de las alternativas para la investigación del mecanismo de acción de los ATLs es el uso de organismos modelo con los que se simplifiquen los mecanismos de toxicidad a estudiar. La manipulación y observación de estos organismos puede ser además más fácil, rápida o flexible que

la de líneas tumorales o modelos animales. El objetivo de este trabajo es precisamente el estudio del mecanismo de muerte de los lípidos antitumorales en la levadura *S. cerevisiae*. Los experimentos se realizaron con un ALP: edelfosina, el prototipo de esta subclase de compuestos y del que existe una literatura más abundante. Paralelamente, y en la medida de lo posible, se estudiaron además dos APCs: miltefosina y perifosina, los dos miembros más estudiados de esta subclase por haber presentado el mayor potencial terapéutico. Para comprender el mecanismo de acción de los ATLs se estudiaron tanto los genes implicados en la toxicidad de los compuestos como el fenotipo de la célula tratada.

La caracterización génica se llevó a cabo mediante la realización de escrutinios genómicos (*screenings*) de cepas resistentes y sensibles a los compuestos. Se aislaron cepas con un fenotipo resistente/sensible frente a un fármaco y se identificó el gen concreto que provocaba dicho fenotipo; estos genes indicaron las localizaciones y procesos celulares que inequívocamente modulaban la respuesta celular a los ATLs. Dichos procesos y localizaciones son además candidatos a sufrir alteraciones (morfológicas, bioquímicas, fisiológicas) y merecieron por tanto un estudio pormenorizado.

Se realizó además un análisis de múltiples fenotipos mediante técnicas de biología celular y molecular. El objetivo de una caracterización fenotípica lo más completa es revelar mecanismos celulares previamente desconocidos que se alteran durante el tratamiento con ATLs. Tales alteraciones pueden ser efectos colaterales del proceso de toxicidad o jugar un papel en el mismo. En este último caso, algunos de los genes del mecanismo alterado podrían encontrarse entre los identificados en la caracterización génica. Los resultados de la caracterización fenotípica permitirían entonces completar los resultados de la caracterización génica y una mejor interpretación de los mismos.

El uso de una de estas dos aproximaciones experimentales da por tanto la oportunidad de enunciar hipótesis que la otra aproximación experimental puede validar, y viceversa. Por tanto en este estudio se consideraron en paralelo los datos obtenidos de ambas. La caracterización génica se realizó sin embargo mediante *screenings* sin sesgo, independientes en un principio de resultados de otros experimentos. No obstante, la interpretación y análisis de los resultados de los *screenings* sí se apoyaron en otros experimentos. La interpretación de dichos resultados determinó además qué propiedades de la célula tratada se caracterizaron fenotípicamente en ulteriores experimentos.

Toxicidad de los lípidos antitumorales en *Saccharomyces cerevisiae*

En primer lugar y como paso previo a todo experimento posterior fue necesario determinar la toxicidad en levadura de tres ATLs (edelfosina, miltefosina y perifosina): las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento y si efectivamente inducían toxicidad. Estos resultados permitieron además establecer unas condiciones estándar para posteriores experimentos.

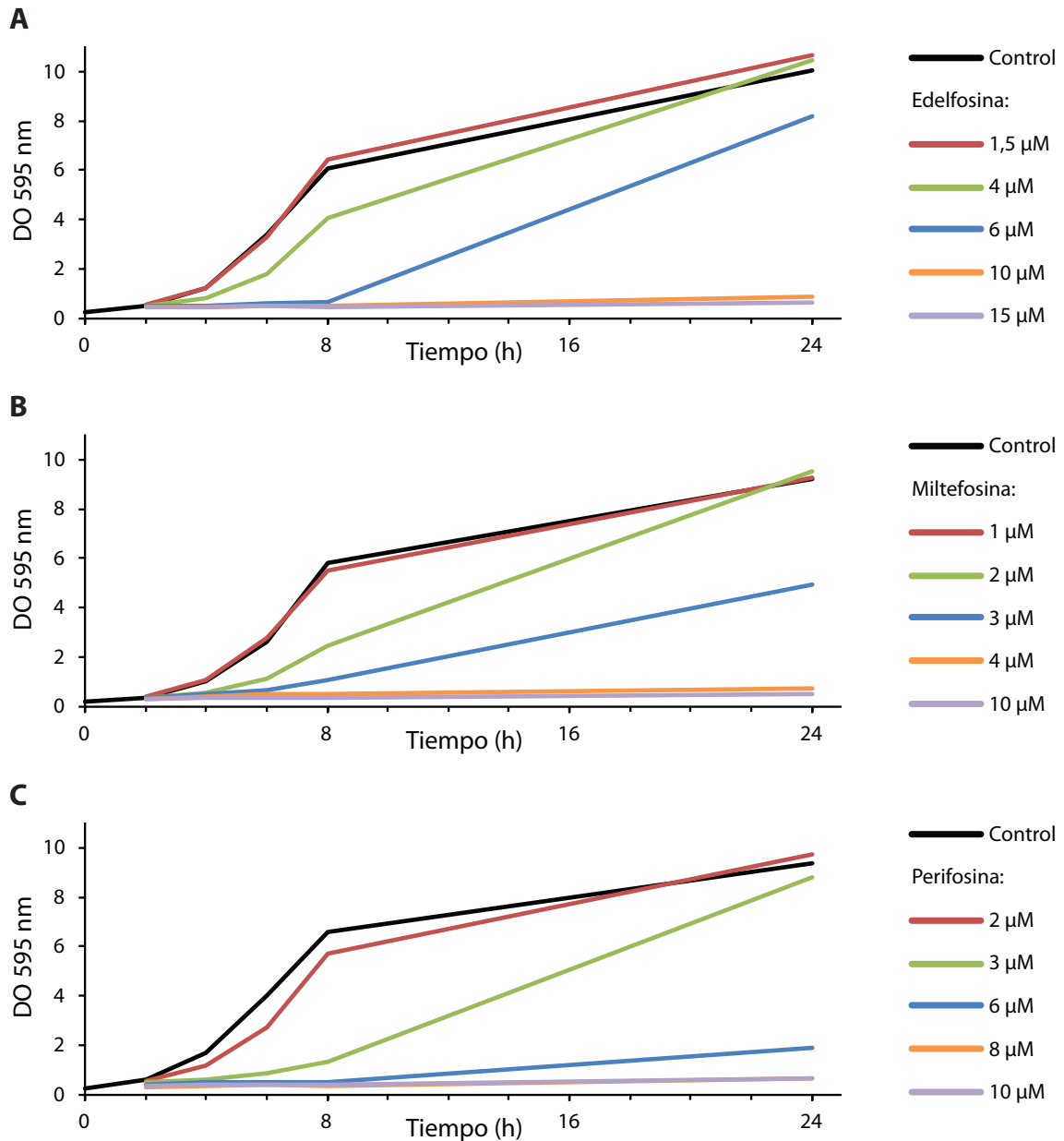


Ilustración 14: inhibición del crecimiento en medio líquido por ATLs. Curvas de crecimiento. A: edelfosina. B: miltefosina. C: perifosina.

Los tres compuestos ensayados impidieron la proliferación de *Saccharomyces cerevisiae*. Una suspensión celular diluida se dividió en muestras, que fueron tratadas con distintas concentraciones

de los tres ATLS Mediante la observación de la densidad óptica (DO) se monitorizó el crecimiento celular a lo largo del tiempo. Las curvas de la ilustración 14 muestran una relación directa entre la inhibición del crecimiento celular y la concentración del compuesto. Con los tres ATLS las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento fueron del mismo orden de magnitud. La mínima concentración de edelfosina necesaria para observar una inhibición completa del crecimiento tras 24 horas de tratamiento fue de 10 μM (ilustración 14 A); sin embargo, tal inhibición se observó con concentraciones menores de miltefosina y perifosina (ilustración 14 B, C). La toxicidad de la edelfosina es, por tanto, ligeramente menor que la miltefosina y la perifosina.

El crecimiento celular también se inhibió en medio sólido en presencia de ATLS. Se prepararon, a partir de precultivos de cada cepa a examinar en medio líquido fresco, diluciones seriadas (1:10) con concentración decreciente de levaduras. De cada dilución se tomó una gota de igual volumen como inóculo, que se transfirió a cada tratamiento, así como a una placa con medio fresco que sirve de control. Si los tratamientos inhiben el crecimiento, esto se refleja en un menor desarrollo celular de la gota respecto al control. Cuanto mayor es la concentración y mayor es la inhibición, este defecto del desarrollo es aparente antes (en gotas con mayor concentración celular). Una concentración de 28 μM de edelfosina inhibió el crecimiento del tipo silvestre BY4741, en medio tanto complejo como definido (ilustración 15, A-B). Se incluyeron además como comparación el mutante de delección *lem3 Δ* , que es resistente a edelfosina¹⁰¹ y por tanto es idéntico en tratamiento y control, y el mutante *vps35 Δ* , parcialmente resistente que, muestra un aspecto intermedio entre las otras dos cepas en el tratamiento. Se observó consistentemente que las concentraciones de ATLS necesarias para inhibir el crecimiento en medio sólido mediante esta técnica eran mayores que en medio líquido. Esto puede deberse a una menor disponibilidad del compuesto en la región del agar en contacto con las células y a la alta densidad celular en las gotas que se transfieren al medio sólido.

En los posteriores experimentos del presente trabajo se empleó preferentemente el medio de cultivo complejo, que permitía un crecimiento más rápido de las células, excepto cuando la naturaleza misma del experimento obligó a emplear un medio de cultivo definido.

Las curvas de crecimiento indicaron únicamente que tras la administración exógena de ATLS al medio de cultivo se detiene la proliferación celular. Esta inhibición del crecimiento podría deberse a que los compuestos provoquen una pérdida definitiva de la viabilidad celular o a que ejerzan un efecto citostático. Aunque ambos estados serían indistinguibles en un ensayo de crecimiento, en el segundo caso las células mantendrían la viabilidad y el bloqueo de la proliferación sería reversible, al menos durante un periodo. Se comprobó por tanto si las células no proliferantes recuperaban la capacidad de dividirse al transferirlas a medio fresco mediante un ensayo clonogénico en medio sólido. Cultivos de idéntica densidad celular se trataron con los compuestos a ensayar. Tras los tiempos de tratamiento indicados se tomaron muestras con el mismo número de células de cada cultivo, y se sembraron en

placas con medio sólido fresco. Este medio sin ATL permitiría a las células que hubiesen mantenido la viabilidad recuperarse y volver a dividirse. Al tratarse de medio sólido y las células estar inmóviles, cada célula viable es una unidad formadora de colonias (UFC).

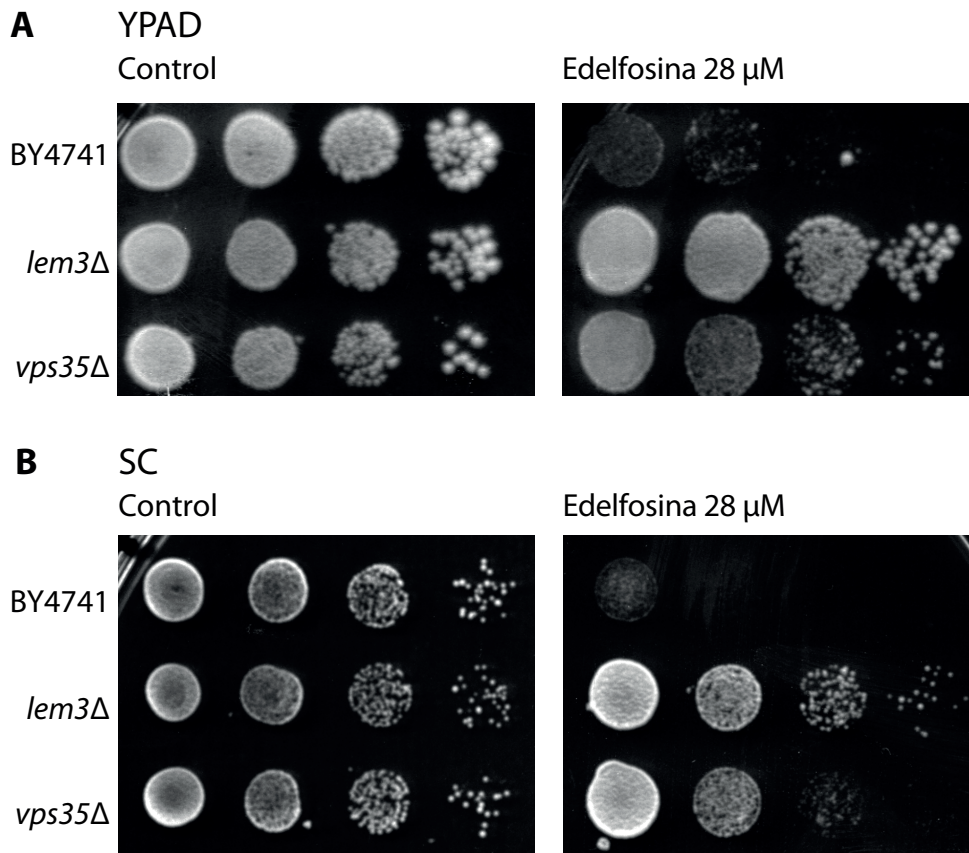


Ilustración 15: sensibilidad a edelfosina en medio sólido. Se compararon la cepa BY4741 y los mutantes isogénicos *lem3Δ* y *vps35Δ*, resistentes al compuesto. **A:** Medio complejo (YPAD). **B:** Medio definido (SC).

El ensayo clonogénico confirmó que la inhibición del crecimiento que provocan los tres compuestos a 10 μM es realmente una pérdida irreversible de la viabilidad celular. Las células control mostraron el crecimiento exponencial esperado, mientras que en los tres tratamientos se produjo una caída de la viabilidad celular (ilustración 16 A). La caída de viabilidad en tratamientos con miltefosina o perifosina fue evidente desde 30 minutos de tratamiento, mientras que con edelfosina fue menos acusada. No obstante, tras 120 minutos de tratamiento con edelfosina sólo un bajo porcentaje (11,4%) de las células iniciales mantienen la viabilidad (10,6% en el tratamiento con miltefosina y 0,3% en el de perifosina). La repetición del ensayo a tiempos intermedios de tratamiento (ilustración 16 B) reveló que en edelfosina la fase citotóxica aparece sólo a partir de 40 minutos de tratamiento, disminuyendo entonces la viabilidad con un ritmo semejante al observado con los otros dos compuestos. La aparición de una primera fase no citotóxica ha sido corroborada en otros estudios^{305,316}, aunque para la misma concentración de edelfosina tuvo una duración de hasta 90 minutos. Por tanto se apreciaron dos efectos distintos: la edelfosina tuvo efecto citostático, seguido de citotoxicidad a partir de 50

minutos; pero con miltefosina y perifosina sólo se observó citotoxicidad, ya presente tras 30 minutos de tratamiento.

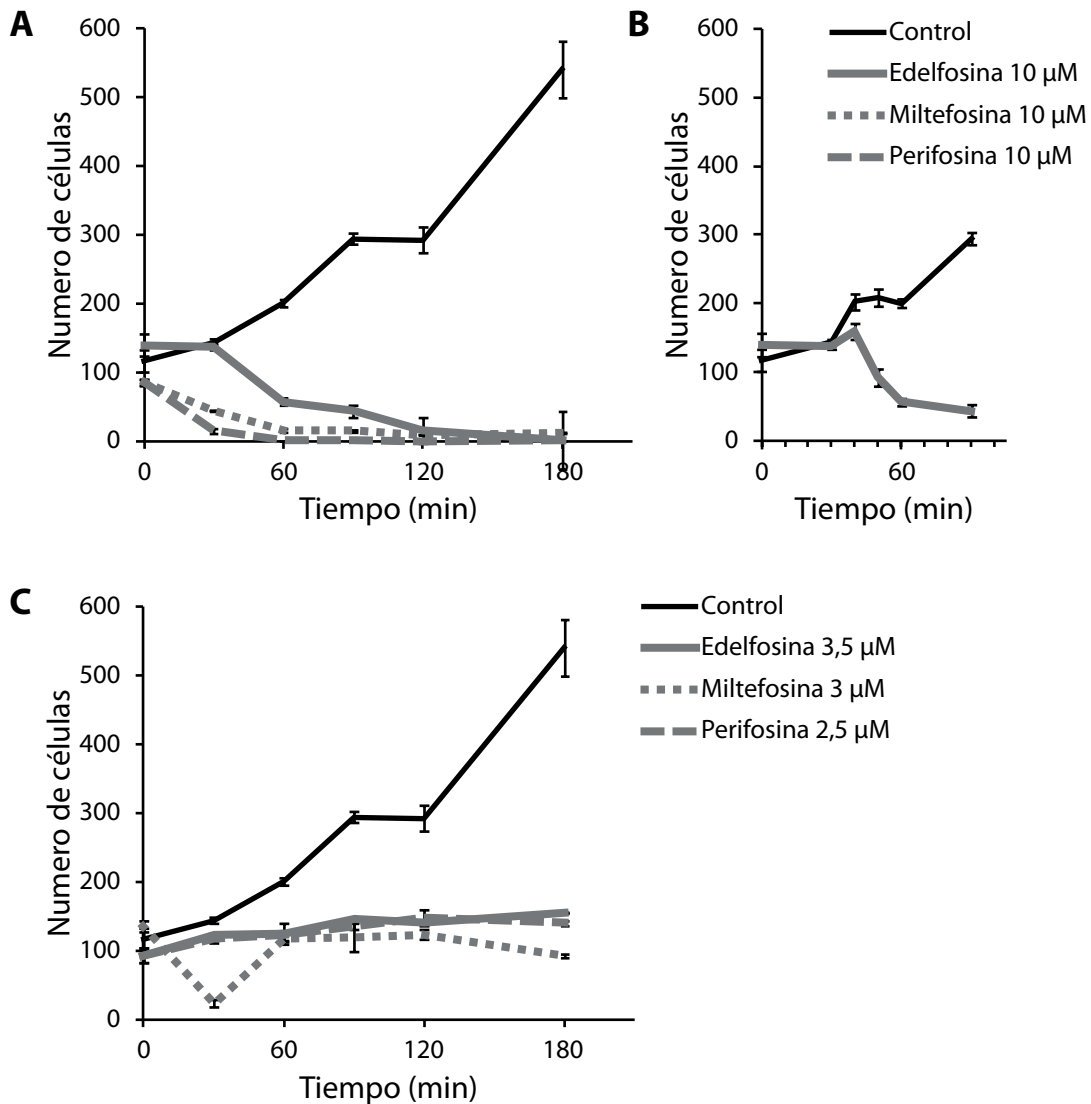


Ilustración 16: la inhibición del crecimiento por edelfosina, miltefosina y perifosina se debe a letalidad celular. **A:** viabilidad celular tras tratamientos de 10 µM. **B:** detalle de la viabilidad celular en el tratamiento con edelfosina entre 30 y 60 minutos. **C:** viabilidad celular en tratamientos a concentraciones bajas de los compuestos. Promedios de tres experimentos ± EEM.

Los ATLs estudiados mostraron, dentro de un mismo orden de magnitud, distintas eficacias (ilustración 14). A una misma concentración (10 µM) los tres compuestos podrían actuar con distintas velocidades, y provocar la aparición de citotoxicidad a distintos tiempos de tratamiento. Sólo antes de la aparición de la citotoxicidad por ATLs es posible observar un posible efecto citostático. Concentraciones subletales de los tres ATLs, con las que el crecimiento fue suficiente para alcanzar saturación tras 24 horas, provocaron sin embargo un retraso en el crecimiento a tiempos < 8 h (ilustración 14). Este retraso podría deberse a un efecto citostático de los compuestos, visible en condiciones de citotoxicidad reducida. Se comprobó la existencia de dicho efecto mediante un

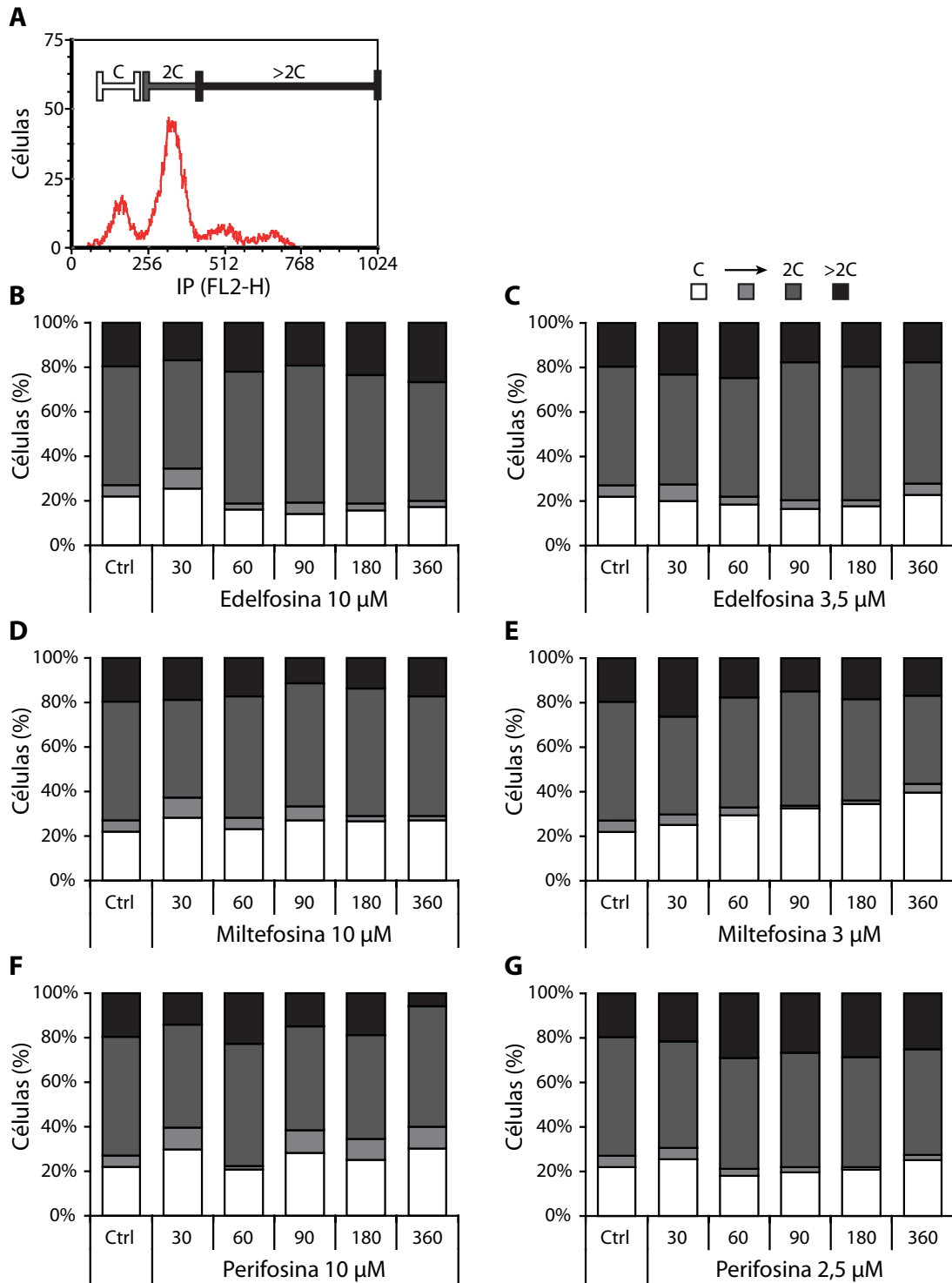


Ilustración 17: efecto de los ATs en el ciclo celular. A: ejemplo de histograma de una muestra tratada con edelfosina 3,5 μ M 180 minutos y marcadores empleados para el contenido de ADN de cada región del histograma. B-G: Porcentaje de las células con el contenido en ADN señalado en la leyenda tras el tiempo de tratamiento indicado (en minutos).

ensayo clonogénico. Concentraciones de los tres ATs cercanas a 3 μ M impidieron el crecimiento, manteniéndose la viabilidad celular más o menos constante (ilustración 16 C).

Determinados fármacos antiproliferativos tienen un patrón de dos efectos sobre el crecimiento semejante. En primer lugar bloquean el ciclo celular en una fase determinada, impidiendo su progresión. Un bloqueo suficientemente prolongado puede llevar a la muerte celular. Para determinar si los ATLS probados estaban actuando de este modo se realizaron ensayos de ciclo celular por citometría de flujo (FACS). Se fijaron las células y se marcó su ADN con yoduro de propidio. Aunque se sonicaron las muestras para separar las yemas maduras de las células madre, los histogramas obtenidos con esta técnica no fueron completamente limpios, a causa de determinadas características de *S. cerevisiae* (alto contenido celular de ADN mitocondrial, interferencia de la pared celular en la tinción, persistencia de la unión entre la célula madre y la yema tras la mitosis³¹⁷). Sin embargo dos picos correspondientes a distintos contenidos en ADN fueron distinguibles, separados por una región variable y seguidos por uno o varios picos menores (ilustración 17 A).

A partir de los histogramas respectivos se cuantificó el porcentaje de las células que presentaba cada contenido de ADN en todas las condiciones estudiadas (ilustración 17 B-G). Los tratamientos de distinta duración con cada compuesto mostraron pocas diferencias con el control. En el tratamiento

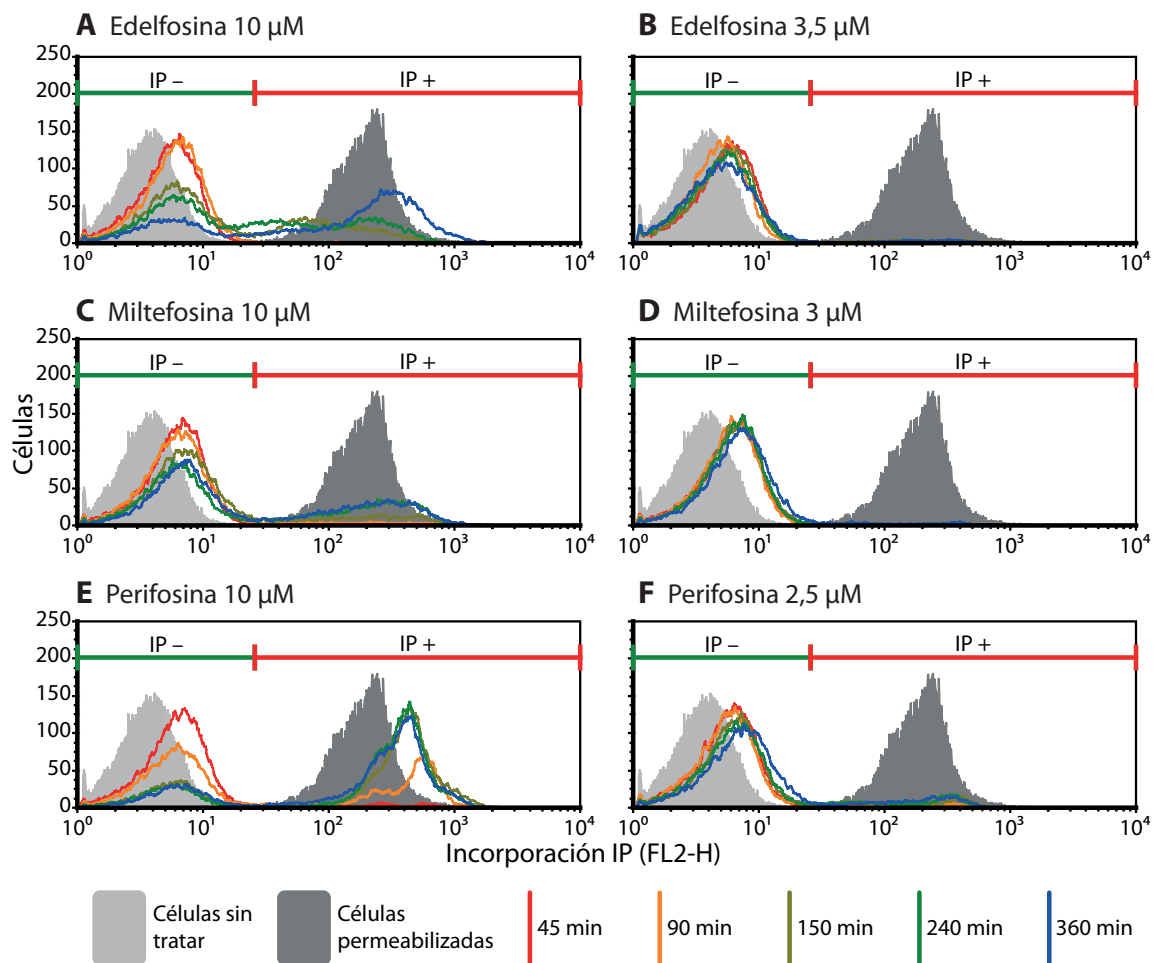


Ilustración 18: incorporación de IP a células tratadas con ATLS. Histogramas de FACS representando número de células/intensidad de fluorescencia (FL2-H). A, B: edelfosina 10 y 3,5 μM . C, D: miltefosina 10 y 3 μM . E, F: perifosina 10 y 2,5 μM . Histogramas correspondientes a un experimento representativo.

de miltefosina 3 μM (ilustración 17 E) sí apareció ligero aumento de las células de contenido C (ADN de una célula haploide) a costa de las células 2C que podría indicar un bloqueo del ciclo en la fase G1. En el resto de tratamientos no se apreció un efecto claro sobre el ciclo celular, ni un bloqueo de la progresión del mismo, a altas o bajas concentraciones de ATLS. Una vez establecido el efecto de los ATLS sobre la viabilidad celular, se llevaron a cabo experimentos para evaluar el estado vital de las células. Es preciso distinguir entre pérdida de la viabilidad y muerte. Una célula inviable es aquella que ha alcanzado un punto, durante el proceso de toxicidad, en el que queda comprometida a sufrir letalidad celular. Dicha célula se encuentra en proceso irreversible que conducirá a su muerte, pero no está muerta aún. El comité de nomenclatura en muerte celular establecido por la revista *Cell Death and Differentiation* estableció varios parámetros que permiten determinar si una célula está muerta, siendo uno de ellos la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (MP)³¹⁸. Puede estudiarse este parámetro con las denominadas tinciones vitales, que son excluidas por células vivas con una membrana plasmática intacta pero tiñen células muertas.

Se monitorizó por tanto la permeabilización de la membrana plasmática mediante la incorporación celular de yoduro de propidio. Utilizando como control negativo células no tratadas y como control positivo células fijadas con etanol, cuya membrana se encuentra completamente permeabilizada, se estudió la velocidad con que los ATLS provocaban la transformación de las células sanas (IP -) en células muertas (IP +). Los resultados de los tratamientos a 10 μM se muestran en la ilustración 18 A-C. En los tres casos se observó una relación tiempo-respuesta entre la aparición de células muertas y el tratamiento, al igual que ocurría con la pérdida de viabilidad (ilustración 16 A). La cuantificación de la proporción de células muertas (ilustración 19) reveló además diferencias entre el efecto de los tres ATLS. Tras 6 horas de tratamiento de edelfosina o perifosina las células muertas eran aproximadamente el doble que con miltefosina. La letalidad de perifosina fue, por tanto, mayor que la de edelfosina y ésta mucho mayor que la de miltefosina; por el contrario, la caída de viabilidad provocada por 10 μM miltefosina y perifosina fueron semejantes, y más veloces que la edelfosina.

El proceso de toxicidad inducido por los tres compuestos presentó diferencias adicionales. 10 μM de edelfosina indujo una fase citotóxica a partir de 50 minutos. La progresión de la citotoxicidad fue relativamente rápida: a los 150 min estaban ya muertas un 33,9% de las células y tras 6 h, 66,8%. 10 μM de perifosina indujo más velozmente la fase citotóxica, que ya era visible a los 30 minutos de tratamiento. La progresión de la citotoxicidad fue más rápida que con edelfosina: a los 150 minutos un 59,8% de las células estaban muertas, alcanzándose el 76,9% tras 6 h. 10 μM de miltefosina indujo la fase citotóxica tan rápidamente como la perifosina. Sin embargo el mecanismo de citotoxicidad provocó la muerte celular más lentamente incluso en comparación con edelfosina: a 150 minutos sólo el 22,8% de las células estaban muertas, y tras 6 h sólo el 35,9%.

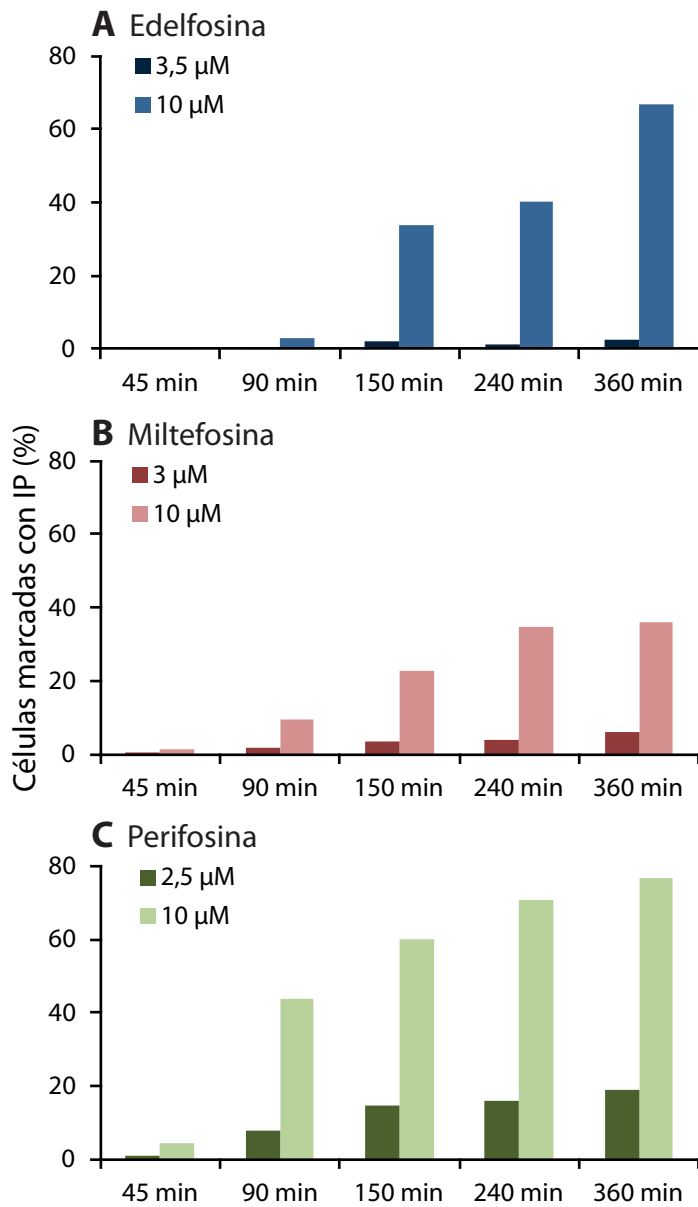


Ilustración 19: permeabilización de membrana provocada por distintas concentraciones de edelfosina, miltefosina y perifosina. Porcentaje de las células positivas para la tinción de IP tras el tiempo indicado de tratamiento. A: edelfosina 10 y 3,5 µM. B: miltefosina 10 y 3 µM. C: perifosina 10 y 2,5 µM. Promedios de dos experimentos independientes.

La permeabilización de la membrana por 3,5 µM edelfosina y 3 µM miltefosina fue muy reducida (1,4% y 5,9% respectivamente tras 6 h). Esto parece confirmar que a bajas concentraciones ambos fármacos indujeron una fase citostática, en la que se detenía la proliferación celular pero que no progresaba a la fase citotóxica (observada a 10 µM), no disminuyendo la viabilidad celular ni conduciendo a corto plazo a la muerte. La permeabilización de membrana con 2,5 µM de perifosina fue mayor: tras tan sólo 150 minutos alcanzó un 14,7% de las células. Esta letalidad celular no fue suficientemente elevada como para ser incompatible con la viabilidad

celular más o menos constante observada en otros experimentos (ilustración 16 C).

Escrutinio de mutantes resistentes y sensibles a ATLs

El escrutinio (*screening*) de mutantes resistentes o sensibles a ATLs sirvió como punto de partida para experimentos posteriores. El *screening* de resistencia se llevó a cabo en los laboratorios de los doctores Faustino Mollinedo y José Luis Revuelta, y el *screening* de sensibilidad fue llevado a cabo

en el laboratorio de la doctora Vanina Zarembeg. Los datos resultantes de ambos *screenings* fueron recogidos en artículos científicos realizados en colaboración^{319,320}.

Realización del escrutinio de mutantes resistentes a edelfosina y miltefosina

La secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*²⁹⁵ fue un primer paso para la caracterización funcional completa de sus genes. Un consorcio internacional denominado *Yeast Genome Deletion Project* afrontó la tarea de generar cepas con deleciones individuales en cada uno de los genes²⁹⁷. La colección de mutantes *knock-out* (KO) generados se encuentra públicamente disponible y ha sido empleada para la caracterización funcional de múltiples procesos²⁹⁹. Una copia de la mencionada colección se empleó en el *screening* de mutantes resistentes a ATLs. El objetivo era identificar rutas y procesos que intervenían en el mecanismo de toxicidad de los compuestos. Si la deleción de uno o varios de los genes de una ruta provoca resistencia al ATL ensayado, esto indicaría que el compuesto usa dicha ruta para ejercer su toxicidad. El conjunto de genes identificados mediante el *screening* de la colección completa permitiría caracterizar detalladamente las rutas del mecanismo de toxicidad.

Un primer paso previo a la realización del *screening* fue determinar la concentración mínima de edelfosina o miltefosina necesaria para inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae*. Se emplearon las mismas condiciones que en el *screening*: medio definido, crecimiento en placas multipocillo a 30 °C sin agitación y determinación del crecimiento según la densidad óptica (DO) del cultivo tras 48 horas de tratamiento. La relación dosis-respuesta se comprobó para varias cepas: la cepa haploide BY4741, tipo silvestre (WT) de referencia para la colección de mutantes; la cepa diploide BY4743; y tres mutantes en genes cuyo papel en la incorporación de ATLs había sido descrito previamente: *lem3Δ*¹⁰¹, *dnf2Δ* y *drs2Δ*⁹⁶. Como se muestra en la ilustración 20 A, la cepa silvestre sufrió una inhibición total del crecimiento a partir de 15 μM edelfosina, mientras que la cepa resistente *lem3Δ* era resistente a concentraciones ≥ 60 μM. La cepa diploide tuvo una respuesta esencialmente idéntica a la de la haploide, y los otros dos mutantes *dnf2Δ* y *drs2Δ* tuvieron una respuesta intermedia, inhibiéndose su crecimiento a dosis más altas (35 μM y 17,5 μM respectivamente). De manera semejante, el crecimiento de la cepa silvestre sufrió inhibición a partir de 6,13 μM miltefosina mientras que la cepa *lem3Δ* fue resistente a ≥ 24 μM (ilustración 20 B). Con este compuesto los otros dos mutantes también tuvieron una respuesta intermedia, inhibiéndose su crecimiento a 24,5 μM. La cepa diploide fue ligeramente más resistente que la haploide.

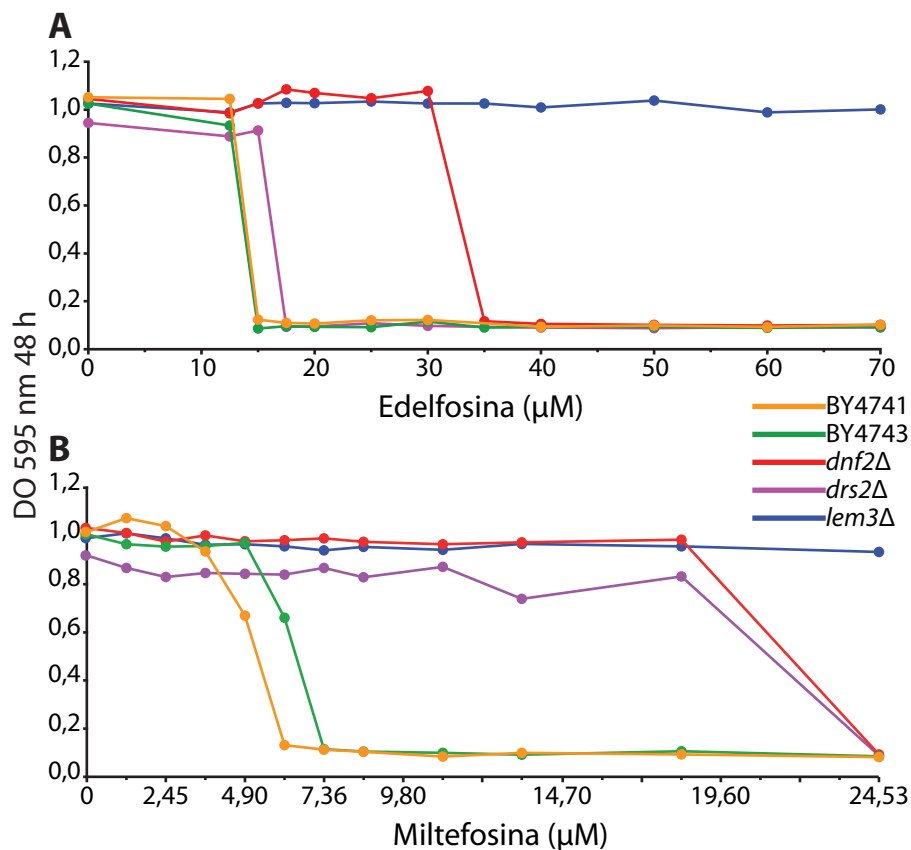


Ilustración 20: relación entre la dosis empleada y la inhibición del crecimiento. **A:** Edelfosina. **B:** Miltefosina. Panel A adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2013³¹⁹. Experimento único.

Seguidamente se comprobó el crecimiento de la colección de mutantes, inoculándose placas con medio sin y con edelfosina. Los mutantes disponibles tienen distintas velocidades de crecimiento; no obstante, la práctica totalidad de las cepas estudiadas alcanzaron en medio sin edelfosina una densidad celular semejante a los controles del WT tras 72 horas (ilustración 21 A, puntos rojos y azules respectivamente), estableciéndose por tanto el tiempo de tratamiento para la selección en 72 horas. Dado que la mayoría de las cepas se mostraron idénticamente sensibles al WT o levemente más resistentes, y teniendo en cuenta la variabilidad natural del experimento, se prefirieron condiciones muy selectivas para evitar en casi todas las réplicas seleccionar falsos resistentes. Este punto de corte resultaría así en la selección de un grupo muy reproducible de mutantes. Se seleccionaron por tanto los mutantes con un crecimiento en presencia de edelfosina ≥ 4 veces al crecimiento promedio de las células control (ilustración 21 A, línea verde). Se emplearon 60 μM de edelfosina, una concentración que permitió que los mutantes seleccionados fueran pocos pero todos muy resistentes (ilustración 20). El mismo experimento se realizó con miltefosina (ilustración 21 B). Tras 120 h 8,6 μM del compuesto fueron suficientes para discriminar entre el reducido grupo de cepas resistentes y las de sensibilidad semejante al control, mayoritarias. Un total de 262 mutantes resistentes a edelfosina y 257 resistentes a miltefosina pudieron aislarse en estos *screenings*.

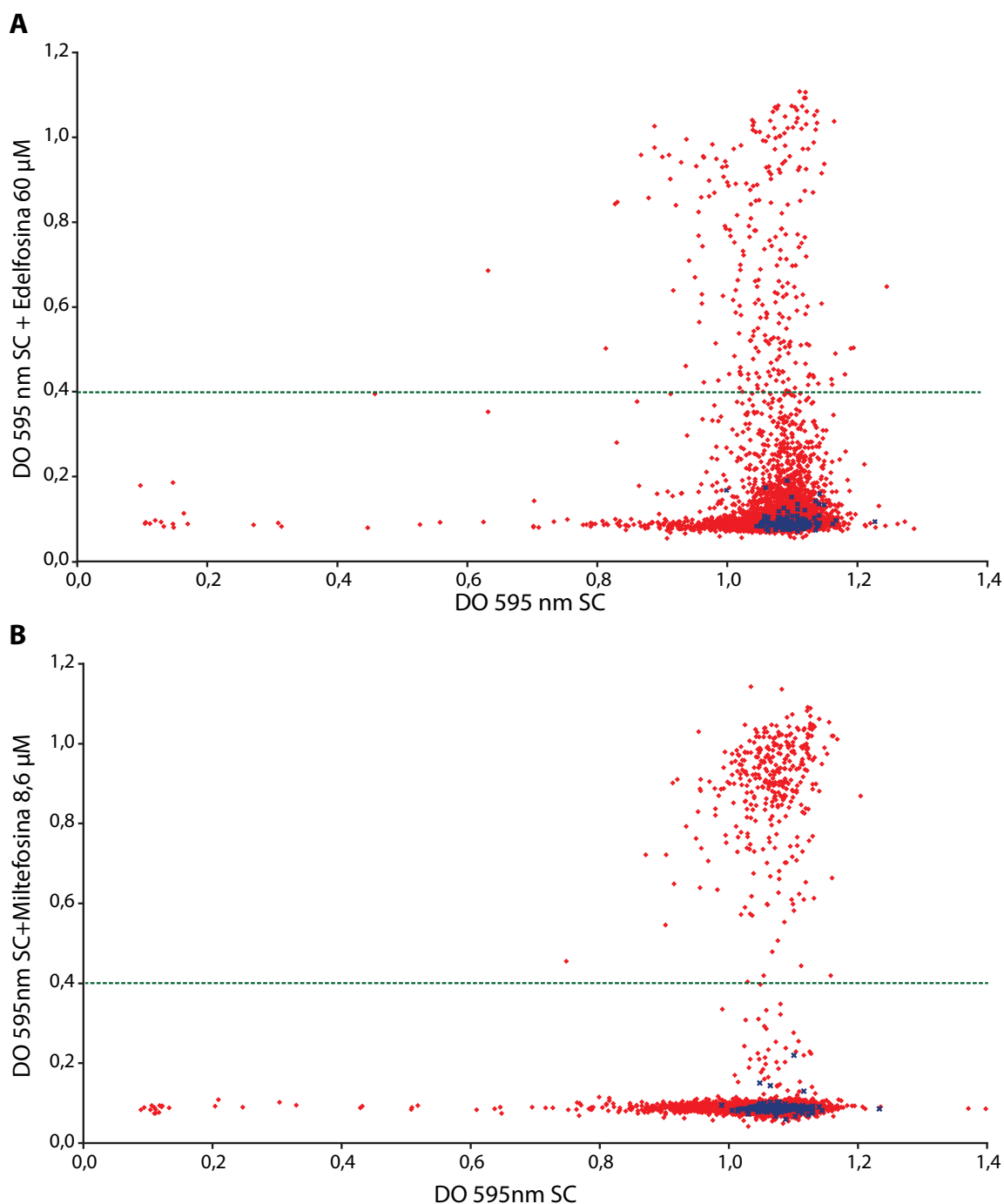


Ilustración 21: crecimiento en medio líquido de las cepas KO. Puntos rojos: mutantes de delección. Puntos azules: control del WT (BY4741). Línea verde: punto de corte de las cepas resistentes. **A:** *Screening* 60 μ M edelfosina tras 72 horas. **B:** *Screening* 8,6 μ M miltefosina tras 120 horas. Panel A adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2013³¹⁹.

Realización del escrutinio de mutantes sensibles a edelfosina

Se identificaron también mutantes sensibles a edelfosina, buscándose cepas con un crecimiento menor que el tipo silvestre BY4741. El *screening* de mutantes sensibles se realizó mediante una estrategia análoga a la de resistentes, con algunas modificaciones. La inoculación de las distintas cepas se realizó mediante un sistema robotizado de dispensación de gotas sobre medio sólido. El área

cubierta por células tras la incubación fue proporcional al crecimiento del inóculo. Debido a las altas densidades celulares de los inóculos iniciales y la menor eficacia de los compuestos en medios con agar fue necesario aumentar la concentración hasta 190 μM de edelfosina. Se estableció el punto de corte tras 48 horas en función del ratio del área del punto en medio sin y con edelfosina, detectable por análisis de las imágenes de las placas (ilustración 22). Mientras el crecimiento a 190 μM del tipo silvestre fue idéntico en ambas placas, las cepas sensibles mostraron un crecimiento menor en presencia del compuesto (ilustración 22, \rightarrow). 54 mutantes sensibles a edelfosina pudieron ser aislados en este *screening*.

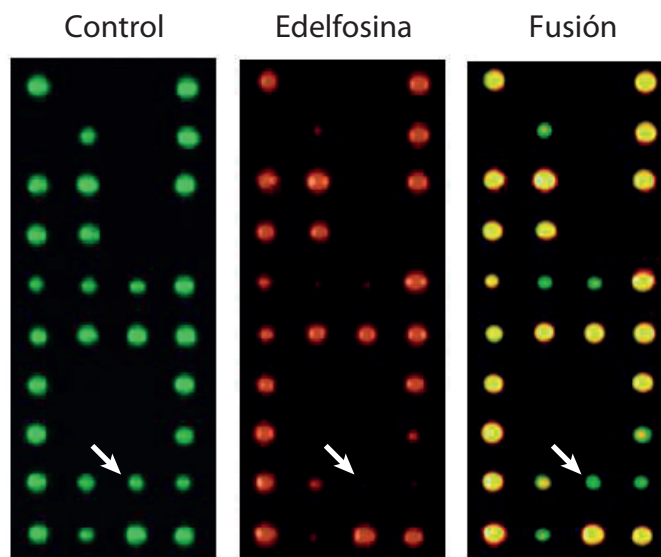


Ilustración 22: crecimiento en medio sólido de las cepas KO. **Panel izquierdo:** cepas dispensadas sobre una placa con medio sin edelfosina, imagen con pseudocolor verde. **Panel central:** idénticas cepas, dispensadas sobre una placa con edelfosina 190 μM , imagen con pseudocolor rojo. **Panel derecho:** fusión de ambas imágenes. El mismo área de crecimiento en las placas sin y con edelfosina generan un pseudocolor amarillo; un menor crecimiento en las placas con edelfosina genera un pseudocolor verde (\rightarrow). Adaptado de Czyz *et al*, 2013³²⁰.

Análisis bioinformático de los genes identificados en los *screenings*

A partir de los genes identificados se buscaron patrones para determinar procesos y localizaciones celulares relevantes para la toxicidad de los compuestos. En este análisis de datos se emplearon, en primera instancia, herramientas bioinformáticas y bases de datos de acceso público. Posteriormente se consultó la bibliografía existente para un análisis más preciso que permitiera identificar y relacionar elementos que el análisis informático pudiera pasar por alto.

Las listas de genes se analizaron con la interfaz web Funspec³²¹, configurada para examinar 3 parámetros: función molecular, componente celular/localización subcelular y proceso biológico/clasificación funcional. Los genes de levadura están anotados para cada parámetro y categorizados en consecuencia en dos bases de datos: Gene Ontology³²² (códigos GO indicados) y MIPS³²³. Funspec examina en qué categorías se incluyen los genes de la lista, y determina cuáles están sobrerrepresentadas en la misma (respecto a lo que se esperaría si la lista fuera una muestra aleatoria

de genes). Posteriormente, mediante un contraste de hipótesis, calcula la probabilidad (P) de que el enriquecimiento observado para una categoría en la lista de genes proporcionada se deba únicamente al azar. El enriquecimiento puede además cuantificarse respecto a lo que se esperaría de una muestra aleatoria de genes, según indica el factor de enriquecimiento (FE).

Análisis de los genes implicados en resistencia a edelfosina

Los 262 genes implicados en resistencia a edelfosina se recogen en la la tabla supl. 1, tras ser analizados revisando la bibliografía para clasificarlos correctamente. De ellos, 16 eran genes dudosos y 18 no tenían función conocida, sumando así un 12,98% del total (ilustración 23 A).

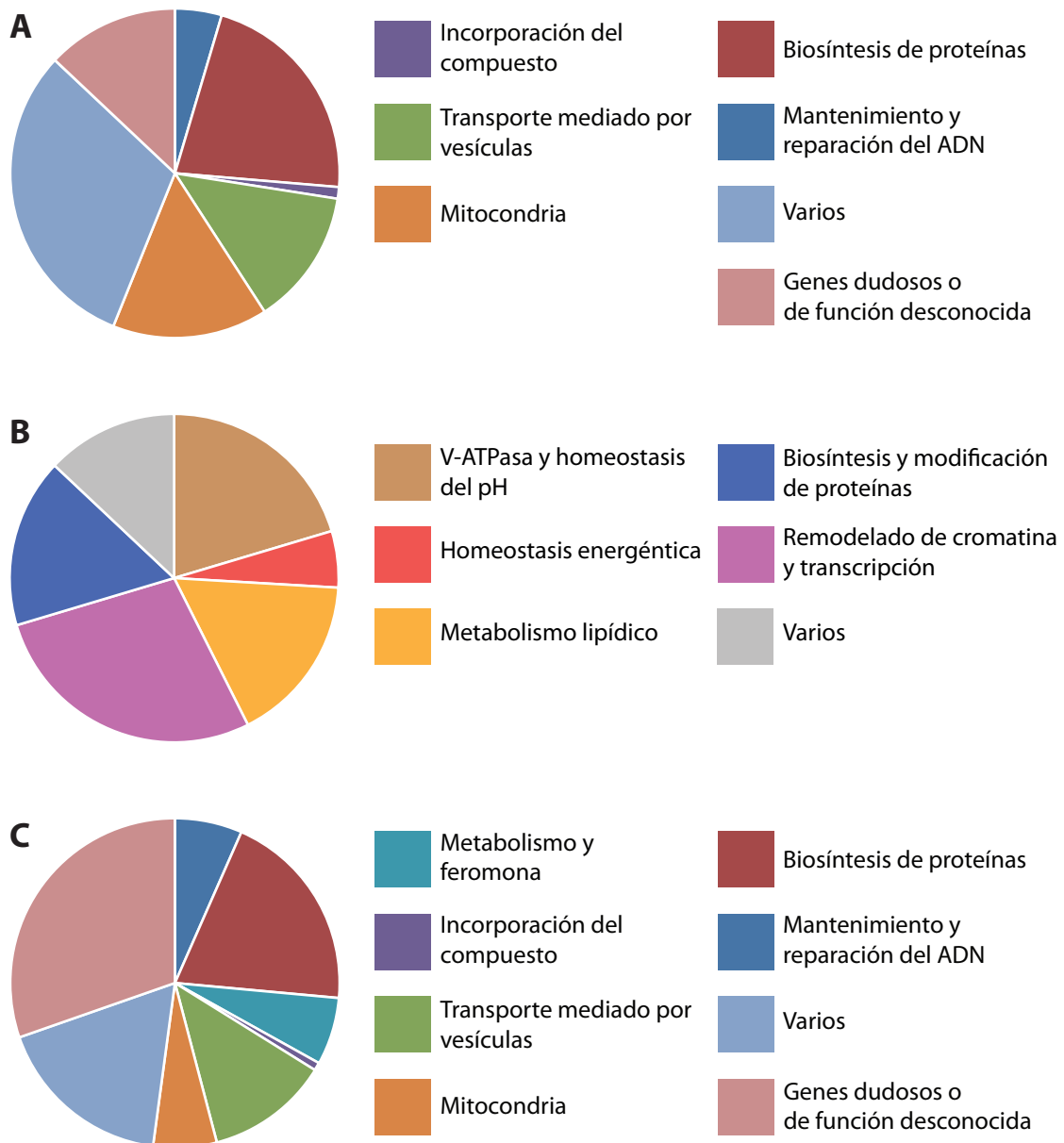


Ilustración 23: funciones de los genes identificados en los *screenings*. A: genes implicados en resistencia a edelfosina. B: genes implicados en sensibilidad a edelfosina. C: genes implicados en resistencia a miltefosina. Panel A adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2013³¹⁹. Panel B adaptado de Czyz *et al*, 2013³²⁰.

Entre las categorías que reveló el análisis informático, la síntesis proteica claramente juega un papel en la toxicidad de edelfosina: fueron significativos los enriquecimiento de las categorías *Constituyente estructural del ribosoma* (GO:0003735; $P = 3,887 \cdot 10^{-7}$, FE = 3,01), *Actividad aminoacil-ARNt ligasa* (GO:0004812; $P = 5,149 \cdot 10^{-3}$, FE = 3,69) y *Ribosoma* (GO:0005840; $P = 1,227 \cdot 10^{-5}$, FE = 2,36). Fue destacable que un número considerable de los genes se asociaron específicamente a la categoría *Traducción mitocondrial* (GO:0032543; $P = 4,346 \cdot 10^{-8}$, FE = 4,87). El conjunto de genes implicados en síntesis proteica –incluyendo los que participan en maduración de ribosomas, transcripción, regulación de histonas y modificación proteica por glicosilación– representó un 21,76% de los mutantes (ilustración 23 A).

Otra categoría estadísticamente significativa fue la de *Unión a ADN mal apareado* (GO:0030983; $P = 4,21 \cdot 10^{-4}$, FE = 10,09) y otras relacionadas como *Reparación de mal apareamiento* (GO:0006298; $P = 3,138 \cdot 10^{-3}$, FE = 4,85). También en este caso hay que destacar la categoría relacionada *Mantenimiento del genoma mitocondrial* (GO:0000002; $P = 2,632 \cdot 10^{-3}$, FE = 4,20). El conjunto de genes implicados en reparación y mantenimiento del ADN representó un 4,58% de los mutantes (ilustración 23 A). Hay que señalar que mutaciones en el mecanismo de mantenimiento del ADN pueden provocar mutaciones secundarias. En este sentido, se han observado cepas con una única deleción y alteraciones en el nivel de expresión de múltiples genes; sin embargo tales alteraciones no eran directamente causadas por la mutación inicial, sino que se debían a una aneuploidía adquirida³²⁴. De manera semejante, mutaciones de mecanismos de síntesis proteica pueden llevar a alteraciones en la producción de otras proteínas. Para ninguna de las dos categorías es descartable que sean mutaciones secundarias y no la mutación en sí las que provoquen la resistencia a edelfosina.

Transporte de H^+ acoplado a síntesis de ATP (GO:0015986, $P = 3,153 \cdot 10^{-5}$, FE = 8,90) y categorías análogas aparecieron en el análisis, recogiendo todas ellas genes que codifican subunidades de la ATPasa mitocondrial²⁹¹. Las categorías anteriormente mencionadas ya indicaban un papel de la mitocondria en la toxicidad por edelfosina, y de hecho el análisis bioinformático reveló otras categorías relacionadas con este orgánulo: *Inicio de la traducción mitocondrial* (GO:0070124; $P = 5,821 \cdot 10^{-4}$, FE = 15,13), *Biosíntesis de ubiquinona* (GO:0006744; $P = 9,318 \cdot 10^{-4}$, FE = 8,41), *Biogénesis del complejo IV de la cadena de transporte de electrones* (GO:0097034; $P = 2,982 \cdot 10^{-3}$, FE = 9,46) y *Biogénesis del complejo III de la cadena de transporte de electrones* (GO:0097033; $P = 8,925 \cdot 10^{-3}$, FE = 12,61). El enriquecimiento más significativo se encontró en la categoría *Mitocondria* (GO:0005739; $P = 3,746 \cdot 10^{-8}$, FE = 1,81), indicativo de un papel claro de este orgánulo en la toxicidad causada por edelfosina. Se clasificaron un 15,27% de los genes como implicados en función mitocondrial (ilustración 23 A).

Se encontraron varios genes cuyo papel en el transporte de ATLS había sido previamente descrito, y que era previsible encontrar si el screening se había realizado correctamente. La categoría

de *Translocación de fosfolípidos* (GO:0045332; $P = 2,982 \cdot 10^{-3}$, FE = 9,46) realmente indicó que un 1,15% de los genes estaban implicados en la incorporación de los compuestos (ilustración 23 A).

Además de *Ribosoma y Mitocondria*, la tercera categoría de localización significativamente enriquecida fue *Endosoma* (GO:0005768; $P = 1,401 \cdot 10^{-10}$, FE = 5,14). El endosoma es una plataforma en la que se entrecruzan distintas vías de transporte vesicular, varias de las cuales presentaron enriquecimiento en el listado de genes: *Retención de proteínas en el aparato de Golgi* (GO:0045053; $P = 4,121 \cdot 10^{-08}$, FE = 16,05), *Transporte endosoma-vacuola* (GO:0045324; $P = 4,597 \cdot 10^{-07}$, FE = 10,09), *Transporte mediado por ubiquitina al cuerpo multivesicular* (GO:0043162; $P = 7,004 \cdot 10^{-07}$, FE = 11,77), *Transporte de proteínas a la vacuola* (GO:0006623; $P = 3,075 \cdot 10^{-06}$, FE = 6,15), *Transporte retrógrado endosoma-aparato de Golgi* (GO:0042147; $P = 0,5301 \cdot 10^{-3}$, FE = 7,00) y *Endocitosis* (GO:0006897; $P = 1,399 \cdot 10^{-3}$, FE = 3,07). Según recoge la ilustración 23 A, se consideraron finalmente un 13,36% de los genes relacionados con el transporte vesicular.

El 30,92% restante de los genes restantes resultaron difíciles de clasificar en categorías, bien por no ser aparente su relación con otros genes en función de parámetro alguno, bien por formar grupos muy pequeños o de baja significación estadística. Se agruparon como “Varios” (ilustración 23 A) genes de, entre otros: biogénesis de la pared celular, proteínas de choque térmico, respuesta a metabolismo de nitrógeno, respuesta a estrés, silenciamiento de *loci* de apareamiento, producción y maduración del factora, proteasoma, neddilación, complejo CCR4-NOT y complejo APC.

Análisis de los genes implicados en sensibilidad a edelfosina

El análisis bioinformático de los 54 genes identificados en el *screening* de sensibilidad (tabla supl. 2) reveló enriquecimiento en ciertas categorías. Esto permitió identificar otras funciones celulares potencialmente implicadas en el mecanismo de toxicidad del compuesto (ilustración 23 B).

Entre las categorías identificadas como significativamente enriquecidas en los 54 genes estaba la *Biosíntesis de ácidos grasos* (GO:0006633; $P = 2,621 \cdot 10^{-05}$, FE = 22,25). Fueron agrupados con otros genes que participan en otros procesos relacionados con el metabolismo lipídico (17%, ilustración 23 B). La categoría *Proteína-quinasa activada por AMP* (GO:0004679; $P = 0,642 \cdot 10^{-3}$, FE = 48,94) agrupó genes implicados en homeostasis del estado energético (6%).

De especial relevancia fueron las categorías *ATPasa vacuolar, dominios V_0* (GO:0000220; $P = 1,373 \cdot 10^{-07}$, FE = 69,91) y *V_1* (GO:0000221; $P = 2,73 \cdot 10^{-07}$, FE = 61,17) y *Acidificación vacuolar* (GO:0007035; $P < 1 \cdot 10^{-14}$, FE = 47,05), indicativos de un enriquecimiento muy significativo en genes de la ATPasa vacuolar. El 20% de los genes identificados tienen una función relacionada con la homeostasis de iones o pH (ilustración 23 B).

Análisis de los genes implicados en resistencia a miltefosina y comparación con el *screening* de resistencia a edelfosina

Los 257 genes implicados en resistencia a miltefosina se recogen en la tabla supl. 3. Se identificó un número de genes dudosos o sin función conocida mucho mayor que en el *screening* de edelfosina, sumando 78 (30,4% del total). A primera vista los genes del *screening* de miltefosina pueden agruparse en categorías semejantes a las observadas en edelfosina (ilustración 23 C). Los porcentajes fueron semejantes para los conjuntos de genes agrupados por su función en biosíntesis de proteínas (19,8%), mantenimiento y reparación del ADN (6,6%) y tráfico vesicular (12,1%). Los genes agrupados por su función mitocondrial sí fueron notablemente menos abundantes (6,2%), lo que sugiere una diferencia respecto a dicho orgánulo en el mecanismo de toxicidad de miltefosina y edelfosina. Se formó además un nuevo grupo con los genes implicados en diversos procesos metabólicos (6,6%)

Los porcentajes semejantes podrían interpretarse como evidencia de un mecanismo de toxicidad al menos parcialmente compartido entre ambos compuestos. Sin embargo el análisis informático no mostró enriquecimiento significativo en todos los procesos celulares que se observaron con edelfosina, lo que está de acuerdo con el bajo número de mutantes resistentes a ambos compuestos (50). En general, se identificaron por análisis bioinformático menos categorías funcionales enriquecidas en el *screening* de miltefosina, y la significación fue muy baja. En relación al mantenimiento del ADN, aparecieron categorías como *Unión a ADN mal apareado* (GO:0030983; $P = 3,683 \cdot 10^{-4}$, FE = 10,27). Por el contrario no se apreció enriquecimiento en procesos concretos englobados en biosíntesis de proteínas.

Sí coincidieron *Endosoma* (GO:0005768; $P = 5,703 \cdot 10^{-5}$, FE = 3,33) y *Transporte retrógrado endosoma-aparato de Golgi* (GO:0042147; $P = 2,473 \cdot 10^{-6}$, FE = 9,99), lo que indica que el enriquecimiento de genes implicados en transporte a través del endosoma se corresponde con funciones concretas y, por tanto, probablemente es relevante para el mecanismo de toxicidad del compuesto. Sin embargo, no se observó un enriquecimiento significativo en procesos relacionados con la mitocondria o con el metabolismo celular. En el *screening* de miltefosina los genes relacionados con la mitocondria o el metabolismo (o alguno de los procesos asociados con los mismos) no fueron más abundantes de lo que se esperaría de una muestra aleatoria de genes. Por tanto, la resistencia otorgada por los mutantes incluidos en esas categorías se debe, seguramente, a aspectos que nada tienen que ver con su participación en la mitocondria o en el metabolismo celular.

Ni el análisis bioinformático ni una revisión bibliográfica posterior sugirieron otras categorías que agruparan un número significativo de genes y que pudieran indicar un proceso o compartimento celular significativo para la toxicidad por miltefosina. El *screening* de resistencia a miltefosina no sugirió por sí mismo muchos mecanismos que pudieran estar implicados en la toxicidad de este ATL. La categorización de los genes presentada en la ilustración 23 C emplea las mismas categorías recogidas

en el *screening* de edelfosina únicamente para facilitar la comparación de ambos compuestos, a falta de criterios más claros y que pudieran aportar más información sobre los procesos necesarios para la toxicidad de miltefosina.

Mecanismos de incorporación de ATLS

Las dos propiedades más importantes de un compuesto con utilidad farmacológica son una alta eficiencia y una buena selectividad. Este es el caso de los ATLS, que a concentraciones capaces de matar células tumorales en modelos *in vivo* respeta a las células sanas, provocando efectos secundarios reducidos. La selectividad de estos compuestos sugiere que hay algún factor diferencial, de entre las características que distinguen ambos tipos celulares, que determina una respuesta diferencial al compuesto (cualitativamente distinta o de magnitud mayor en células tumorales). Por tanto el factor diferencial debe ser parte de, o interactuar con, el mecanismo de acción del compuesto. Con independencia de la utilidad clínica, tal factor diferencial sería una diana molecular selectiva para células tumorales, de ahí el especial interés que tiene estudiar el origen molecular de esta selectividad.

La mayor sensibilidad de un tipo tumoral puede deberse a una propiedad específica o, en un caso más complejo, a un conjunto de ellas. No obstante, hay evidencia de que las células tumorales sensibles a edelfosina muestran una mayor incorporación del compuesto^{17,74}. Se ha demostrado también que cuando células que normalmente no incorporan edelfosina se microinyectan con el compuesto, se sensibilizan al mismo^{74,76}. Por tanto, un factor clave en la selectividad parece ser diferencias de permeabilidad a los compuestos. Sin embargo no hay un modelo de incorporación de ATLS claro en células tumorales: resultados experimentales contradictorios favorecen una incorporación independiente de endocitosis^{85,86} o dependiente de este proceso^{83,84}. Ante este panorama complejo, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio de la incorporación de ATLS podría ayudar a esclarecerlo.

Incorporación de ATLS mediante flipasas de membrana

Las flipasas son translocasas de lípidos que median el movimiento de *flip*, o incorporación desde la cara extracelular de las membranas⁹³. Aunque la especificidad de sustrato de cada una de las flipasas de levadura no se ha definido completamente¹⁰², se sabe que fosfolípidos como la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son transportados por estas proteínas, así como moléculas derivadas: conjugados fluorescentes, lisofosfolípidos y ATLS⁹⁴ (resumidos en la ilustración 5).

De las 5 flipasas presentes en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*¹⁴¹ sólo el mutante del gen *NEO1* no se encontraba disponible en la colección de cepas haploides por ser esencial para la viabilidad¹⁴¹. Los mutantes *drs2Δ*, *dnf1Δ*, *dnf2Δ* y *dnf3Δ* fueron escrutados, resultando resistente a edelfosina y miltefosina *dnf2Δ* mientras que *drs2Δ* sólo lo fue a edelfosina (tablas 1 y 3). Las flipasas son la subunidad catalítica encargada del transporte, y forman parte de un heterodímero junto con una subunidad reguladora de las 3 existentes en levadura^{95,98}. Dos de los genes escrutados (*CDC50* y *CFR1*) no presentaron fenotipo de resistencia, mientras que el mutante *lem3Δ* resultó resistente a ambos compuestos.

Aunque a priori podría pensarse que *DNF2*, *DRS2* y *LEM3* están implicados en el proceso de incorporación de ATLS, la literatura indica que probablemente sea más complejo. Las mutaciones en los genes de flipasa no esenciales no son letales (sólo el cuádruple mutante *drs2Δdnf1Δdnf2Δdnf3Δ* es inviable), lo que indica una función redundante para los cuatro genes¹⁴¹. Esta redundancia debe ser parcial: Lem3p actúa como subunidad de Dnf1/2p^{95,147}, mientras que Cdc50p y Cfr1p se asocian, respectivamente, con Drs2p⁹⁵ y Dnf3p¹⁴⁷. Además sólo Dnf1/2p⁹⁶ y Lem3p⁹⁸ se localizan en la MP. *DNF2* y *DNF1* permiten la incorporación de lisofosfatidilcolina exógena¹⁰⁰. A la luz de estos resultados se ha hipotetizado que la incorporación de aminofosfolípidos exógenos se produce fundamentalmente a través del heterodímero formado por Dnf1p/Dnf2p y Lem3p⁹⁵. La falta de la única subunidad reguladora del heterodímero provocaría un defecto en la incorporación que explicaría la alta resistencia a edelfosina y miltefosina que presentó el mutante *lem3Δ*, lo que concuerda con resultados de otros grupos¹⁰¹. La ausencia de *DNF1* o *DNF2* sería parcialmente compensada por la otra, o incluso por el resto de flipasas, lo que explica que la resistencia de *dnf2Δ* sea más reducida. De hecho la incorporación depende fundamentalmente de esta subunidad⁹⁶, haciendo a *DNF1* menos importante para la incorporación y explicando la falta de una resistencia apreciable en su mutante *dnf1Δ*.

Ni Drs2p ni su subunidad reguladora Cdc50p se localizan en la MP sino en la red *trans*-Golgi (TGN)^{95,96}. El mutante *drs2Δ* fue altamente resistente a edelfosina pero no a miltefosina; por el contrario, *cdc50Δ* no apareció en ninguno de los *screenings*. *drs2Δ* sin embargo presenta defectos morfológicos en el aparato de Golgi (AG) y en la formación de vesículas del TGN¹⁴⁰, y de hecho se ha propuesto que actúa no en la incorporación de compuestos exógenos, sino en la regulación de la composición y asimetría de membranas internas¹⁴². Mediante este proceso regularía la formación de vesículas intracelulares, lo que explicaría los defectos morfológicos en el AG de *drs2Δ* y su letalidad sintética con mutaciones en *ARF1*, un regulador crítico del tráfico vesicular¹⁴⁰. *DNF3* parece ser un caso semejante a *DRS2* y tener un papel en tráfico vesicular¹⁴⁴. Así pues, cabe pensar que *DRS2* tiene un papel distinto a *DNF2/LEM3*: interviene en la toxicidad de edelfosina pero no de miltefosina y posiblemente no module la incorporación de los ATLS, sino algún otro proceso que podría estar relacionado con tráfico de membranas internas.

Se observó la incorporación de edelfosina por microscopía en las cepas silvestre, *dnf2Δ*, *lem3Δ* y *drs2Δ* empleando un análogo de la edelfosina (Et-BDP-ET) conjugado al fluoróforo BODIPY (ilustración 24). El tratamiento y toma de imágenes de las cuatro cepas se realizó en las mismas condiciones. Las células del WT incorporaron el análogo, que se acumuló en estructuras intracelulares definidas (ilustración 24 A). Por el contrario, en *dnf2Δ* y *lem3Δ* no se apreció acumulación intracelular (ilustración 24 B-C), indicativo de una menor incorporación. Aumentando el contraste de las imágenes (paneles inferiores) sí se llegó a apreciar en *dnf2Δ* acumulación, y un patrón de localización semejante al tipo silvestre (en ambos casos parece colocalizar parcialmente con las vacuolas, apreciables en la microscopía de contraste de interferencia diferencial o DIC). En el mutante *lem3Δ* sin embargo no se apreció apenas acumulación. Estos datos corroboraron la hipótesis de que el heterodímero Dnf2p-Lem3p es el responsable de la incorporación de edelfosina en levaduras: la ausencia de *DNF2* provocó una disminución de la acumulación del análogo, pero la acumulación fue muchísimo menor en ausencia de *LEM3*.

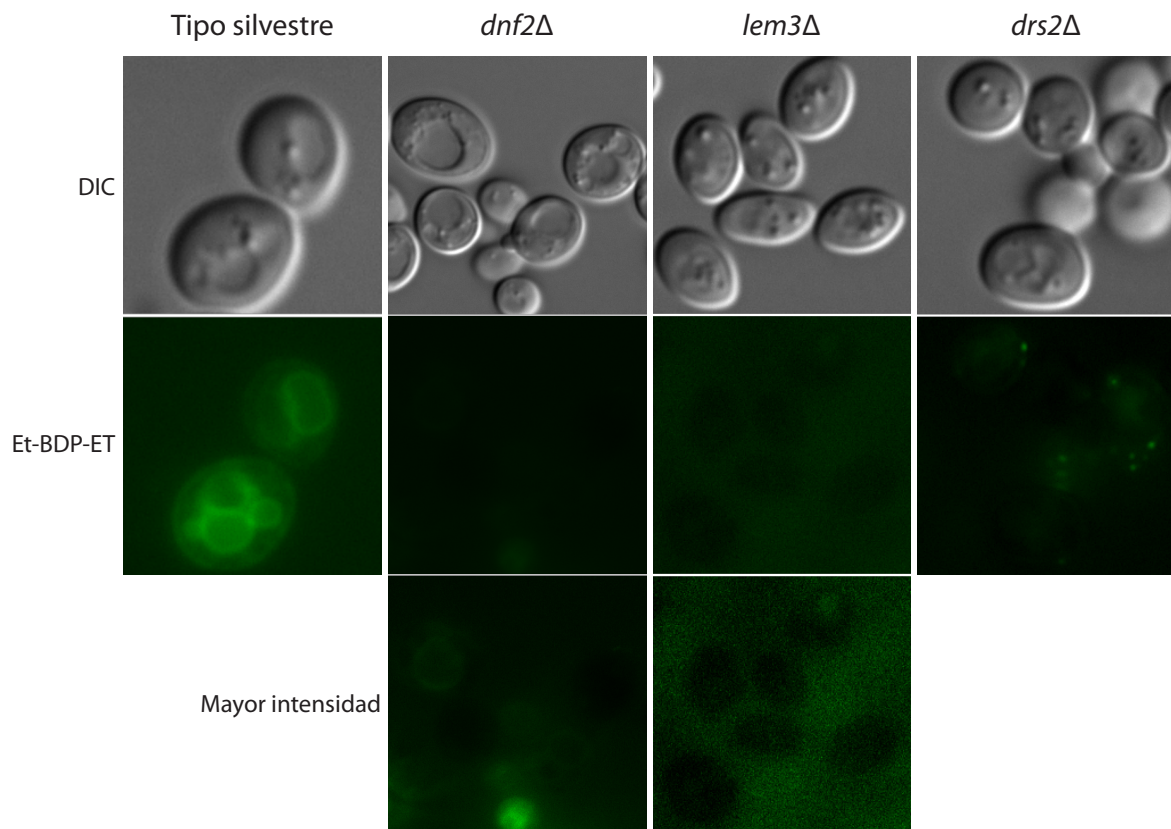


Ilustración 24: incorporación de 5 μ M Et-BDP-ET en mutantes de flipasas. A: tipo silvestre. B: *dnf2Δ*. C: *lem3Δ*. D: *drs2Δ*.

Se observó acumulación intracelular en la cepa *drs2Δ* (ilustración 24 D). Al contrario que las células *dnf2Δ* y *lem3Δ*, que presentaban un citoplasma vacío de fluorescencia indicativo de defectos en la incorporación del análogo (ilustración 24 B-C), las células *drs2Δ* no tienen esa apariencia, lo que indica una mayor incorporación. No obstante, no se puede descartar un defecto menos acusado: al ser el patrón de localización de *drs2Δ* claramente distinto al del WT, no fue posible comparar

directamente la intensidad de fluorescencia. El análogo se acumuló en estructuras punteadas en el citoplasma en este mutante, y las mutaciones en *DRS2* provocan defectos en tráfico vesicular¹⁴². Existe por tanto la posibilidad de que las alteraciones del tráfico vesicular provoquen la localización anómala del análogo observada en *drs2Δ*; sólo de confirmarse podría hipotetizarse una relación entre defectos en el transporte de edelfosina y defectos en el mecanismo.

Otros genes implicados en la incorporación de edelfosina

La aparición en el *screening* de resistencia de genes los genes *LEM3* y *DNF2* de la flipasa de MP, cuya función en la incorporación de ATLs estaba descrita en la literatura, era esperable y confirmó la validez del experimento. Existe la posibilidad de que algún otro de los 262 mutantes deba su resistencia a edelfosina a defectos en la incorporación del compuesto. Se comprobó en nuestro laboratorio la incorporación de edelfosina marcada radiactivamente en los 91 mutantes más resistentes (tabla supl. 1, +++). Cultivos líquidos de los mutantes se incubaron con [³H]-edelfosina y se lavaron para retirar la edelfosina unida inespecíficamente al exterior celular. La radiactividad residual es atribuible al compuesto retenido dentro de las células. Se determinó también la DO final para normalizar las diferencias en radiactividad respecto al número de células presentes en la muestra medida. 3 de los 91 mutantes mostraron una incorporación reducida respecto al control: *lem3Δ*, *agp2Δ* y *doc1Δ* (ilustración 25, barras negras con patrón). Se clonaron dichos genes en el vector centromérico pRS416 y se introdujeron en los respectivos mutantes, observándose en los tres casos una reversión del fenotipo y una incorporación semejante a la del tipo silvestre (ilustración 25, barras blancas con patrón). Esto indicó inequívocamente que la reducción en la incorporación está causada por la delección génica. El gen *AGP2* fue además subclonado en el vector multicopia YEp352 (ilustración 25, barra blanca). La dosis génica del gen *AGP2*, incrementada respecto al WT, provocó el correspondiente incremento en la incorporación de edelfosina.

Localización subcelular de edelfosina

El o los procesos que en última instancia provocan la toxicidad celular se originan en la interacción de los ATLs con determinados componentes celulares. Su identificación es fundamental para dilucidar el mecanismo completo de acción de los compuestos. Para acotar los posibles candidatos se estudió por qué compartimentos celulares se trasladan estos compuestos tras su incorporación celular. Se observó la localización de edelfosina directamente por microscopía, empleando análogos fluorescentes (fórmulas químicas en la ilustración 76). Mediante modificaciones en el residuo octadecilo se han logrado generar los análogos 1-*O*-(15'-fenilpentadeca-*E*-8',10',12',14'-tetraenil)-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (PTE-ET) y 1-*O*-(15'-fenilpentadeca-*E*-10',12',14'-trien-8'-inil)-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (PTRI-ET)^{325,326}. Se ha generado también una segunda generación de análogos con mayor brillo y resistencia a la luz ultravioleta –resultante en imágenes más definidas–

mediante la conjugación de un fluoróforo al grupo alquilo: 1-O-(11'-(6"-etil-1",3",5",7"-tetrametil-4",4"-difluoro-4"-bora-3a",4a"-diazas-indacen-2"-il)undecil)-2-O-metil-*rac*-glicerol-3-fosfolina (Et-BDP-ET) y 1-O-(13'-(1",3",5",7"-tetrametil-4",4"-difluoro-4"-bora-3a",4a"-diazas-indacen-2"-il)tridec-12'-inil)-2-O-metil-*rac*-glicerol-3-fosfolina (Yn-BDP-ET)³²⁶.

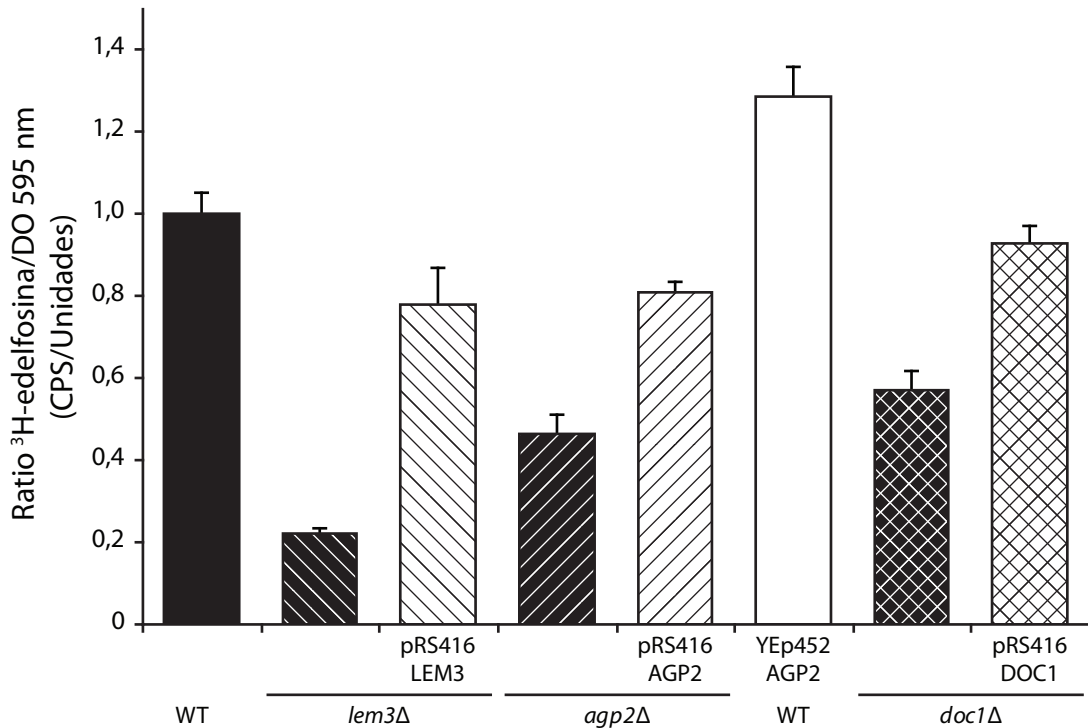


Ilustración 25: mutantes con defectos en la incorporación de [³H]-edelfosina. La cepa empleada fue WT (columnas lisas) o mutante: *lem3Δ* (rayas inclinadas a la izquierda), *agp2Δ* (rayas inclinadas a la derecha) o *doc1Δ* (malla). Plásmidos transformados: ninguno (columnas negras), derivado del plásmido centromérico pRS416 (columnas blancas con patrón) o derivado del plásmido multicopia YEp352 (columna blanca). Se empleó 60 μM de edelfosina con 2·10⁴ cuentas/minuto por pocillo. Media de 3 experimentos ± EEM. Adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2012³¹⁹.

La incubación durante 30 minutos con cualquiera de los cuatro análogos produjo en levadura un patrón de localización semejante: una estructura anular, distinta a las vacuolas que se distinguen claramente por DIC. Los marcadores PTE-ET y PTRI-ET tienen un máximo de emisión de ≈ 465 nm (azul) en medio acuoso, siendo compatibles con un comarceje con otros fluoróforo con emisión en distintos colores. Se emplearon como marcadores subcelulares fusiones de diversas proteínas específicas del compartimento con una proteína fluorescente. La colocalización de PTE-ET y PTRI-ET fue exacta con Elo3p (ilustración 26 A-B), una proteína marcadora del retículo endoplásmico (RE)³²⁷. Los marcadores Et-BDP-ET e Yn-BDP-ET tienen un máximo de emisión de 537 y 553 nm (verde) respectivamente, por lo que son incompatibles con la proteína fluorescente verde (GFP). No obstante se pudo comprobar idéntica localización de ambos análogos indirectamente, dado que la membrana nuclear externa forma el llamado RE nuclear³²⁸. Se expresó un marcador nucleolar (*SIK1*)³²⁹ fusionado a una proteína fluorescente roja (RFP) y se comprobó que dicho marcador aparecía rodeado por los análogos de edelfosina en una estructura anular (ilustración 26 C-D). Como alternativa al marcaje

con Elo3GFP se empleó una fusión de GFP con otro marcador del RE, *SEC63*³³⁰, observándose la misma acumulación en el RE de PTE-ET (ilustración 26 E). Por tanto, la edelfosina se transporta a través de la membrana plasmática y se acumula en el retículo endoplásmico.

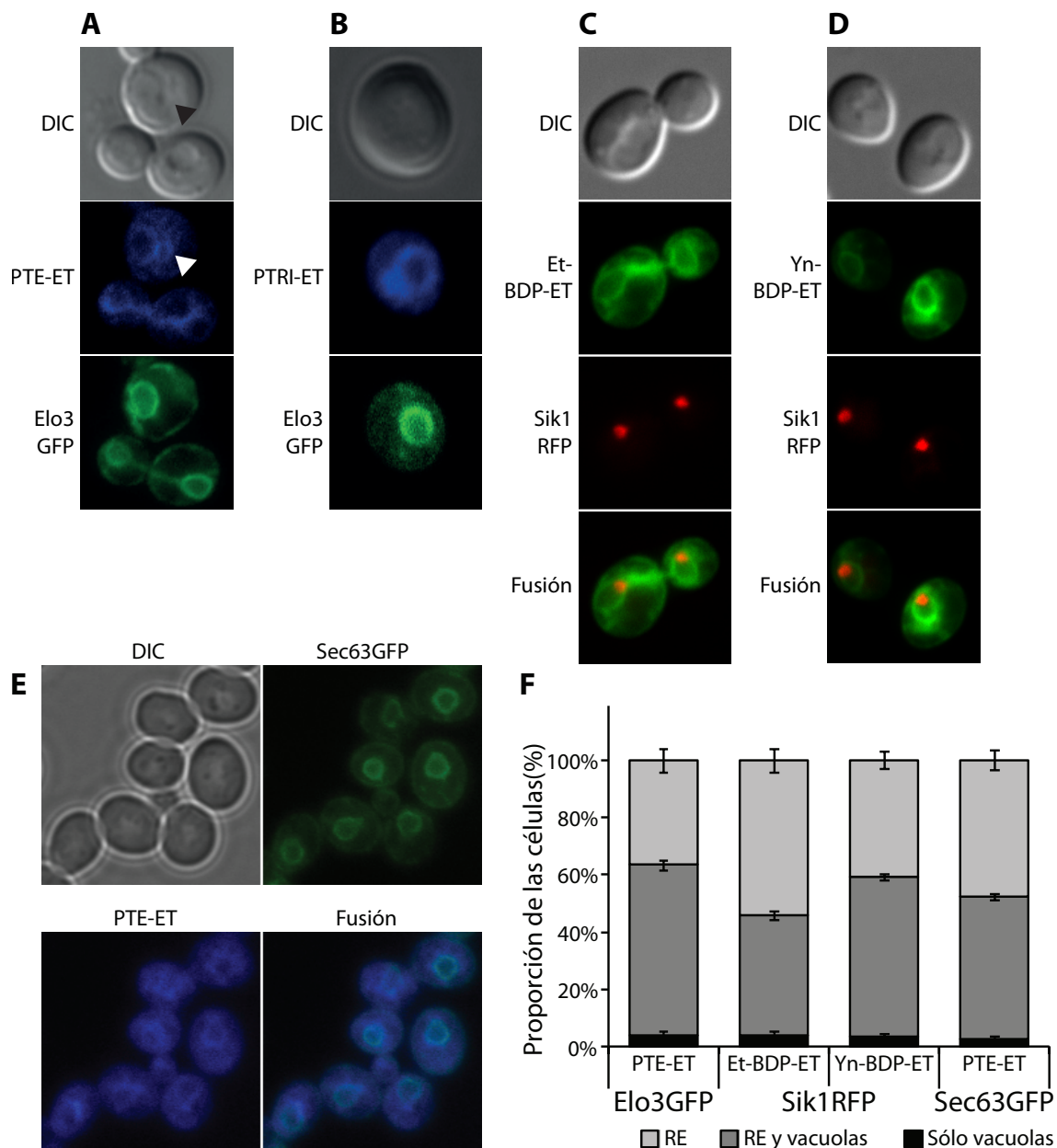


Ilustración 26: localización subcelular de los análogos fluorescentes de edelfosina. **A:** 20 μ M PTE-ET. **B:** 20 μ M PTRI-ET. **C:** 5 μ M Et-BDP-ET. **D:** 5 μ M Yn-BDP-ET. **E:** PTE-ET. Cada una de las imágenes de un análogo fluorescente se muestra junto a las correspondientes imágenes de DIC, de una proteína fluorescente fusionada a un marcador subcelular (Elo3GFP, Sik1RFP, Sec63GFP) y de la fusión entre la imagen del análogo y la del marcador subcelular. \blacktriangleright : localización vacuolar del PTE-ET. **F:** Cuantificación de los fenotipos indicados en imágenes de microscopía de fluorescencia (a partir de 150-300 células). Adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2013³¹⁹.

Se observó además acumulación de los análogos de edelfosina en estructuras subcelulares adicionales, que pudieron identificarse en la microscopía DIC como vacuolas (ilustración 26 A, \blacktriangleright). No se observó ningún patrón en la aparición de cualquiera de los fenotipos (acumulación en el

RE y vacuolar), y en los tratamientos estudiados se identificaron mezclas de células con uno, otro o simultáneamente ambos. En éste último caso aparecieron tinciones subcelulares con forma de 8 o trébol, en función del número de vacuolas presente.

Se estudió la localización de edelfosina preferentemente con los análogos PTE-ET y PTRI-ET, ya que su toxicidad se había demostrado semejante a la edelfosina^{44,326}, y puesto que eran semejantes al único análogo de la miltefosina del que se disponía (PTE-MT). Las modificaciones realizadas en la estructura de estos análogos respecto a la edelfosina son limitadas; por el contrario, los análogos de segunda generación deben su fluorescencia a la presencia de un fluoróforo voluminoso, que puede afectar a la lipofilidad de la molécula³³¹ o sufrir cambios en la fluorescencia en función de la concentración local³³². Sin embargo los análogos de primera generación resultaron muy poco fotoestables y la intensidad de su fluorescencia muy reducida. Como resultado las imágenes generalmente fueron poco definidas y con bajo contraste, y la comparación detallada entre dos subestructuras en una misma célula, más allá de identificar su forma y localización, resultó imposible. Un factor más que pudo haber influido en la calidad de las imágenes recogidas fue la fragmentación vacuolar que se observó en tratamientos con ATLS, que se comentará en otra sección. A pesar de estas dificultades se pudo cuantificar la localización de análogos de edelfosina en el RE o en la vacuola en un número significativo de células, en varias imágenes independientes de microscopía. Se emplearon los marcadores descritos previamente (Elo3GFP o Sec63GFP para PTE-ET, Sik1RFP para Et-BDP-ET e Yn-BDP-ET). La práctica totalidad de las células presentaron tinción en el RE, sola o en combinación con tinción vacuolar (ilustración 26 F). La proporción de células con al menos uno de estos dos fenotipos no fue significativamente distinta en ninguno de los experimentos (P-valor > 0,38 en un test Z de comparación de proporciones).

Implicación de la endocitosis en la incorporación, localización y mecanismo citotóxico de edelfosina

La membrana plasmática es la interfaz entre medio extracelular e intracelular, y como tal regula la interacción entre ambos compartimentos. Es una barrera impermeable, excepto en procesos específicos y regulables, como comunicación o incorporación de nutrientes. La endocitosis puede intervenir directamente en estos dos procesos. Participa además en la regulación de la disponibilidad y composición de la MP³³³, mediante la retirada de material de la misma. La aparición de mutantes de endocitosis en el *screening* de resistencia a edelfosina señaló un papel crítico de este proceso en el mecanismo de toxicidad del compuesto.

El análisis bioinformático indicó un enriquecimiento significativo en genes implicados en endocitosis; no obstante, algunos de los genes así identificados tienen también funciones más contrastadas en otros mecanismos de tráfico intracelular, y por tanto se tratarán en otras secciones

del presente trabajo. Se han asociado en la literatura los genes *MYO5*, *END3* y *LDB17* con endocitosis³³⁴⁻³³⁶. *VPS1* codifica una GTPasa semejante a la dinamina que interviene en formación de vesículas en diversas estructuras membranosas, aunque su implicación en endocitosis parece clara³³⁷. *RHO4* codifica una GTPasa de la familia Rho que regula el citoesqueleto de actina, interaccionando específicamente con proteínas implicadas en endocitosis como Las17p, Vrp1p, Rvs161p y Rvs167p³³⁸. En un trabajo anterior del laboratorio se observó que una mutación condicional en el gen *END4* (*SLA2*), implicado en endocitosis³³⁵, cuando se combinaba con una mutación en el procesamiento de enzimas vacuolares *pep4Δ*, confería resistencia a edelfosina³⁰⁵; no obstante el mutante *end4Δ* no presentó un fenotipo de resistencia a edelfosina suficientemente pronunciado como para ser detectado en el *screening*.

La resistencia a edelfosina mostrada por estos mutantes indicó que alguno de los pasos del proceso de toxicidad interacciona con los mecanismos de endocitosis. Una de las hipótesis planteadas fue que la internalización de la edelfosina que se observa tras su incorporación –al RE, a la vacuola o a ambos compartimentos– requiriera endocitosis, y que esta internalización a su vez podría ser un paso del mecanismo de toxicidad. Se decidió observar si tal internalización dependía de la endocitosis empleando la cepa *end4pep4Δ*, un doble mutante con defectos en endocitosis y resistente a edelfosina que ya había sido estudiado en un trabajo previo del laboratorio³⁰⁵. En paralelo se estudió la internalización en la cepa silvestre preincubada a 0 °C, una temperatura a la que se esperaría una ralentización de la endocitosis³³⁹. Se monitorizó la internalización utilizando el análogo fluorescente PTE-ET. Simultáneamente se observó la incorporación a la célula de compuestos fluorescentes que entran por endocitosis y son transportados hasta acumularse en la vacuola. *Lucifer Yellow* (LY) es un marcador de fase fluida que es soluble en el medio extracelular, es retenido en el interior de los endosomas y se acumula finalmente en el lumen vacuolar³³⁹. El marcador lipofílico FM 4-64 tiñe las membranas de esos mismos compartimentos³⁴⁰.

Las células silvestres crecidas a 30 °C (ilustración 27 A) presentaron acumulación intracelular de ambos marcadores, indicativa de una endocitosis funcional. Hubo colocalización de los marcadores vacuolares FM4-64 y LY y se apreció también la acumulación de PTE-ET en la estructura anular anexa a las vacuolas, que anteriormente había sido identificada como el RE. En los dos experimentos planteados para observar la falta de endocitosis (*end4pep4Δ* a la temperatura restrictiva de la mutación *end4*, 30 °C, y WT a 0 °C; ilustración 27, paneles B y C respectivamente) se trataron las células con los dos marcadores en condiciones idénticas. Las flechas indican las vacuolas, carentes de tinción y localizadas por tanto en el DIC (→). La falta de incorporación visible es indicativa de que en ambos experimentos la endocitosis se encontraba efectivamente inhibida. Sin embargo, fue posible detectar acumulación de PTE-ET en estructuras semejantes a las observadas en células silvestres a 30 °C. Por tanto cabe concluir que la endocitosis no participa en la incorporación al RE de la edelfosina. El mutante *end4pep4Δ*, con una internalización normal del fármaco, es sin embargo resistente a

edelfosina³⁰⁵, lo que demuestra además que la mera incorporación del fármaco o su acumulación en el RE no son, por sí mismas, suficientes para provocar la toxicidad celular.

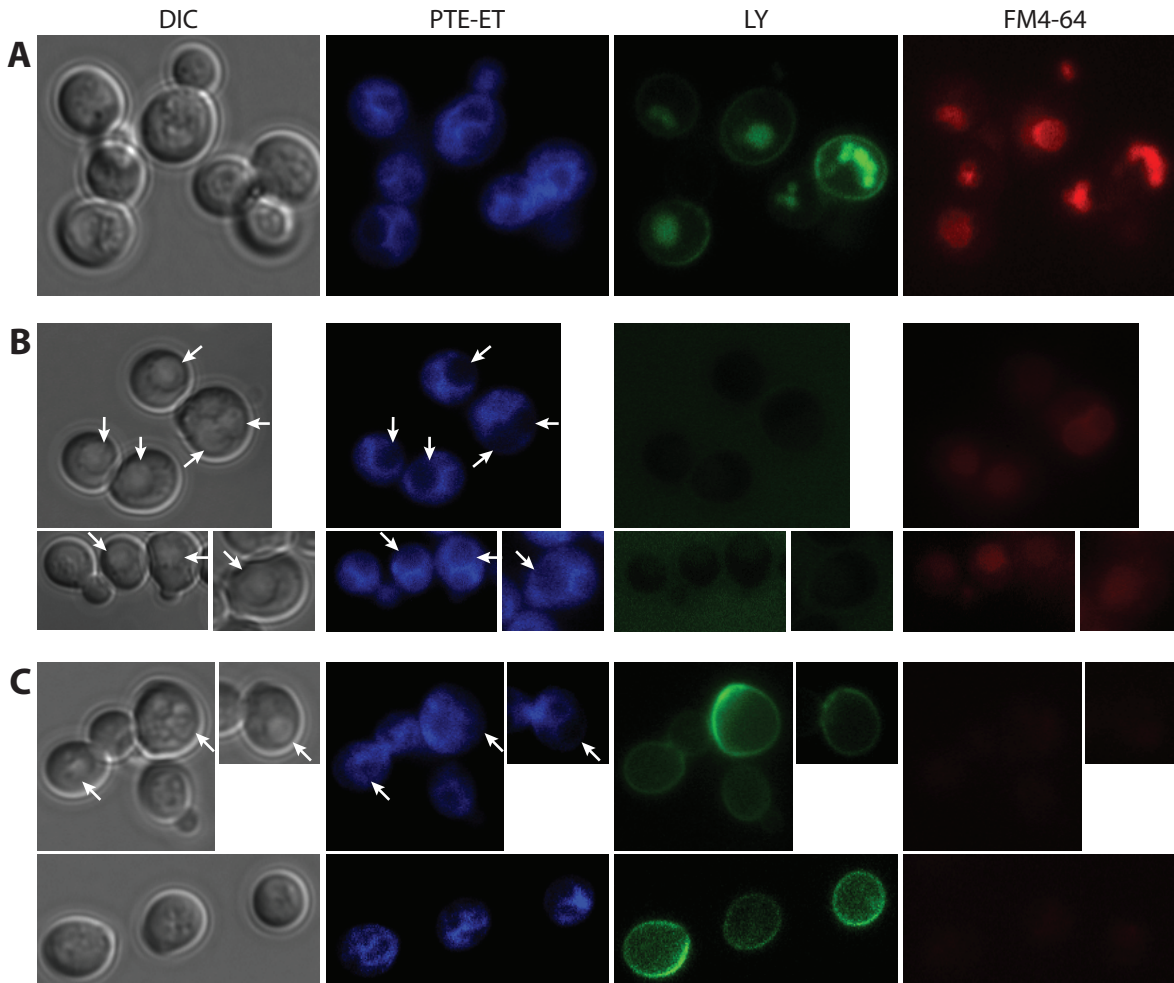


Ilustración 27: internalización de 20 μM PTE-ET y de marcadores de endocitosis. A: WT, 30 °C. B: *end4pep4Δ*, 30 °C. C: WT, 0 °C. →: vacuola.

Implicación del transporte retrógrado en la incorporación, localización y mecanismo citotóxico de edelfosina

El *screening* de mutantes resistentes a edelfosina permitió identificar un segundo proceso con un posible papel en la internalización del compuesto: el transporte retrógrado mediado por vesículas. Los genes concretos asociados con dicho proceso están descritos con más detalle en una sección posterior. Se denomina transporte vesicular anterógrado al que en las células transcurre del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y de aquí a sus orgánulos diana: el endosoma, la vacuola o la membrana plasmática por la vía secretora. Paralelamente existe un transporte retrógrado en sentido contrario que permite el reciclaje de membranas y la regresión de proteínas a sus compartimentos subcelulares originarios.

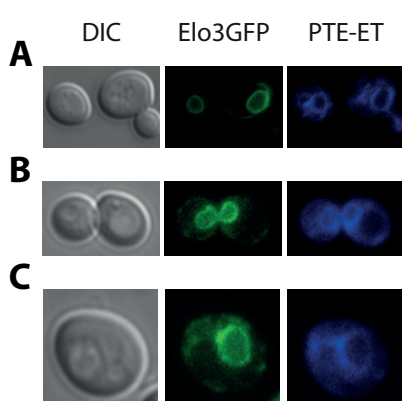


Ilustración 28: internalización de 20 μ M PTE-ET en mutantes del transporte retrógrado. **A:** WT. **B:** *vps29* Δ . **C:** *vps35* Δ . Adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2013³¹⁹.

Se planteó la hipótesis de que la resistencia observada en los mutantes del transporte retrógrado se debiera a una internalización defectuosa del fármaco al RE. La localización de PTE-ET se estudió en dos mutantes, *vps29* Δ y *vps35* Δ , y se empleó como marcador de RE la proteína de fusión Elo3GFP, de la manera previamente indicada. En ambos casos fue posible observar una colocalización del análogo de edelfosina con el marcador del RE idéntica a la observada en el tipo silvestre (ilustración 28). Se concluyó por tanto que los defectos en el transporte retrógrado no provocan diferencias apreciables en la internalización de edelfosina.

En los experimentos descritos en la presente sección no se identificó mutante alguno con un bloqueo en la internalización de edelfosina al RE. No pudo establecerse de manera conclusiva un posible mecanismo por el que este proceso module la toxicidad celular.

Localización subcelular de miltefosina

Al igual que la edelfosina, el ATL miltefosina fue modificado químicamente en su radical hexadecilo para sintetizar el análogo fluorescente 13-feniltrideca-*E*-6,8,10,12-tetraenilfosfocolina (PTE-MT, ilustración 76 B). Se comprobó su localización en células silvestres con la proteína de fusión Elo3GFP como marcador del RE. La localización del análogo de miltefosina varió con el tiempo. A tiempos cortos de tratamiento (5 minutos) se acumuló en una banda continua en la periferia celular (ilustración 29 A). En comparación con el PTE-ET, la fluorescencia del análogo de miltefosina fue más

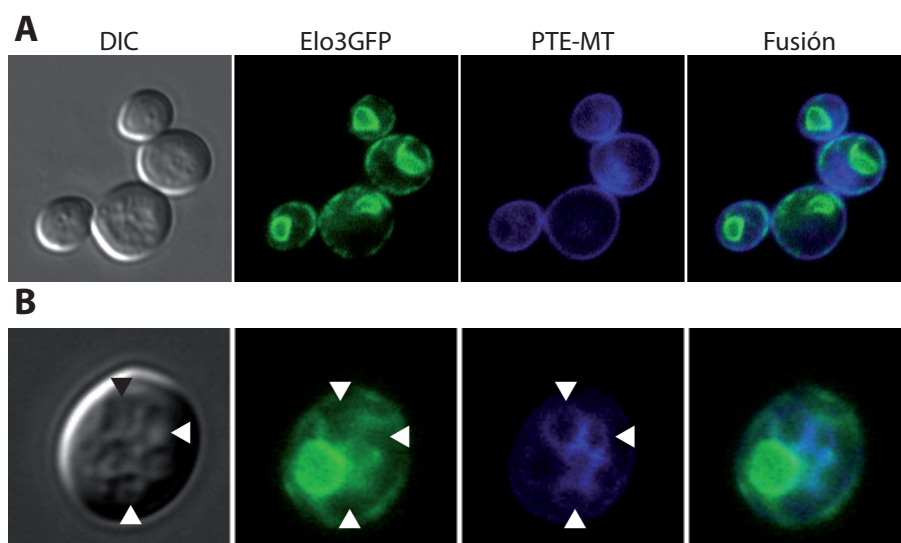


Ilustración 29: localización subcelular del análogo fluorescente de la miltefosina PTE-MT (20 μ M). **A:** tratamiento de 5 minutos. **B:** tratamiento de 30 minutos. \blacktriangleright : vacuola.

definida y su localización más clara. Las imágenes sugieren que PTE-MT se acumula rápidamente en la membrana plasmática. La mayor claridad de la fluorescencia podría deberse a un transporte reducido desde la MP que permitiría, a tiempos cortos, una mayor concentración local.

En concordancia con dicha hipótesis, tras 30 minutos –un tiempo en el que la internalización del análogo de edelfosina era clara– no se observa colocalización de PTE-MT con el marcador del retículo endoplásmico Elo3GFP (ilustración 29 B). Se puede concluir que la miltefosina no es internalizada al RE por el mecanismo independiente de endocitosis que se observó en edelfosina. Sí hay acumulación de PTE-MT en la membrana de las vacuolas, visibles en DIC y que no colocalizan con la señal de Elo3GFP (ilustración 29 B, ►). Dicha localización también se observó en los análogos de edelfosina, y en la sección anterior se postuló que se originaba en el compuesto insertado en la MP, tras sufrir endocitosis y transporte vesicular. Los resultados de PTE-MT sugieren que la miltefosina también es transportada a la vacuola por este mismo proceso.

Disponibilidad de ergosterol y toxicidad por ATLS

La toxicidad de los ATLS en distintos sistemas depende de la disponibilidad celular de esteroides^{75,114,115}. Esteroides y ATLS tienen una elevada afinidad debido a la geometría complementaria de sus moléculas, tendiendo a agruparse en membranas lipídicas^{22,341}. La presencia de esteroides en la membrana plasmática permitiría por tanto que los ATLS se asociaran a la misma y su posterior incorporación a la célula.

La toxicidad de ATLS no se había demostrado dependiente de esteroides en *S. cerevisiae* previamente. El *screening* de resistencia no identificó mutantes resistentes a ATLS. Esto cabe explicarse por la ausencia de dichos mutantes en la colección empleada: la ruta biosintética del ergosterol en levadura está compuesta por 12 genes, en su mayoría esenciales. Se empleó por tanto una estrategia alternativa basada en la inhibición farmacológica de la síntesis de ergosterol. Las células fueron tratadas con lovastatina, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa³⁴² (codificada por el par de genes *HMG1/2*), que cataliza el paso limitante de la ruta biosintética³⁴³. Las células tratadas sólo con lovastatina crecieron de manera apreciable, aunque más lentamente que las células en medio sin fármaco (ilustración 30 A-B). Esto es comprensible al ser los esteroides esenciales para el crecimiento celular: el doble mutante *hmg1Δhmg2Δ* es auxótrofo para mevalonato³⁴⁴.

Aunque la concentración de lovastatina empleada inhibió la síntesis de esteroides lo suficiente para retardar el crecimiento, permitió el suficiente como para emplear las células sólo tratadas con lovastatina como un control negativo de toxicidad. Por el contrario, células tratadas únicamente con las concentraciones indicadas de edelfosina, miltefosina y perifosina inhibieron completamente el crecimiento celular (ilustración 30 A). El crecimiento de las células cotratadas además con lovastatina fue esencialmente idéntico al de su control negativo (ilustración 30 B). La menor inhibición observada

de la toxicidad por perifosina no puede achacarse necesariamente a una afinidad reducida de este compuesto por los esteroides, ya que las concentraciones de los ATLS empleadas fueron distintas. El experimento demostró que, al igual que en otros sistemas biológicos, la disponibilidad de esteroides es un requisito imprescindible para la efectividad de los tres ATLS estudiados.

Aunque se ha descrito previamente que el tratamiento con lovastatina disminuye la concentración de ergosterol en las membranas biológicas³⁴², no hay evidencia de que la disminución del ergosterol de la MP sea la responsable de la toxicidad disminuida de los ATLS. El preinóculo celular fue además tratado toda la noche con lovastatina, y la inhibición prolongada de la biosíntesis de esteroides puede tener múltiples efectos en el metabolismo celular. Una estrategia alternativa sin dichos inconvenientes fue la administración exógena de un agente complejante del ergosterol. La metil- β -ciclodextrina (M β CD) es un oligosacárido cíclico de elevado peso molecular, impermeable a la membrana plasmática y capaz de secuestrar los esteroides de la misma^{345,346}. El mero tratamiento con M β CD no afectó el crecimiento celular pero evitó completamente la toxicidad de los tres ATLS empleados (ilustración 30 C), reafirmando la hipótesis de que los ATLS requieren de esteroides en la MP para ser efectivos.

Si la incorporación celular de ATLS depende de su alta afinidad por los esteroides de la MP, una alternativa al secuestro de los mismos sería añadir esteroides exógenos que compitieran con la interacción de los ATLS con la MP. Las células de levadura presentan exclusión aeróbica de ergosterol: el ergosterol exógeno no se incorpora a las células de levadura excepto en condiciones de anaerobiosis, que provocan la expresión de los transportadores específicos²⁶⁷. Por tanto la suplementación del medio con ergosterol no afectaría a la fisiología de las células, pero sí a los ATLS presentes en el medio que interaccionen con el ergosterol. Cuando las células fueron transferidas a medio suplementado con ergosterol, el esteroide más abundante en las membranas de *S. cerevisiae*³⁴⁷, su crecimiento no se vio alterado; sin embargo, la efectividad de los ATLS empleados disminuyó (ilustración 30 D). El crecimiento de las células tratadas con ATLS fue ligeramente menor que el del control negativo de toxicidad, lo que podría ser debido a un bloqueo incompleto por parte del ergosterol exógeno de la interacción de los ATLS con los esteroides celulares.

Los tres experimentos anteriores demuestran que los ATLS empleados interaccionan con el ergosterol, el esteroide mayoritario de las membranas de *S. cerevisiae*, y que la toxicidad en este organismo de los ATLS requiere la presencia de esteroides en la membrana plasmática. Esto sugiere que el ergosterol en la MP media la interacción e incorporación de ATLS; tal hipótesis sin embargo no se ha demostrado inequívocamente. El secuestro o inhibición de la síntesis de esteroides tienen efectos conocidos en otros componentes celulares como los microdominios de membrana *lipid raft*, que están implicados en la toxicidad de los ATLS de maneras alternativas (ver sección *Transporte*

endosomal y toxicidad de ATLS). Por tanto no es posible distinguir el nivel en que la modulación de los esteroides celulares realizada con lovastatina y M β CD afecta al mecanismo de toxicidad de los ATLS.

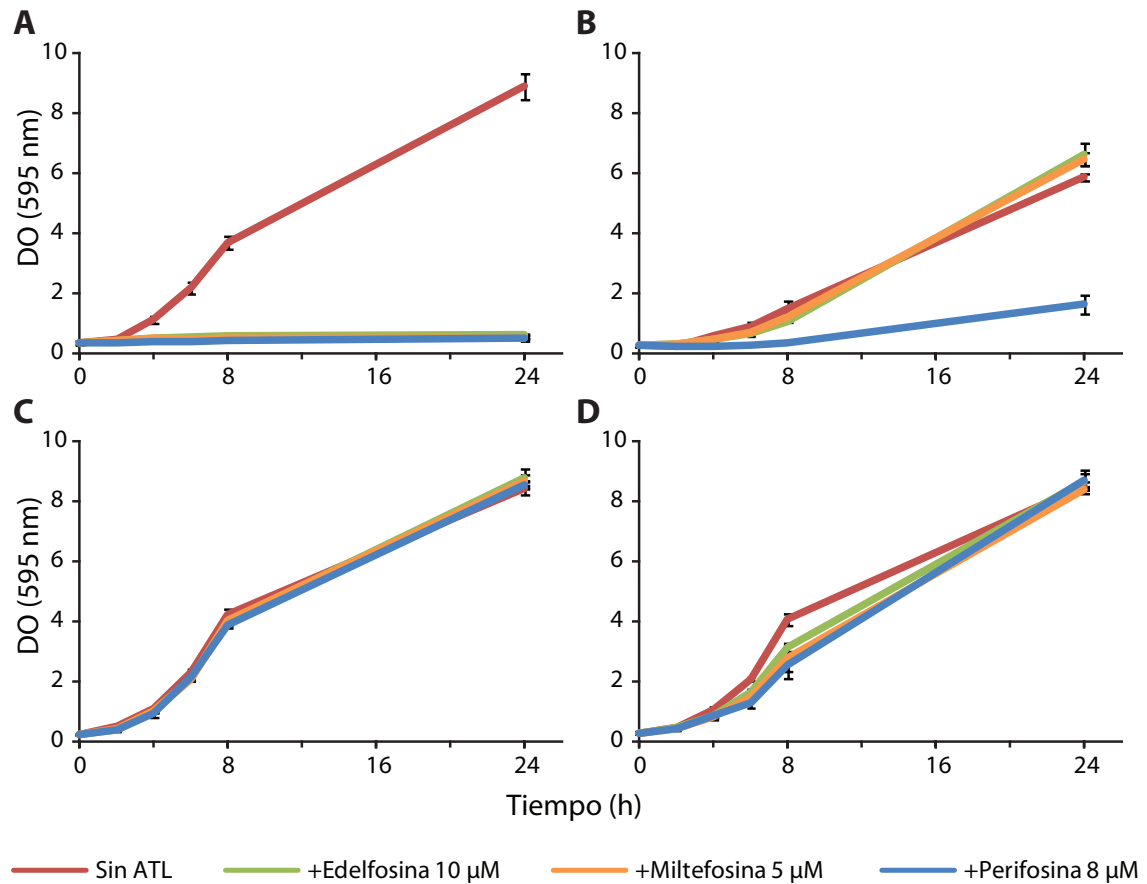


Ilustración 30: modulación del ergosterol celular y toxicidad de ATLS. **A:** Crecimiento de células tratadas con ATLS. **B:** Crecimiento de células tratadas con lovastatina y ATLS. **C:** Crecimiento de células tratadas con ATLS en presencia de M β CD. **D:** Crecimiento de células tratadas con ATLS en medio suplementado con ergosterol.

Transporte endosomal y toxicidad de ATLS

Genes endosomales implicados en toxicidad de edelfosina

El análisis bioinformático del *screening* de resistencia constató que el tráfico vesicular organizado alrededor del endosoma jugaba un papel importante en la toxicidad de edelfosina. El tráfico vesicular se organiza en *Saccharomyces cerevisiae* alrededor del compartimento subcelular que recibe las vesículas endocíticas, el endosoma temprano (EE). Este orgánulo tubulovesicular presenta regiones específicas, desde los que se distribuye el tráfico a otros compartimentos subcelulares: reciclaje a la membrana plasmática o el *trans*-Golgi (TGN), formación de vesículas intraluminales o maduración

a un endosoma tardío (LE), degradativo y con capacidad de fusionarse con la vacuola para completar la degradación de su carga²¹¹. Estas rutas de transporte dependen de mecanismos específicos; sin embargo, mutantes de estos distintos mecanismos presentaron un efecto común, resistencia a edelfosina.

Mecanismos de transporte retrógrado

El transporte retrógrado actúa en sentido contrario a la vía secretora, permitiendo el reciclaje de membranas y de proteínas, y discurre desde el endosoma hacia el compartimento previo, el *trans*-Golgi. Las proteínas que sufren transporte retrógrado aparecen en el endosoma a pesar de ser en el TGN (o incluso durante el transporte TGN–endosoma) donde actúan. Aún así no pierden su funcionalidad en el endosoma: su recuperación y reciclaje permite reaprovecharlas y evita una posible progresión a la vacuola que causaría su degradación irreversible.

El retrómero es un complejo proteico que actúa en las membranas del endosoma, donde interacciona con proteínas que serán recicladas al TGN. Sus funciones son la interacción con estas proteínas, la concentración de las mismas en regiones tubulares y la formación de vesículas de reciclaje que sufrirán transporte retrógrado. Se identificaron en el screening mutantes resistentes en 4 de los 5 componentes del retrómero: *VPS17*, *VPS26/PEP8*, *VPS29* y *VPS35*. La GTPasa de la familia Ras *YPT7*, que también apareció en el *screening*, participa en la localización endosomal del retrómero. Esta proteína sin embargo tiene también funciones en la maduración del LE, un proceso en el que intervienen otros genes identificados.

Las mutaciones del retrómero impiden el correcto reciclaje de sus sustratos, provocando así su degradación y pérdida de función. Se esperaría por tanto que las mutaciones en estos sustratos, tanto como las del retrómero, presentaran el mismo fenotipo de resistencia a edelfosina. La delección de las proteasas *KEX1* y *KEX2* provocó resistencia a edelfosina, aunque no se identificaron en el *screening* *STE13* o *VPS10*. La ausencia de este último gen (el receptor de hidrolasas vacuolares³⁴⁸) sin embargo concuerda con resultados previos en los que la delección de la hidrolasa *PEP4*, por sí sola, no dotaba a la célula de suficiente resistencia frente a edelfosina (aunque sí en combinación con un mutante de endocitosis *end4*)³⁰⁵. Es interesante señalar que el mutante del gen recientemente identificado *ERE1* (*YBR246W*) es resistente a edelfosina. Se ha sugerido un papel en la selección de sustratos del retrómero para *ERE1*, ya que es necesario para la función del retrómero únicamente sobre determinados sustratos, no interviniendo por ejemplo en el reciclaje de *Vps10p*³⁴⁹.

Existen mecanismos en la misma ruta de reciclaje endosoma–TGN alternativos al retrómero. Los complejos que el producto del gen *SNX4* forma con *SNX41* o *SNX42* participan en una de estas rutas³⁵⁰, y mutantes de *SNX4* y *SNX42* fueron también identificados. Aunque es un mecanismo distinto al retrómero, se han descrito tanto sustratos exclusivos de este complejo³⁵⁰ como comunes con el

retrómero³⁴⁹. Estos resultados, por tanto, no sugieren un sustrato de transporte retrógrado que sea un candidato claro a participar en la toxicidad de edelfosina. Otros mutantes resistentes a edelfosina con una posible implicación en esta vía transporte retrógrado son *RCY1* y *DRS2*. Ambos genes se han asociado a la misma vía de reciclaje desde el endosoma temprano al TGN (la de la proteína Snc1)^{350,351}. Hay que mencionar también a la flipasa *DRS2*, cuyo mutante resistente a edelfosina ya se comentó en relación a la incorporación celular de ATLS. *DRS2* produce cambios en la composición lipídica de membranas internas, facilitando procesos de transporte asociados a dichas membranas. Drs2p se localiza y actúa tras el AG en la vía secretora¹⁴⁰ y se han asociado defectos en la función de *DRS2* a un transporte endosoma-TGN reducido^{147,196}. *DRS2* actúa en el mismo proceso de transporte que *RCY1* al menos¹⁴⁷. Sin embargo, *DRS2* también regula otros procesos de transporte vesicular en el TGN que podrían ser el origen de la resistencia del mutante.

Un paso posterior en el transporte retrógrado a la formación de vesículas es la fusión de las mismas con el órgano receptor, el TGN. El complejo GARP del TGN se encarga del acoplamiento de vesículas en esta vía de transporte³⁵² y la delección de su componente *VPS52* provocó resistencia a la edelfosina. En las vacuolas es el complejo *TLG1* quien interacciona con el GARP³⁵³. En el *screening* el único miembro del complejo identificado fue *TLG2*, que sin embargo es el único componente no esencial³⁵⁴ y, por tanto, presente en la colección de mutantes. Además se identificó la palmitoiltransferasa *SWF1*, que regula indirectamente el complejo al ser necesaria para la estabilidad de *TLG1*³⁵⁵.

El conjunto de estos genes indica que el transporte retrógrado del endosoma al TGN es crítico para la toxicidad de edelfosina. Aunque la edelfosina podría ser transportada por esta ruta, se han descrito hasta el momento como rutas de transporte exclusivamente de proteínas. Es más probable que sean las condiciones celulares que permiten la toxicidad de la edelfosina las que requieran del transporte retrógrado. Un componente de su mecanismo de acción podría actuar en el TGN y requerir de este reciclaje eficaz para evitar la degradación en la vacuola.

Mecanismos de formación de cuerpos multivesiculares

Un segundo grupo de genes, identificados en el *screening* como esenciales para la toxicidad de la edelfosina, comprende subunidades de los complejos multiproteicos del endosoma ESCRT. Estos complejos reconocen señales específicas en sustratos presentes en la membrana del endosoma y promueven la formación en el orgánulo de un cuerpo multivesicular (MVB). La degradación de los sustratos reconocidos es facilitada por el MVB durante la maduración endosomal.

Se han descrito 18 miembros del ESCRT²²³ (ver tabla 1), de los que se identificaron 8 en el *screening*: *VPS27* (complejo 0); *VPS23/STP22*, *VPS37/SRN2* (complejo I); *DID4/VPS2*, *VPS24*, *VPS20* (complejo III); y varias proteínas asociadas al complejo III, (*DID2*, *VPS4*). La elevada representación en el *screening* de genes del ESCRT sugirió un papel relevante de la degradación endosomal de alguna

proteína en la toxicidad de edelfosina. Además se identificaron mutantes de los genes *UBP2*, *DOA4* y *BRO1*. *BRO1* facilita el reclutamiento al endosoma de *DOA4*, una ubiquitin-peptidasa. *UBP2* es otra ubiquitin-peptidasa que posiblemente interviene en el ESCRT³⁵⁶. La monoubiquitinación de proteínas es la señal más frecuentemente reconocida por el ESCRT²²⁴, y la función de *DOA4* es reciclar la ubiquitina antes de incluir las proteínas a degradar en las vesículas del MVB. La ubiquitinación podría ser el requisito para el reconocimiento y degradación de esa hipotética proteína implicada en la toxicidad por edelfosina.

Otros mecanismos de tráfico endosomal

El fenotipo de resistencia a edelfosina se observó también en mutantes de un tercer grupo de genes implicados en la maduración del endosoma. Se identificaron mutantes resistentes a edelfosina en los genes de las subunidades propias del CORVET *VPS3* (el GEF de la proteína Rab propia del endosoma temprano *VPS21*²³⁹) y *VPS8*, así como del otro GEF del EE, *VPS9*. Aunque el mutante *vps21* no fue resistente, hay que señalar la presencia en *S. cerevisiae* de tres homólogos del gen con posible redundancia funcional²³⁰. Estos genes están implicados en el mantenimiento del EE y su progresión al LE. Parece por tanto que afectar a la maduración del endosoma en un estadio temprano protege a la célula de la toxicidad por edelfosina. De acuerdo con esta hipótesis, la delección de *CCZ1* también generó resistencia al compuesto. El complejo Mon1p/Ccz1p media el intercambio Vps21p/Ypt7p que se da en los LEs. *YPT7* modula la maduración del endosoma tardío, y su mutante también presentó resistencia a edelfosina (sin embargo Ypt7p tiene múltiples funciones, como las ya comentadas relacionadas con el retrómero). No aparecieron por el contrario en el *screening* subunidades del HOPS, un complejo propio del LE homólogo al CORVET e implicado en fusión de LEs y con la vacuola.

La identificación de estos genes refuerza la hipótesis de que la maduración endosomal, necesaria para la degradación vía endosoma/vacuola, es necesaria para la toxicidad de edelfosina. Las fases tempranas de la maduración, que conducen al endosoma tardío, son críticas para la toxicidad, así como los complejos del ESCRT y del retrómero, que participan en el mismo orgánulo. El endosoma tardío es por tanto el punto en esta maduración crítico para la toxicidad por edelfosina.

Internalización de la H⁺-ATPasa Pma1

Los experimentos realizados y el análisis funcional de los genes identificados en el *screening* de resistencia sugirieron que el proceso de toxicidad por edelfosina implicaba: endocitosis, aunque no en la incorporación del fármaco; transporte retrógrado endosoma-TGN; complejos ESCRT, necesarios para la degradación endosomal de proteínas; y maduración del endosoma. En base a estas observaciones se planteó la hipótesis de que la edelfosina actúa provocando la degradación endosomal de una (o más) proteína de membrana. La endocitosis sería la vía de entrada de esta proteína desde la

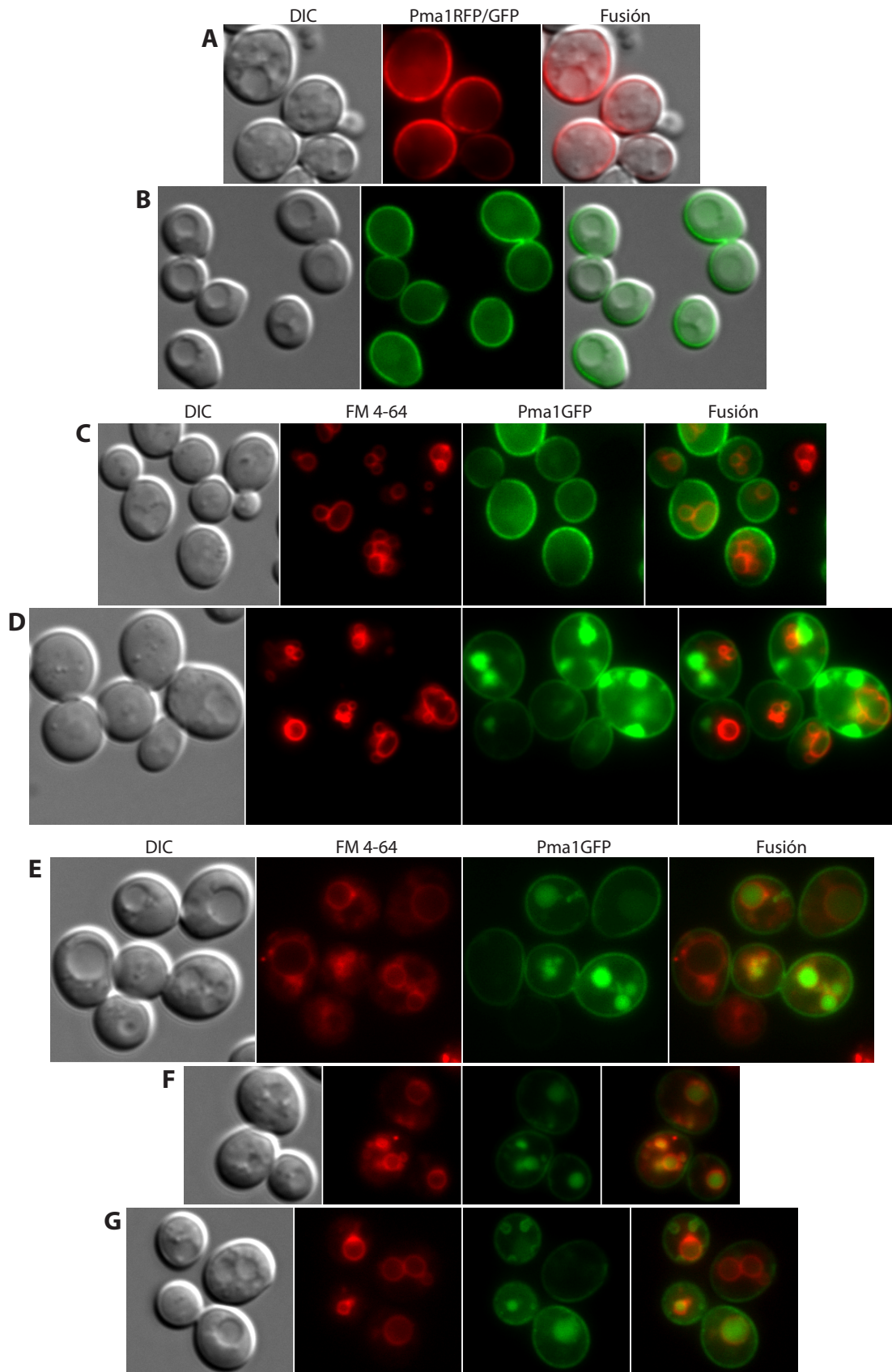


Ilustración 31: localización celular de Pma1. A: localización en la MP en células sin tratar utilizando Pma1RFP. B: misma localización utilizando Pma1GFP/BY4741. C: cuerpos de naturaleza desconocida (agregados de la proteína marcada). D: Pma1GFP y marcador vacuolar FM 4-64 en WT. Localización vacuolar de Pma1GFP: mismo experimento realizado tras tratamientos con edelfosina (E), miltefosina (F) y perifosina (G) 10 μ M.

MP al endosoma. Allí los otros tres procesos permitirían la función digestiva del endosoma y se produciría la degradación de la proteína.

PMA1 codifica una H⁺-ATPasa de la membrana plasmática, esencial para la célula²⁰² y crítica para varios procesos celulares, como mantenimiento del pH citosólico, generación del potencial de membrana y transporte de nutrientes. En un trabajo previo del laboratorio se había observado la internalización a la vacuola de esta proteína y su degradación proteolítica en respuesta al tratamiento con edelfosina³⁰⁵. Se decidió por tanto estudiar Pma1p durante el tratamiento con ATLS.

Mediante microscopía se monitorizó la internalización de proteínas de fusión Pma1/proteína fluorescente. Se disponía de una cepa con la *PMA1* genómica unida a RFP, y también de un plásmido centromérico con una copia del gen unida a GFP (pRSPma1GFP). La distribución de la fluorescencia fue la misma con ambos marcadores, y de acuerdo con lo esperado Pma1 se localizó de manera homogénea en la membrana plasmática (ilustración 31 A-B). En posteriores experimentos se empleó únicamente el plásmido, lo que permitió utilizar el mismo fondo genético de otros experimentos (cepa BY4741), marcar Pma1 en células de mutantes y realizar dobles marcajes con fluoróforos compatibles.

Las vacuolas celulares no fueron siempre claramente distinguibles en el DIC, haciendo necesaria una tinción específica del orgánulo. Se trataron las células con FM 4-64, lavándolas luego y resuspendiéndolas en medio fresco sin el marcador durante un tiempo suficiente para que el compuesto se desplazara completamente de la MP y los endosomas hasta la membrana vacuolar. Las células WT así marcadas no mostraron colocalización entre los dos fluoróforos (ilustración 31 C), confirmando la exclusión de Pma1 de la vacuola y la localización de dicha proteína en la MP. Ocasionalmente aparecieron acumulaciones de gran intensidad de fluorescencia en algunas células (ilustración 31 D). Estos agregados a menudo se concentraron en el citoplasma en posición excéntrica, y a pesar de su tamaño no se correspondieron con las vacuolas. Aunque se desconoce su naturaleza, la mayoría de las células mostraron la localización esperada de Pma1GFP en la MP, y en los tratamientos realizados posteriormente con ATLS no se observaron cuerpos con esas características. Por tanto no presentaron ningún problema en el estudio de la localización de Pma1p.

En los tratamientos con edelfosina sin embargo sí se observó acumulación de Pma1GFP en el interior celular, en estructuras generalmente circulares que, en su perímetro, colocalizaban con el marcador de la membrana vacuolar FM 4-64 (ilustración 31 E). Se confirmó así que la edelfosina provoca la internalización de Pma1 al lumen vacuolar, el compartimento degradativo de la célula. Este resultado se pudo extender además a los otros ATLS estudiados, miltefosina y perifosina (ilustración 31 F-G). El desplazamiento de la ATPasa Pma1 desde la membrana plasmática hasta la vacuola parece un mecanismo común para distintos compuestos de la familia de los ATLS.

Cualquier relación a establecer entre la toxicidad de ATLS –o cualquier otro fenotipo observado– y la internalización de Pma1GFP requiere que los experimentos se realicen en condiciones comparables. Las células empleadas en estos experimentos de internalización de la ATPasa poseían, además del gen *PMA1* de su genoma haploide, una copia adicional en el vector pRSPma1GFP. Si la toxicidad de los ATLS realmente depende de la internalización de Pma1, esa mayor dotación génica podría aumentar la resistencia de las células a los compuestos. Se comparó la inhibición del crecimiento por ATLS en células transformadas (pRSPma1GFP) respecto a células control (con el plásmido vacío pRS416). La concentración empleada en los experimentos de microscopía (10 μ M) causó una inhibición completa tanto con pRSPma1GFP como en el control (ilustración 32 A-C). Por tanto, las concentraciones empleadas en los experimentos con Pma1GFP fueron inhibitorias. Aunque la mayor dosis génica de las células transformadas con pRSPma1GFP no incrementa la viabilidad frente a 10 μ M de ATLS, sí se observó una mayor resistencia frente a dosis subletales de los tres compuestos:

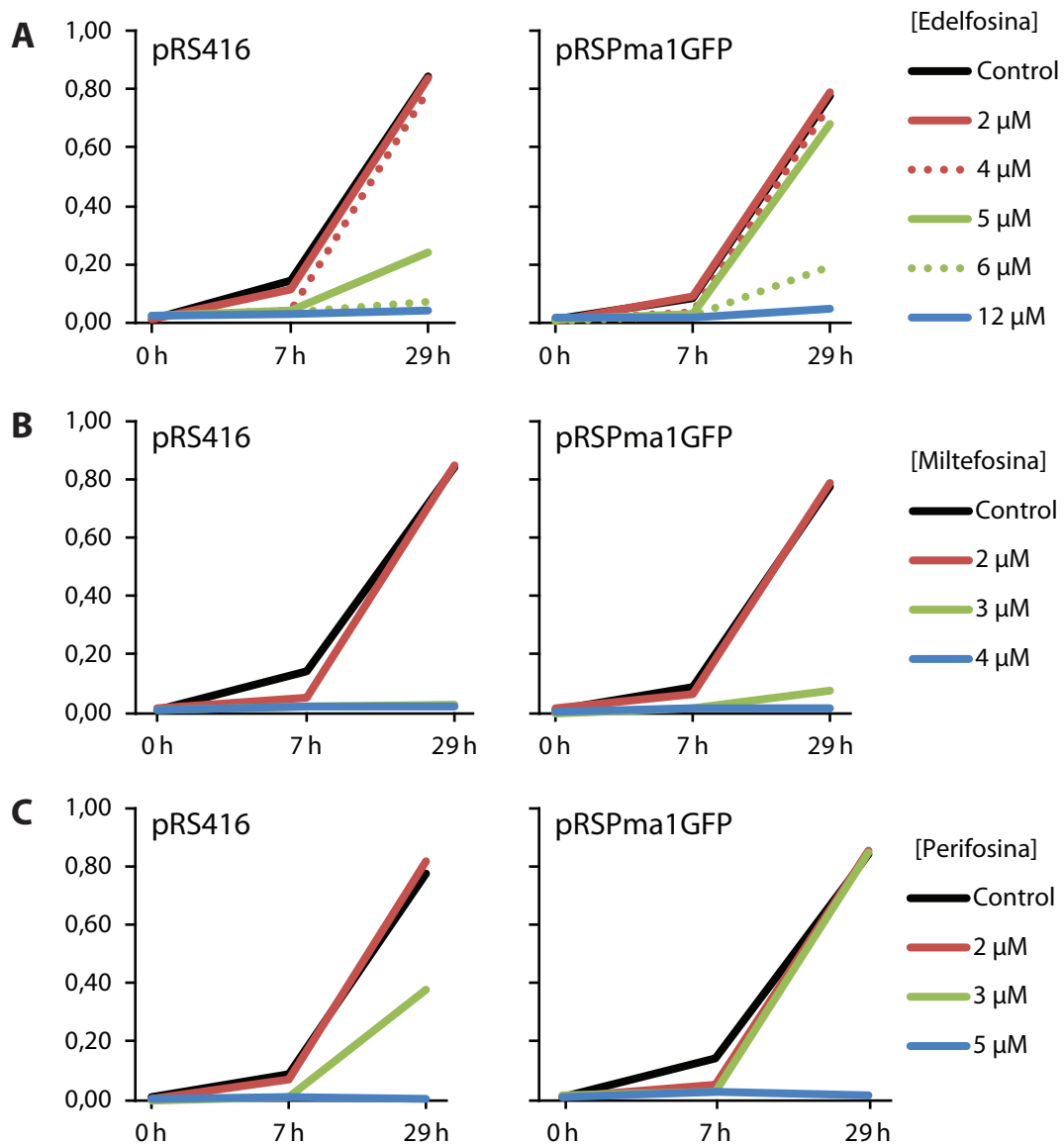


Ilustración 32: Resistencia a edelfosina (A), miltefosina (B) y perifosina (C) en células con el plásmido pRSPma1GFP (derecha) y el plásmido vacío pRS416 (izquierda). Experimento único.

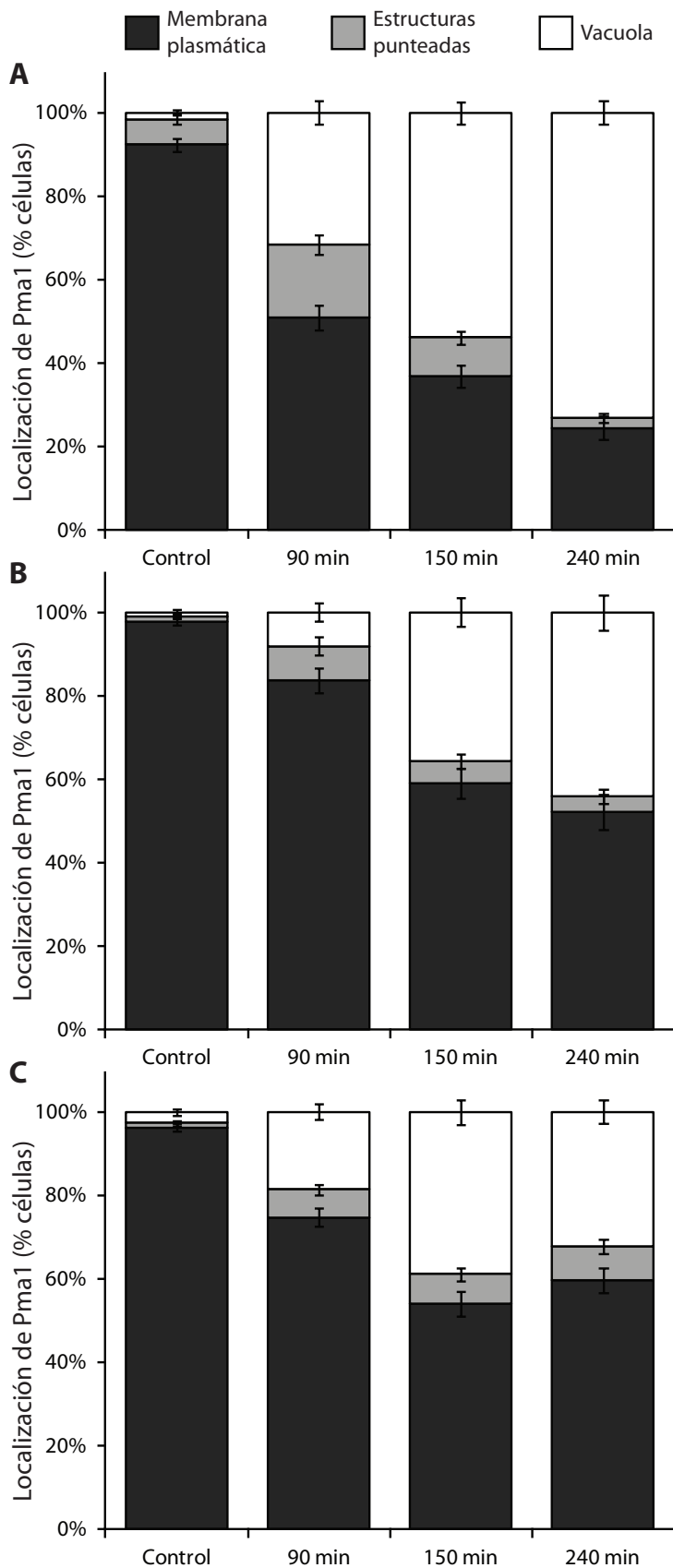


Ilustración 33: cuantificación de la localización vacuolar de Pma1 durante el tratamiento con 10 μ M ATLs. **A:** edelfosina. **B:** miltefosina. **C:** perifosina. $n \geq 200$ células.

5 μ M edelfosina (ilustración 32 A), 3 μ M miltefosina (ilustración 32 B) y 3 μ M perifosina (ilustración 32 C). Estos resultados se explicarían si la toxicidad por ATLs dependiese del desplazamiento de Pma1 a la vacuola. Dosis que en células WT son bajas pero efectivas resultan insuficientes si las células disponen de más Pma1 (pRSPma1GFP); sin embargo, a concentraciones elevadas (10 μ M) se supera en ambas células la mínima pérdida de Pma1 necesaria para una toxicidad efectiva, y por tanto se inhibe el crecimiento en los dos casos.

Los 3 compuestos provocaron distintos niveles de internalización de Pma1. Se cuantificaron las células que presentaban cada uno de las tres distribuciones de Pma1GFP: acumulación únicamente en la MP, presencia de estructuras punteadas no identificables como vacuolas e internalización y acumulación en las vacuolas. Como muestra la ilustración 33, los controles sin tratar presentaron mayoritariamente la primera morfología, mientras que hay una relación directa entre el número de células que acumulan Pma1GFP en la vacuola y el tiempo de tratamiento. Es de destacar que la edelfosina fue capaz de provocar una internalización mayor que los otros dos ATLs y también más

persistente en el tiempo que la perifosina, cuyos valores a 150 y 240 minutos fueron muy parecidos. Las estructuras punteadas de naturaleza no vacuolar representaron una minoría de las células analizadas (< 10% excepto en edelfosina 90 minutos).

La concentración empleada fue idéntica para todos los compuestos (10 μ M). Hay sin embargo diferencias (dentro de un mismo orden de magnitud) en la potencia de los compuestos, indicada por la concentración mínima necesaria para alcanzar una inhibición completa del crecimiento (ilustración 14). Miltefosina y perifosina, los ATLS más potentes (capaces de inhibir el crecimiento a menores concentraciones que edelfosina) provocaron sin embargo menor internalización de Pma1 que edelfosina (ilustración 33). Si la internalización de Pma1 dependiera únicamente de la potencia del compuesto se esperaría el resultado contrario. Por tanto, no todos los ATLS desplazan Pma1 por igual; pero hay además una relación inversa entre la potencia del compuesto y la internalización que provoca. Esto último parece indicar que la relevancia que el desplazamiento de Pma1 tiene para la toxicidad de edelfosina es mayor que en miltefosina y perifosina.

Durante la realización de los experimentos anteriores se observó un fenómeno adicional: la formación de deformaciones e invaginaciones de gran tamaño en la membrana plasmática, así como grandes vesículas muy cercanas a la misma. Las vesículas podrían ser la apariencia de las invaginaciones si su eje fuera perpendicular al plano de enfoque. Este fenotipo se observó en tratamientos con los 3 ATLS (ilustración 34 A-C). Todos los compuestos provocaron invaginaciones en más de un 40% de las células, siendo la aparición del fenotipo más veloz con edelfosina y perifosina que con miltefosina (ilustración 34 D-F). La frecuencia con la que se observó la internalización a la vacuola de Pma1GFP fue semejante en células con y sin invaginaciones, lo que descartó ninguna relación entre ambos fenotipos.

Dado que las invaginaciones observadas podrían ser estructuras formadas durante la entrada de la Pma1 desde la MP a la vía endocítica se decidió estudiar su origen. Las células se incubaron con el marcador lipofílico FM 4-64 a 0 °C, una temperatura que permite la incorporación del marcador a la MP pero que inhibe la endocitosis. El pulso de FM 4-64 se concentró por tanto en la MP y durante el marcaje no alcanzó otras estructuras intracelulares. Posteriormente se detuvo la carga lavando las células y se observó inmediatamente después por microscopía la morfología de la MP. En las células sin tratar con ATLS presentó una apariencia homogénea y sin invaginaciones, aunque durante los primeros 15 minutos de observación fueron apareciendo numerosas estructuras punteadas en la periferia celular (ilustración 35 A-B). Tras más de 15 minutos dichas estructuras perdieron definición, disminuyó la fluorescencia concentrada en la MP y apareció sin embargo un marcaje claro de la membrana vacuolar (ilustración 35 C-D). Esto es debido probablemente a que la carga de FM 4-64 se concentra exclusivamente en la MP al comenzar la observación, pero va incorporándose a vesículas endocíticas al reactivarse la endocitosis. Posteriormente alcanza los endosomas y la vacuola,

que es su destino final y donde se concentra, y como consecuencia de este transporte desaparece progresivamente de la MP. Las estructuras punteadas periféricas que se observaron eran seguramente pasos intermedios (vesículas endocíticas o compartimentos endosomales).

De manera semejante, las células tratadas con ATLS se transfirieron a hielo al final del tratamiento y se realizó un pulso de marcaje con FM 4-64 idéntico al de las células sin tratar. Tratamientos de 90 minutos con edelfosina o perifosina provocaron la aparición de invaginaciones en la MP (ilustración 35 E, F), a la vez que se observaba ya en algunos casos acumulación vacuolar de Pma1GFP (p. ej. ilustración 35 E). Las invaginaciones de Pma1GFP fueron accesibles al FM 4-64. Esto demostró que se trataba de estructuras con continuidad con la membrana plasmática preexistente, esto es, realmente invaginaciones. Su marcaje con FM 4-64 tuvo además una mayor intensidad que el resto de la MP, lo que podría indicar que las invaginaciones se forman en regiones de composición o función diferenciada. Su tamaño fue mayor que las estructuras previamente identificadas como vesículas endocíticas (ilustración 35 A-B).

En todas las invaginaciones apreciadas mediante la observación de Pma1GFP hubo también tinción con FM 4-64, pero no en todas las estructuras con tinción de FM 4-64 se observó Pma1GFP. En los paneles G-H de la ilustración 35 se aprecian invaginaciones con colocalización clara y otras estructuras sólo teñidas con FM 4-64. Estas últimas presentan características comunes con las estructuras de las células sin tratar tentativamente identificadas como vesículas endocíticas (ilustración 35 A-B): se tiñeron con FM 464 y no acumularon Pma1GFP, están mayoritariamente en la periferia celular y no siempre unidas a la MP, tuvieron un tamaño menor y poca definición. El modelo que sugieren estos resultados es que existe endocitosis en todas las células, que permite la incorporación de FM 4-64 pero no de Pma1, y un segundo proceso inducido por los ATLS por el que se forman invaginaciones cargadas de Pma1 a partir de la MP.

El tratamiento con ATLS provoca una degradación de Pma1 compatible con un mecanismo endosomal. La ATPasa reside en la MP celular y sin embargo se internaliza a la vacuola tras el tratamiento. Los ATLS provocan la formación de invaginaciones a partir de la MP, en las que se concentra Pma1 y que podrían estar implicadas en la internalización de la proteína. Aunque la movilización de Pma1 parece una característica general de los tres ATLS estudiados, los resultados sugieren que ni provocan su internalización con la misma intensidad ni esta internalización tiene la misma relevancia en su toxicidad.

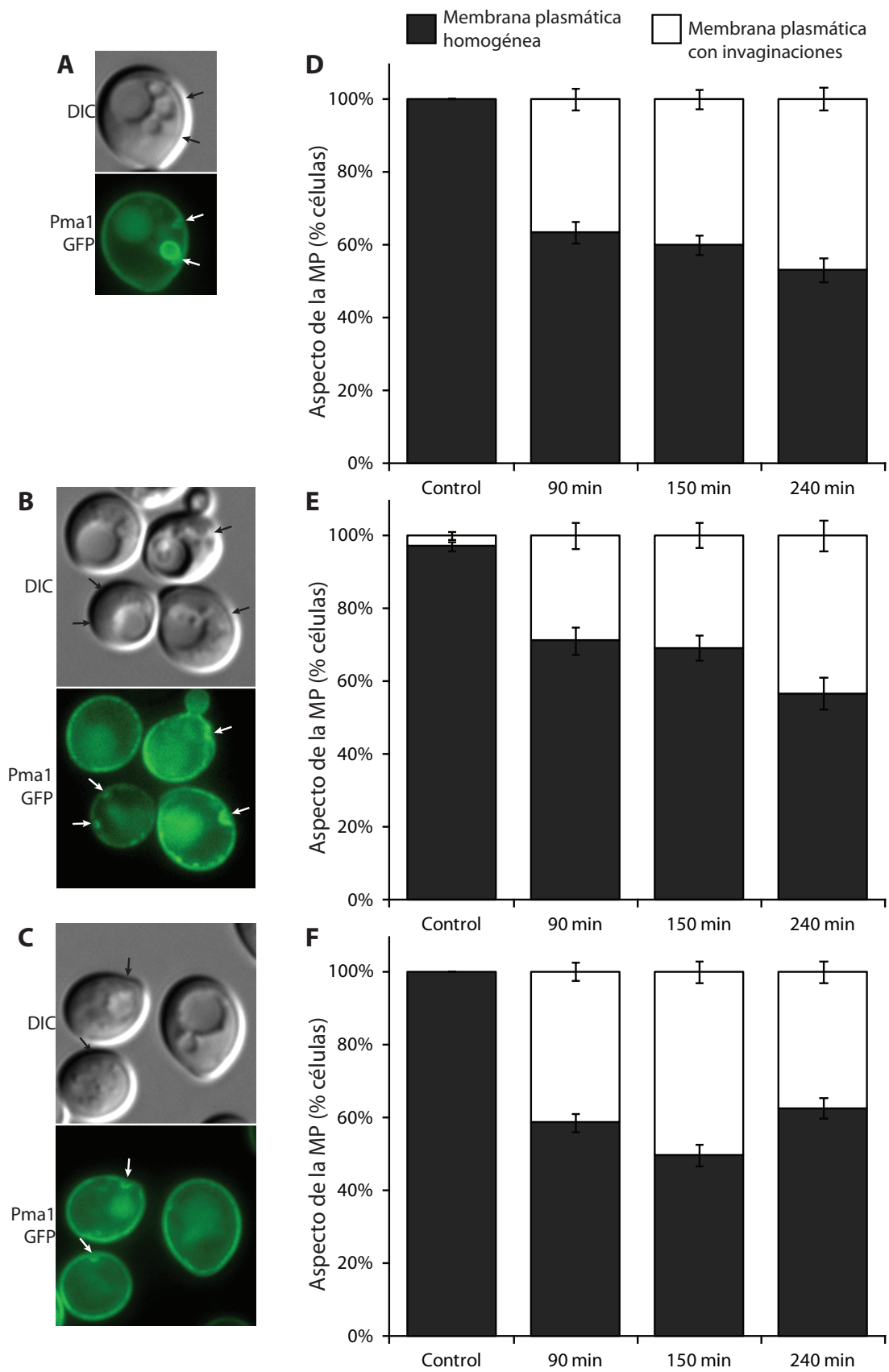


Ilustración 34: invaginaciones en la membrana plasmática. **A:** Invaginaciones en células tratadas con 10 μ M edelfosina. Se observaron también en células tratadas con la misma concentración de miltefosina (**B**) y perifosina (**C**). Se cuantificaron las células con invaginaciones tras tratamientos con edelfosina (**D**), miltefosina (**E**) y perifosina (**F**). \rightarrow : invaginación. $n \geq 200$ células.

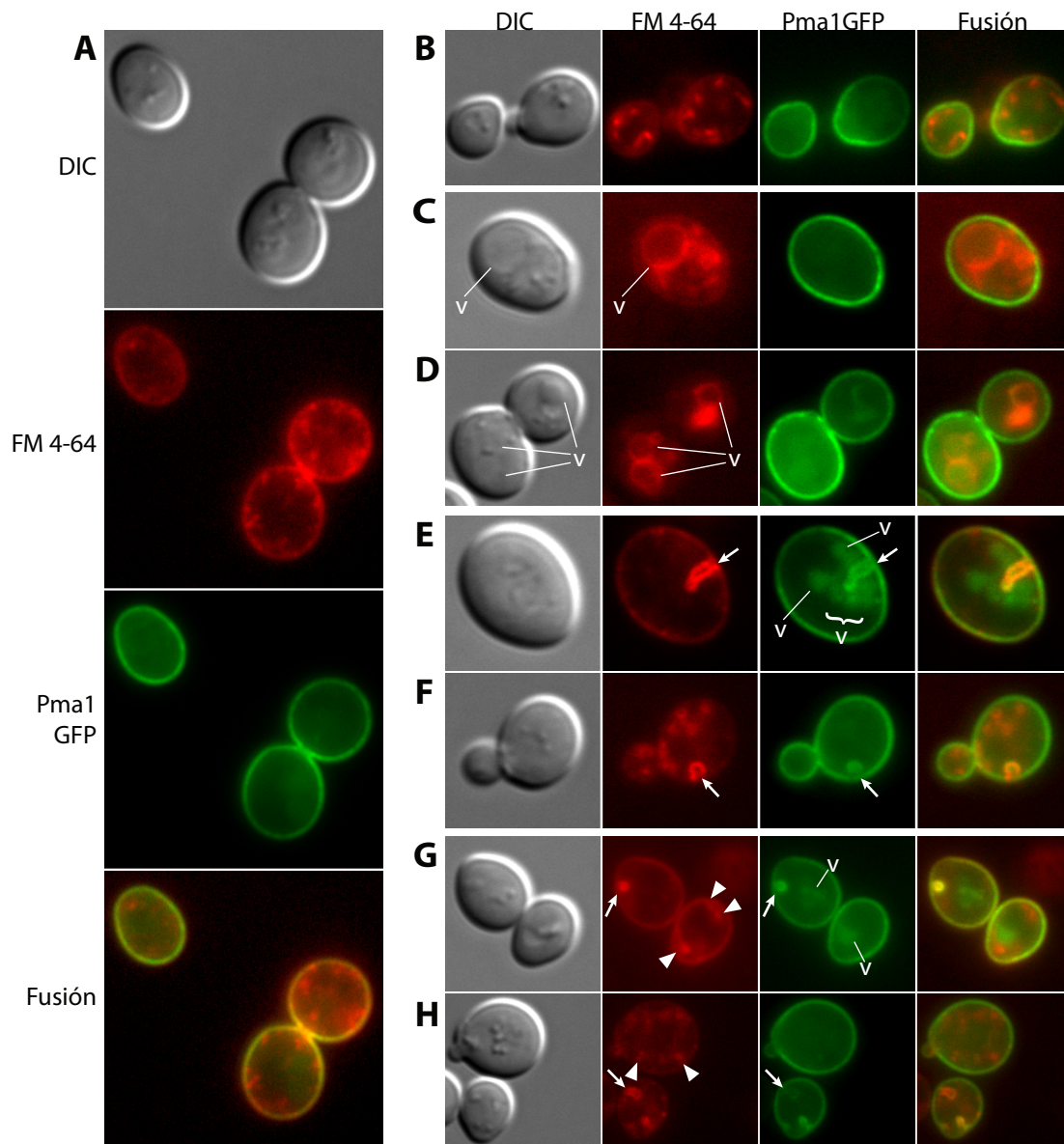


Ilustración 35: pulso y seguimiento de FM 4-64 tras el tratamiento con ATLs. A-B: control de células sin tratar, 0 min tras el pulso de FM 4-64. C-D: tratamiento con edelfosina 10 μ M 60 min, tras 15 minutos de observación. E, G: tratamientos con edelfosina 10 μ M 90 min. F, H: Tratamientos con perifosina 10 μ M 90 min. v: vacuola; \rightarrow : invaginación; \blacktriangleright : estructuras tentativamente identificadas como vesículas endocíticas.

Relevancia fisiológica de la internalización de Pma1

Experimentos posteriores buscaron comprobar la relevancia fisiológica de la degradación de Pma1 por ATLs. La identificación de la vía endosomal de degradación en el *screening* es coherente con el desplazamiento de la ATPasa a la vacuola, y la menor sensibilidad a los ATLs de las células que portaban una copia extra del gen *PMA1* indicaba que la degradación de la proteína y la toxicidad celular estaban relacionadas. Un efecto semejante se observa probablemente en el mutante de delección *yhc3Δ*, que presenta una actividad incrementada de la ATPasa de membrana³⁵⁷ y es resistente

a edelfosina. Esto concordó con resultados previos del laboratorio que habían demostrado que la sobreexpresión de Pma1 era capaz de aliviar la sensibilidad a edelfosina³⁰⁵.

El enfoque opuesto (sensibilidad incrementada en células con un defecto en *PMA1*) no pudo ser evaluado en el *screening* de mutantes sensibles a edelfosina, al ser el gen *PMA1* esencial y por tanto no disponerse de un mutante haploide. Sin embargo, con este mismo enfoque se empleó un alelo DAmP³²⁰ (Disminución de la abundancia por perturbación del RNA_m). Los alelos DAmP portan modificaciones en la región 3' no traducible del gen que disminuyen la estabilidad del ARN, y como resultado son alelos hipomórficos³⁵⁸. Los niveles de expresión de genes esenciales como *PMA1*, aunque bastan para mantener la viabilidad celular, están suficientemente reducidos como para provocar un fenotipo visible³⁵⁹. La sensibilidad de la cepa *PMA1*-DAmP a edelfosina resultó mucho mayor que las células con un alelo silvestre (ilustración 36), confirmando el papel central de este gen en la toxicidad a edelfosina. Es posible que un efecto análogo ocurra en las cepas *FEN1* y *SUR4*, que tienen una sensibilidad a edelfosina aumentada. Estos genes son necesarios para la formación de ácidos grasos de cadena larga, presentes en los esfingolípidos de *S. cerevisiae* y esenciales para la estabilidad de Pma1p^{159,205-207}. En sus mutantes se produce un defecto en la asociación de la ATPasa con los *lipid rafts* que provoca su internalización a la vacuola y su degradación. Este mismo fenotipo es causado por el tratamiento con edelfosina. Por tanto, en el tratamiento de los mutantes podría potenciarse la internalización de la ATPasa, lo que explicaría la hipersensibilidad de los mutantes a edelfosina.

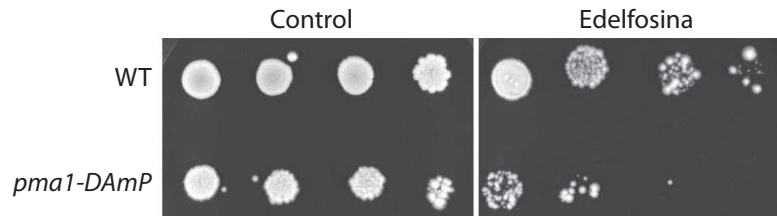


Ilustración 36: sensibilidad de la cepa Pma1-DAmP a edelfosina. Adaptado de Czyz *et al*, 2013³²⁰.

La pérdida de Pma1 puede provocar diversos efectos que justifiquen la toxicidad por ATLS observada. El potencial de membrana que Pma1 genera bombeando H⁺ al medio extracelular impulsa el uniporte de K⁺ al interior celular y su acumulación en contra de gradiente. El principal transportador de K⁺ es codificado por el gen *TRK1*³⁶⁰, que fue detectado en el *screening* de mutantes sensibles a edelfosina. La causa última de la toxicidad por edelfosina podría ser un defecto en el transporte de K⁺ provocado por la pérdida del potencial generado por Pma1. Sin embargo, *TRK1* no es esencial: es parcialmente redundante con otro transportador semejante (*TRK2*) y existen además mecanismos alternativos de transporte de potasio que se activan en mutantes *trk1trk2*³⁶¹. Trk1 colabora con Pma1 en el mantenimiento del potencial de membrana: el flujo de K⁺ a través de Trk1 es el mayor flujo entrante de cargas positivas en *S. cerevisiae*, que compensa el potencial creado por Pma1²⁰¹. La hiperpolarización de los mutantes *trk1* podría ralentizar el bombeo de protones de Pma1, siendo esta pérdida adicional de la función de la ATPasa el origen de la mayor susceptibilidad a edelfosina.

Una segunda función de Pma1 es colaborar en la homeostasis del pH citosólico, que debe mantenerse dentro de un rango estrecho para permitir el correcto funcionamiento de las proteínas celulares. La MP es el compartimento celular desde donde Pma1 efectúa el bombeo de protones al medio extracelular, y la pérdida de la proteína provocaría una acumulación de protones en el citosol. Esta acidificación puede comprobarse mediante el uso de tintes acidotrópicos (compuestos neutros y permeables a las membranas que adquieren carga al alcanzar compartimentos celulares de bajo pH, volviéndose impermeables y quedando retenidos) como la quinacrina³⁶². En trabajos previos de nuestro laboratorio se había observado la acidificación celular provocada por edelfosina³⁰⁵. En las células WT sin tratar sólo las vacuolas y algunos otros corpúsculos de menor tamaño se tiñen, permaneciendo el resto del citoplasma libre de fluorescencia (ilustración 37 A). La edelfosina provocó una tinción general en todo el citoplasma (ilustración 37 B), confirmando la acidificación del citosol previamente observada. Esta tinción es sin embargo más débil que la presente en la vacuola, cuya mayor intensidad de fluorescencia aún puede distinguirse en células tratadas con edelfosina. Posiblemente esto indique que el citosol alcanza, tras el tratamiento con edelfosina, un pH entre el fisiológico y el vacuolar. Se combinaron la tinción con quinacrina y el marcaje vacuolar con FM 4-64 descrito previamente para identificar inequívocamente las vacuolas (ilustración 37 C-D). Se comprobó además que en los tres mutantes del retrómero también se acidificaba el citosol (ilustración 37 E-J) a pesar de ser resistentes a edelfosina. Las vacuolas del mutante *vps17Δ* se encuentran fragmentadas³⁶³, lo que impidió visualizar una tinción de las vacuolas claras; no obstante, en los tratamientos con edelfosina (ilustración 37 F) apareció una tinción más difusa y completa del citoplasma que no estaba presente en los controles sin tratar (ilustración 37 E). La tinción vacuolar fue más clara en los mutantes *vps29Δ* (ilustración 37 G) y *vps35Δ* (ilustración 37 I) y fue así mismo clara la acidificación citosólica provocada por la edelfosina en ambos mutantes (ilustración 37 H, J).

La edelfosina desplazó Pma1 de la MP y produjo acidificación citosólica, planteándose la hipótesis de que dicha alteración del pH provocó la toxicidad del compuesto. Según este modelo, los mutantes que tuvieran defectos en el mantenimiento de la homeostasis del pH presentarían una sensibilidad aumentada frente a la edelfosina. En efecto se identificaron múltiples mutantes hipersensibles a edelfosina con defectos en la ATPasa vacuolar (v-ATPasa). Esta proteína bombea protones al interior de la vacuola, simultáneamente generando un medio ácido necesario para la actividad de los enzimas digestivos del orgánulo y colaborando con Pma1 en el tamponamiento de los protones del medio intracelular²⁰⁰. Como se recoge en la tabla supl. 2, se aislaron mutantes hipersensibles en 9 de las 14 subunidades de la v-ATPasa³⁶⁴ (*VMA2*, *VMA4*, *VMA5*, *VMA6*, *VMA7*, *VMA9*, *VMA10*, *VMA11* y *VMA16*) y en dos factores necesarios para el ensamblaje de la ATPasa³⁶⁵ (*VMA12* y *VMA21*). Se comprobó la sensibilidad de los mutantes en todas las subunidades de la vATPasa en medio sólido³²⁰, confirmándose la sensibilidad de los mutantes anteriores e identificándose tres subunidades más de la ATPasa y otro factor necesario para su ensamblaje (*VMA3*, *VMA8*, *VMA13* y *VMA22*). Dado que

la afectación de prácticamente cualquier subunidad de la VATPasa condujo a hipersensibilidad frente a edelfosina, parece factible que sea la caída del pH citosólico lo que desencadena la toxicidad celular por edelfosina.

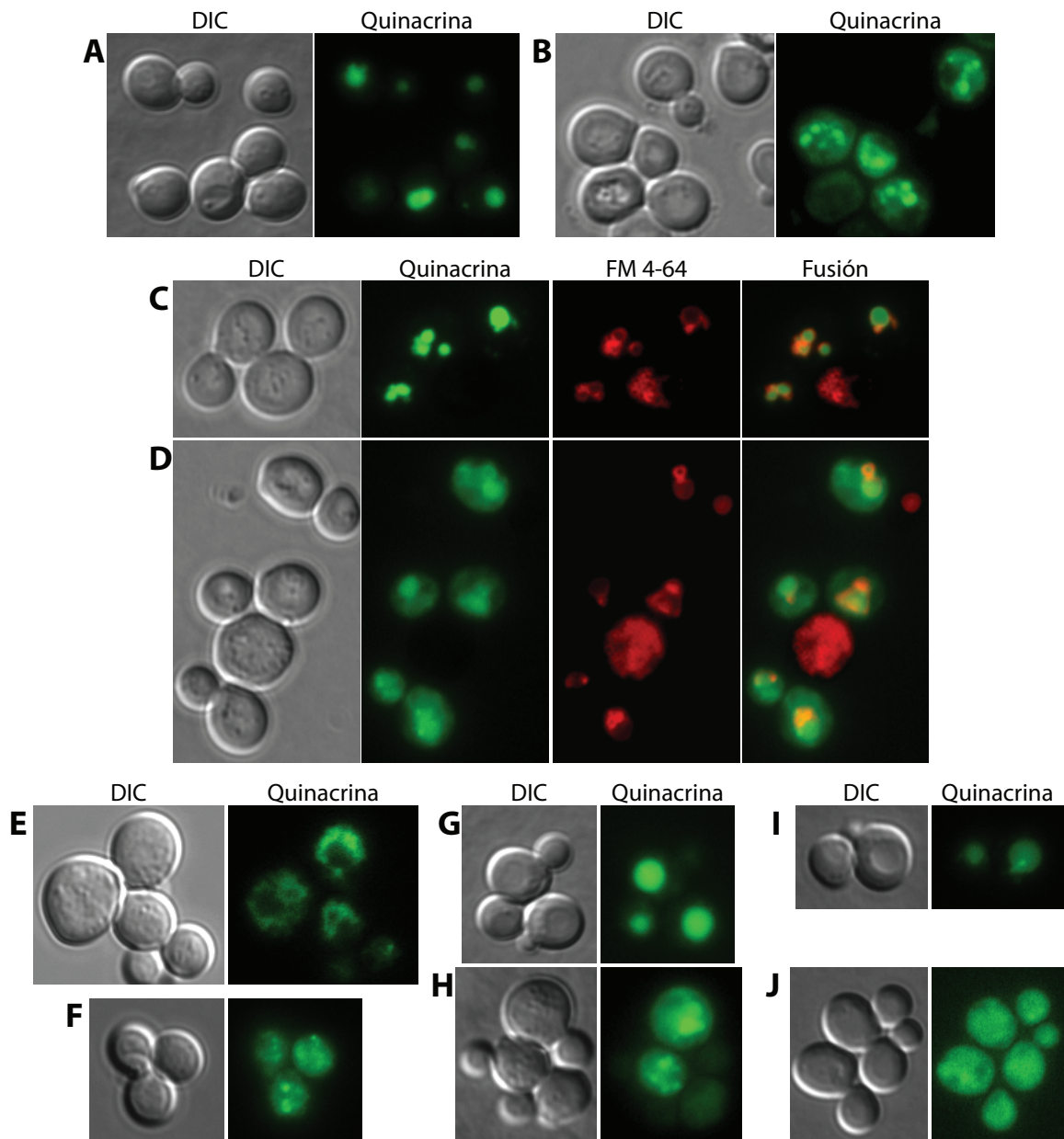


Ilustración 37: acidificación celular provocada por 10 μ M edelfosina. Tinción con quinacrina: células WT, control y tratamiento (A, B); células WT marcadas con FM 4-64, control y tratamiento (C, D); y mutantes del retrómero *vps17* Δ (E, F), *vps29* Δ (G, H) y *vps35* Δ (I, J), control y tratamiento respectivamente.

La tinción con quinacrina es un método esencialmente cualitativo para medir el pH celular, y aunque es capaz de mostrar una desviación de las condiciones fisiológicas (acidificación del citosol), no da información de la magnitud de la acidificación. Como tal no fue capaz de revelar si los mutantes del retrómero se acidificaban en la misma medida que las células WT. Con el fin de realizar un análisis más fino se generó una cepa que expresaba una proteína fluorescente dependiente de pH y se calibró la

relación intensidad de la fluorescencia/pH³²⁰. Esto permitió emplear esta proteína, dirigida al citosol, como sonda. Se confirmó que el citosol de células WT, ligeramente por encima de la neutralidad en el control, se acidifica hasta un pH de 6,88 tras 90 minutos (ilustración 38 A), todavía mayor que el pH vacuolar estimado en 6,2³⁶⁶. Se analizaron además un mutante en la subunidad del retrómero *VPS35* (resistente), y un mutante en una subunidad de la v-ATPasa *VMA2* (hipersensible). El mutante *vps35* se acidificó menos que el WT, alcanzando sólo un pH de 7,05 (ilustración 38 B). Por el contrario, el pH del mutante *vma2* disminuyó más que el WT en presencia de edelfosina, hasta un pH de 6,76 (ilustración 38 C). En estos dos mutantes al menos existe una correlación entre caída del pH citosólico y sensibilidad a edelfosina, que refuerza el papel de la acidificación en la toxicidad por edelfosina. La mayor caída del pH en el mutante de la v-ATPasa sería consecuencia de la capacidad reducida de tamponamiento de este mutante; sin embargo no se pueden descartar con estos resultados otros procesos consecuencia de esa mutación, como una mayor inestabilidad de Pma1²⁰⁰, que también podrían sensibilizar a la célula. La resistencia del mutante del retrómero podría ser causada por una menor degradación de Pma1, manteniendo el mutante una mayor proporción de la ATPasa activa y, como consecuencia, un pH citosólico más elevado.

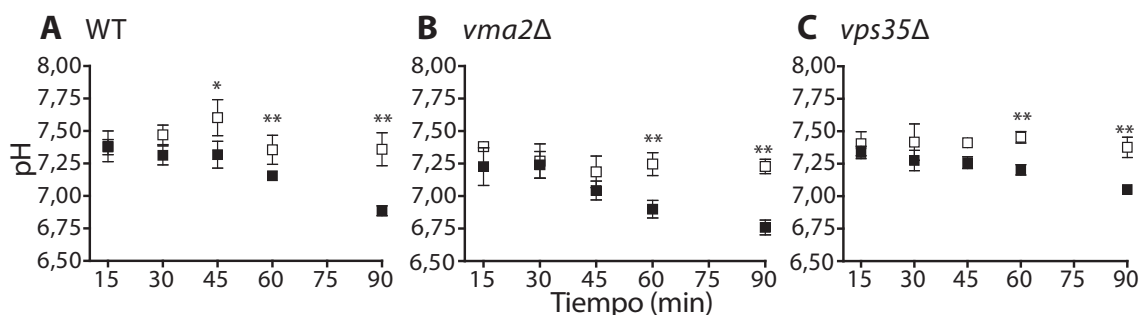


Ilustración 38: medición del pH citosólico. **A:** WT. **B:** *vps35*Δ. **C:** *vma2*Δ. Se representa el control (o) y el tratamiento con 19 μM edelfosina (n), media de tres experimentos ± desviación estándar. Adaptado de Czyz et al, 2013³²⁰.

La internalización de Pma1 observada en los mutantes del retrómero concuerda con esta última hipótesis sobre el origen de la resistencia de los mismos. Se transformaron células de *vps17*Δ, *vps29*Δ y *vps35*Δ con el plásmido pRSPma1GFP y se marcaron las vacuolas con FM 4-64 (ilustración 39). La intensidad de la fluorescencia de Pma1GFP vacuolar, en relación a la persistente en la MP, fue mayor en células WT que en mutantes *vps29*Δ y *vps35*Δ. Las vacuolas fragmentadas del mutante *vps17*Δ impidieron hacer tal apreciación con total claridad. Estos resultados indican un incremento en la persistencia de Pma1 en la membrana plasmática en los mutantes del retrómero, lo que sugeriría la implicación de este complejo en los procesos de internalización, degradación o reciclaje de Pma1. No obstante, se requeriría de una técnica experimental que permitiera cuantificar la internalización de Pma1 en las vacuolas para comparar los mutantes con el WT y validar esta observación.

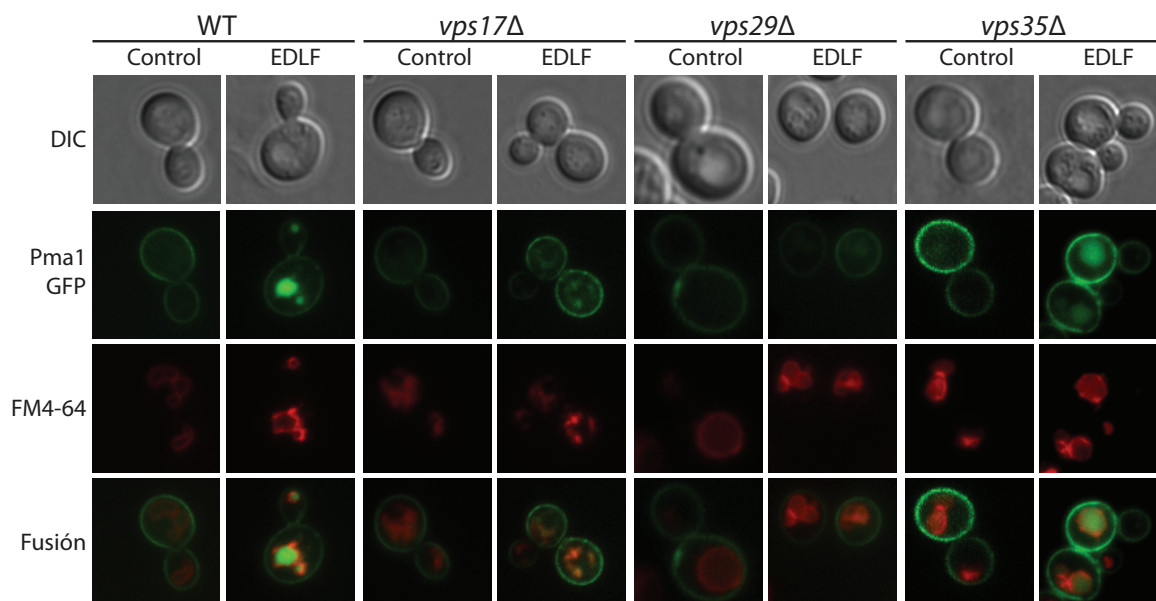


Ilustración 39: localización de Pma1 en mutantes del retrómero. EDLF: 10 μ M edelfosina. Adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2013³¹⁹.

Mecanismos celulares de internalización de Pma1

La internalización de Pma1 podría suceder a través de endocitosis y del tráfico endosomal. La resistencia a edelfosina de los mutantes de dichos procesos vendría así dada por un flujo reducido de Pma1 al compartimento digestivo de la vacuola. Se estudió en primer lugar la internalización de la proteína por microscopía de fluorescencia, empleando células transformadas con el plásmido pRSPma1GFP. A 30 °C la proteína se translocó durante el tratamiento con edelfosina desde la MP a las vacuolas (ilustración 40 A). En condiciones de endocitosis reducida –células a 0 °C– el mismo compuesto no afectó la localización de la proteína, manteniéndose en la MP (ilustración 40 B).

Pma1 se asocia a microdominios específicos de membrana enriquecidos en esfingolípidos y esteroides denominados *lipid rafts* (LR)^{153,198}. En un trabajo previo del laboratorio se había estudiado esta asociación mediante fraccionamiento celular, una técnica capaz de separar las membranas resistentes a detergentes –correspondientes a los LR– del resto de membranas. Cada fracción se analizó por *western blot* para detectar la presencia de Pma1. Tratamientos con edelfosina en células WT provocaron un desplazamiento de Pma1 fuera de la fracción LR³⁰⁵ concomitante con la internalización observada de la proteína a la vacuola. Esto fue además extendido a los otros ATLS en los que se había observado provocaban internalización de Pma1 (ilustración 41 A).

El desplazamiento de Pma1 observado podría reflejar dos procesos. Los ATLS tienen una alta afinidad por los esteroides, uno de los principales componentes de los LR. La interacción directa del compuesto con los microdominios podría modificar sus propiedades físicas, provocando así la disociación de Pma1 de los mismos. En este caso, el desplazamiento reflejaría el cambio de Pma1 a

una fase de la MP no-LR. La internalización de la proteína sería un proceso distinto, aunque podría estar provocado precisamente por este cambio de fase en la MP. Un problema de este modelo es que la incorporación de edelfosina y miltefosina a las células es relativamente rápida, como indican los experimentos con análogos fluorescentes (ya muestra su acumulación definitiva tras 30 minutos), mientras que el desplazamiento de Pma1 se observa tras varias horas de tratamiento. En otra interpretación el desplazamiento simplemente reflejaría el traslado de la MP a la vacuola, un orgánulo en cuyas membranas no se encuentran estos dominios (según indica su composición lipídica^{367,368}) o incluso a su lumen. A favor de este segundo modelo está la cinética del desplazamiento de Pma1 fuera de la fracción LR, que coincide con la de la internalización de Pma1GFP: ambos suceden tras varias horas de tratamiento.

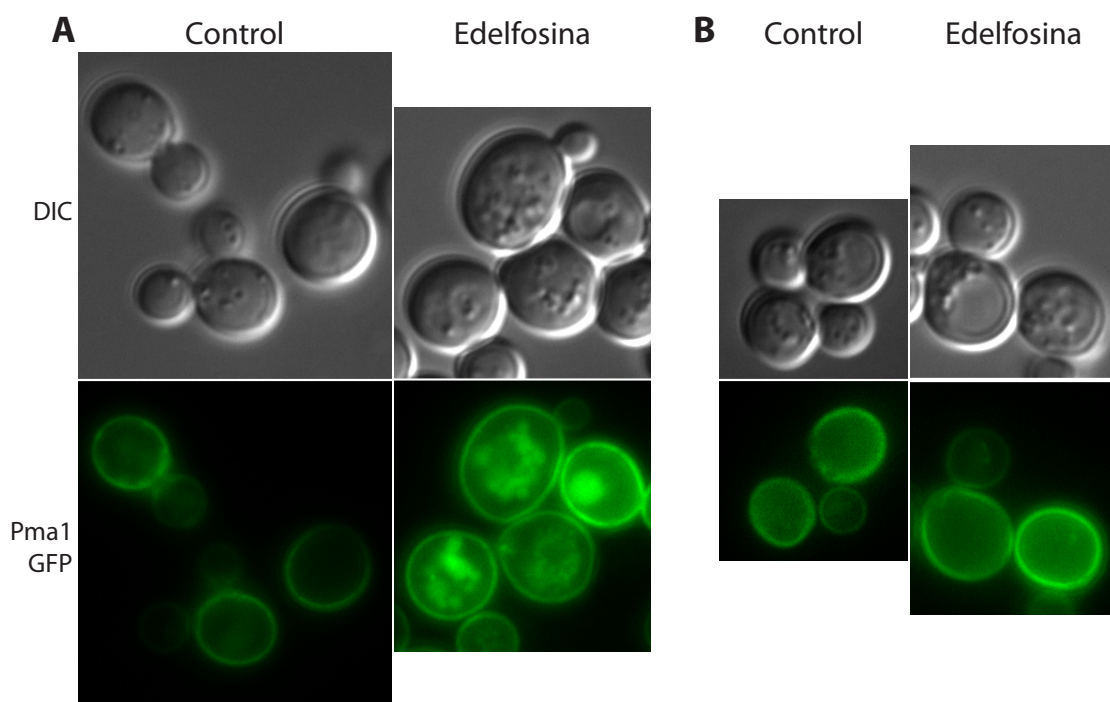


Ilustración 40: internalización de Pma1 en condiciones de endocitosis reducida. A: Localización de Pma1GFP en células control/tratadas con 10 μ M edelfosina a 30 °C. B: Mismo experimento a 4 °C.

Una mayor clarificación sobre el punto anterior la aportó el mutante *end4pep4Δ*. Los mismos experimentos de fraccionamiento revelaron que en este mutante Pma1 permanece dentro de la fracción LR incluso tras 5 h de tratamiento³⁰⁵ (ilustración 41 B). La cepa *end4pep4Δ* incorpora edelfosina igual que el WT pero es resistente al compuesto³⁰⁵. Sus mutaciones (defectos en la endocitosis y la digestión endosomal) no indican a priori diferencias en los LR o en la interacción LR-ATL. La asociación de [³H]-edelfosina con los microdominios se estudió por fraccionamiento celular seguida por detección del compuesto en las fracciones mediante autoradiografía (ilustración 41 C). En el mutante *end4pep4Δ* se acumuló edelfosina en la fracción LR, más incluso que el WT. Sin embargo, esa presencia de edelfosina en la fracción LR no fue suficiente para provocar el desplazamiento de Pma1. Esto sugiere que el desplazamiento observado por experimentos de fraccionamiento parece reflejar

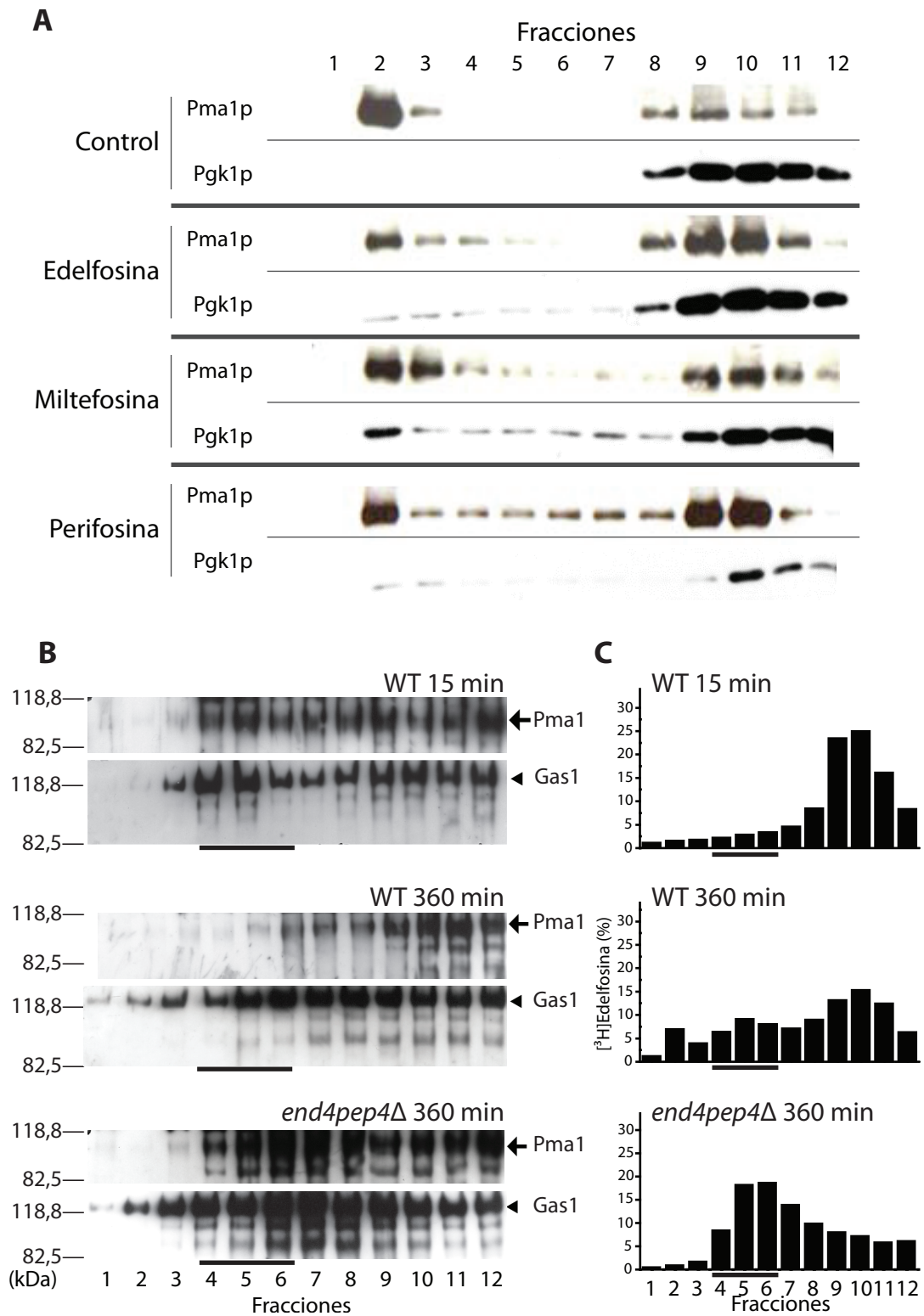


Ilustración 41: desplazamiento de Pma1 fuera de los lipid rafts por ATLS. Se realizaron fraccionamientos celulares, a partir de los tratamientos con los ATLS indicados, para aislar *lipid rafts*. **A:** fracciones de tratamientos con ATLS, analizadas por SDS-PAGE seguido de *western blot* con anticuerpos frente a Pma1 y Pgk1. **B:** fracciones de las cepas indicadas tratadas con edelfosina a distintos tiempos, analizadas por SDS-PAGE seguida de *western blot* con anticuerpos frente a Pma1 (↔) y Gas1 (▶). **C:** incorporación de [³H]-Edelfosina en cada fracción de los mismos tratamientos que en B. La banda negra indica las fracciones de los *lipid rafts*. Adaptado de Cuesta-Marbán *et al*, 2013³¹⁹.

la internalización de Pma1. El mutante *end4pep4Δ* no sufriría tal internalización, lo que explicaría su resistencia a edelfosina. Sin embargo, no debe deducirse de lo anterior que los ATLS no provocan ningún cambio en los LR o en la distribución de Pma1; simplemente, no son tales cambios lo que se refleja en los experimentos de fraccionamiento.

Se han descrito en múltiples proteínas de la MP su internalización por endocitosis seguida de la incorporación a la vía degradativa endosoma-vacuolar^{224,369}. La ubiquitinación en la región citosólica de las proteínas actúa como señal de degradación, permitiendo su reconocimiento por los complejos ESCRT e incorporación a las vesículas del MVB. Se había considerado la implicación de estos procesos en la degradación de Pma1, por lo que se comprobó si esta proteína sufría ubiquitinación durante los tratamientos con edelfosina. Se realizaron extractos celulares a partir de cantidades equivalentes de células control o tratadas a distintos tiempos con edelfosina, y se inmunoprecipitaron los extractos. En primer lugar se emplearon bolas de sefarosa-proteína A incubadas con un anticuerpo policlonal frente a Pma1. En todas las muestras se observó una banda de aproximadamente 100 kDa (ilustración 42 A, banda 1; el peso estimado de Pma1 es 99,62 kDa). En los tratamientos con edelfosina pero no en los controles se observó una segunda banda de peso molecular mayor, cuya intensidad era proporcional a la duración del tratamiento (ilustración 42 A, banda 3) y en los tratamientos de 120 y 240 minutos se observó además una banda intermedia (ilustración 42 A, banda 2). Para estimar el peso molecular de dichas bandas se calculó la recta de regresión entre el avance del frente relativo de los marcadores y el logaritmo de su peso molecular (ilustración 42 B). Aplicando la ecuación de la recta a las tres bandas identificadas en el panel A se confirmó un peso estimado para la banda 1 (98,13 kDa) consistente con el peso molecular de Pma1. El peso estimado de las bandas 2 y 3 fue de 103,46 y 107,17 kDa respectivamente. Los geles de poliacrilamida separan las proteínas fundamentalmente en función del tamaño de la cadena peptídica, que es aproximadamente proporcional al peso molecular de la proteína. Sin embargo las proteínas unidas a ubiquitina no son cadenas lineales: la ubiquitina forma ramificaciones al realizarse su conjugación en cadenas laterales de aminoácidos intermedios del péptido. Aunque el peso estimado para la banda 3 es unos 9 kDa mayor que la banda 1, semejante al peso molecular de la ubiquitina³⁷⁰, no es posible inferir de este resultado que la banda 3 se corresponda a una monoubiquitinación. Para confirmar la presencia de ubiquitina conjugada a la Pma1 de células tratadas con edelfosina se emplearon bolas de sefarosa conjugadas a una proteína con afinidad por la ubiquitina. Esto permitió inmunoprecipitar tanto la ubiquitina libre de las células como otras proteínas conjugadas a ubiquitina. Las inmunoprecipitaciones se analizaron por *Western blot* empleando un anticuerpo anti-Pma1. Entre las proteínas celulares ubiquitinadas se encontró Pma1 en los tratamientos con edelfosina, pero no en los controles sin tratar (ilustración 42 C, →). La banda identificada tuvo el mismo peso molecular aparente que la observada en la inmunoprecipitación de Pma1 (ilustración 42 A) y, al igual que esta, su intensidad fue directamente proporcional a la duración

del tratamiento. No se detectaron bandas definidas en este experimento; aún así se confirmó que en los tratamientos con edelfosina Pma1 sufre una ubiquitinación no presente en células sin tratar.

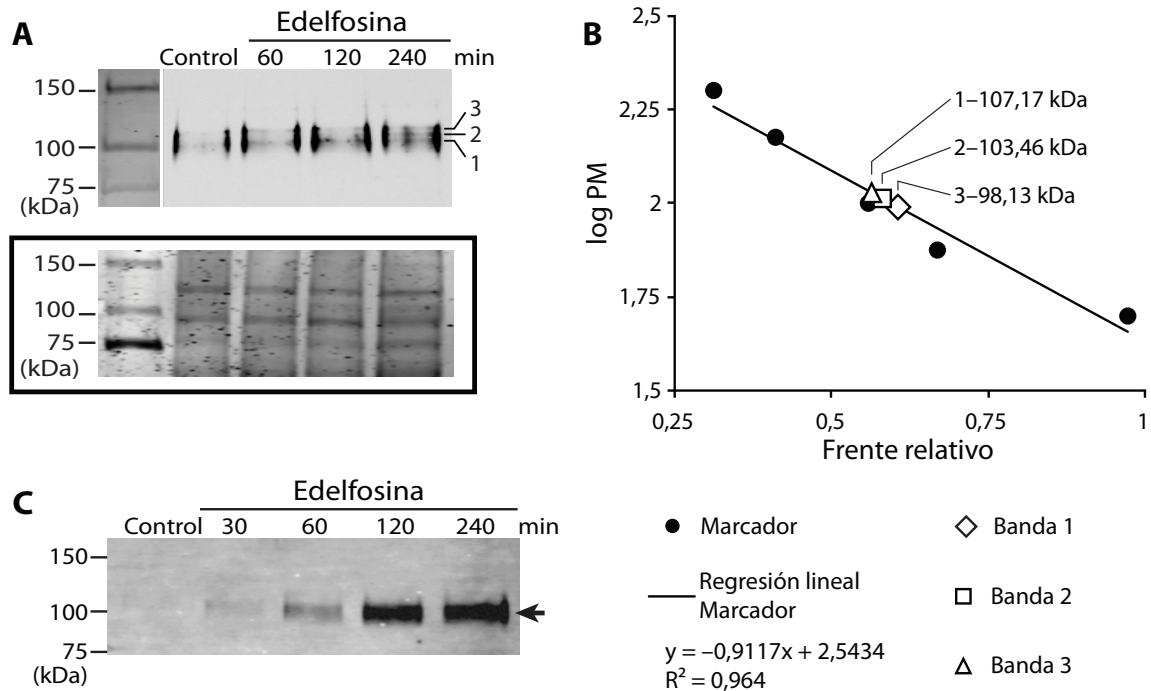


Ilustración 42: ubiquitinación de Pma1. **A:** inmunoprecipitaciones de Pma1, analizadas por *western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-Pma1. La banda detectada (1) presentó dos bandas de peso molecular ligeramente mayor (2, 3). En el **inserto** se muestra un segundo gel de SDS-PAGE realizado en paralelo con las mismas muestras y teñido con azul de Coomassie. **B:** cálculo de las bandas 1, 2 y 3 del panel anterior. **C:** inmunoprecipitaciones de ubiquitina y proteínas ubiquitinadas, analizadas por *Western blot* con un anticuerpo anti-Pma1.

Origen de la Pma1 internalizada

El último punto acerca de Pma1 que se estudió fue la naturaleza de la proteína que se acumula en la vacuola. Este punto había sido considerado en el primer trabajo del laboratorio que señalaba la incorporación de Pma1 a la vacuola tras el tratamiento con edelfosina. Marcando la Pma1 de nueva síntesis con [³⁵S]-Metionina/Cisteína se observó que ésta permanecía asociada a los *lipid rafts*³⁰⁵. Dado que el desplazamiento fuera de estos microdominios se había asociado a la internalización de la proteína a la vacuola, se interpretó que era la Pma1 preexistente y residente en la MP la que se translocaba a dicho orgánulo, y no la de nueva síntesis. Se buscó confirmar este resultado y estudiar además la naturaleza de la Pma1 internalizada en los tratamientos con miltefosina y perifosina. La estrategia empleada fue la inhibición de la síntesis proteica con cicloheximida.

En primer lugar se estudió el efecto de la cicloheximida en la viabilidad celular mediante un ensayo clonogénico (ilustración 43 A). El control sin tratar presentó un crecimiento exponencial. Por el contrario, dos concentraciones de CHX tuvieron un efecto citostático: el número de células viables se mantuvo prácticamente constante (sufrió una ligera disminución, indicativa de una reducida toxicidad) pero las células no proliferaron. Se empleó 50 µg/mL CHX en posteriores experimentos.

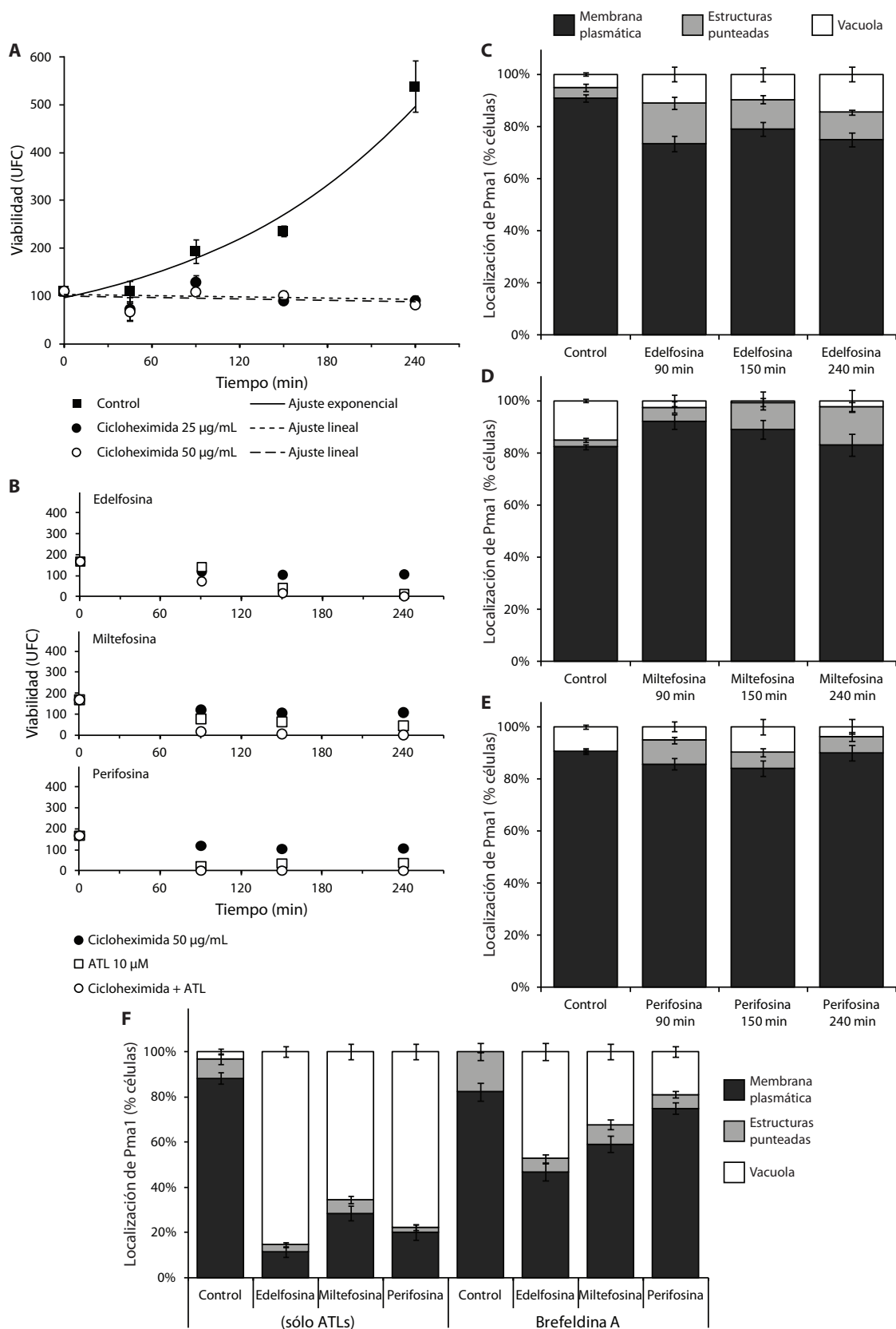


Ilustración 43: internalización de Pma1 en células cotratadas con cicloheximida y ATLs. **A:** viabilidad de las células tratadas con cicloheximida. **B:** viabilidad de las células cotratadas con 50 µg/mL cicloheximida y ATLs. Media de 3 réplicas ± EEM. La internalización de Pma1 se cuantificó en células tratadas con 50 µg/mL cicloheximida y 10 µM edelfosina (**C**), miltefosina (**D**) o perifosina (**E**). **F:** internalización de Pma1 cuantificada en células preincubadas con brefeldina A y tratadas con 10 µM ATLs 240 minutos. $n \geq 200$ células.

Como se había observado previamente, los tres ATLS redujeron la viabilidad, progresivamente y siempre por debajo de la viabilidad constante observada con cicloheximida (ilustración 43 B). El cotratamiento de CHX y ATLS no retrasó ni inhibió esta caída de viabilidad, siendo la viabilidad menor incluso que la observada en tratamientos sólo con ATLS (ilustración 43 B).

Se observó la internalización de Pma1GFP en células transformadas con el plásmido pRSPma1GFP y cotratadas con CHX y ATLS. En comparación con las células tratadas únicamente con ATLS (ilustración 33) el número de células que presentaban internalización de Pma1GFP mostró, en los cotratamientos con 50 µg/mL de CHX y ATLS, una marcada reducción (ilustración 43 C-E). Se buscó confirmar este efecto tratando las células con 80 µg/mL de brefeldina A, un compuesto que desorganiza el RE y el AG e inhibe la secreción de proteínas³⁷¹. La brefeldina A no fue tan eficaz como la cicloheximida, quizás por su reducida incorporación en *S. cerevisiae*; no obstante, la cantidad de células con acumulación de Pma1GFP en la vacuola fue sensiblemente menor. La síntesis de proteínas activa es por tanto un requisito imprescindible para la internalización de Pma1GFP.

Los anteriores resultados resultaron sorprendentes por dos razones. Se observaba un bloqueo en la internalización de Pma1 que sin embargo no se traducía en una recuperación de la viabilidad celular, lo que parecía contradecir el papel central que hasta el momento se había asignado a dicha internalización en la toxicidad por ATLS. Si la Pma1 internalizada fuera de hecho la sintetizada *de novo*, la inhibición por CHX de la síntesis proteica evitaría su translocación a la vacuola. Sin embargo, se cambiaría la degradación de Pma1 de los tratamientos con ATLS por el bloqueo de su síntesis del tratamiento con CHX, es decir, no aumentaría la disponibilidad de Pma1 en la MP y no tendría que observarse una mayor viabilidad. Una segunda y mayor objeción es que estos resultados contradicen la observación previa de que la Pma1 desplazada fuera de los *lipid rafts* no era la sintetizada *de novo*³⁰⁵. Se planteó la posibilidad de que la inhibición de la síntesis o el transporte proteico estuviera bloqueando la endocitosis o el transporte endosomal. En este caso sería dicho bloqueo –y no el de la síntesis *de novo* de Pma1– el que evitaría la acumulación vacuolar de la ATPasa. Sin embargo, se esperaría en este caso un aumento de la resistencia de las células al tratamiento con ATLS, semejante al observado en mutantes de endocitosis o de la vía de degradación endosomal. Este supuesto se confirmó monitorizando la endocitosis y el transporte a través del endosoma con FM 4-64. Tanto las células tratadas sólo con CHX (ilustración 44 A) como las cotratadas con CHX y ATLS fueron capaces de transportar FM 4-64 a la vacuola (ilustración 44 B-D). Por lo tanto la inhibición que la cicloheximida ejerce sobre la translocación de Pma1GFP a la vacuola no se debe a un efecto global en los procesos de transporte de la célula.

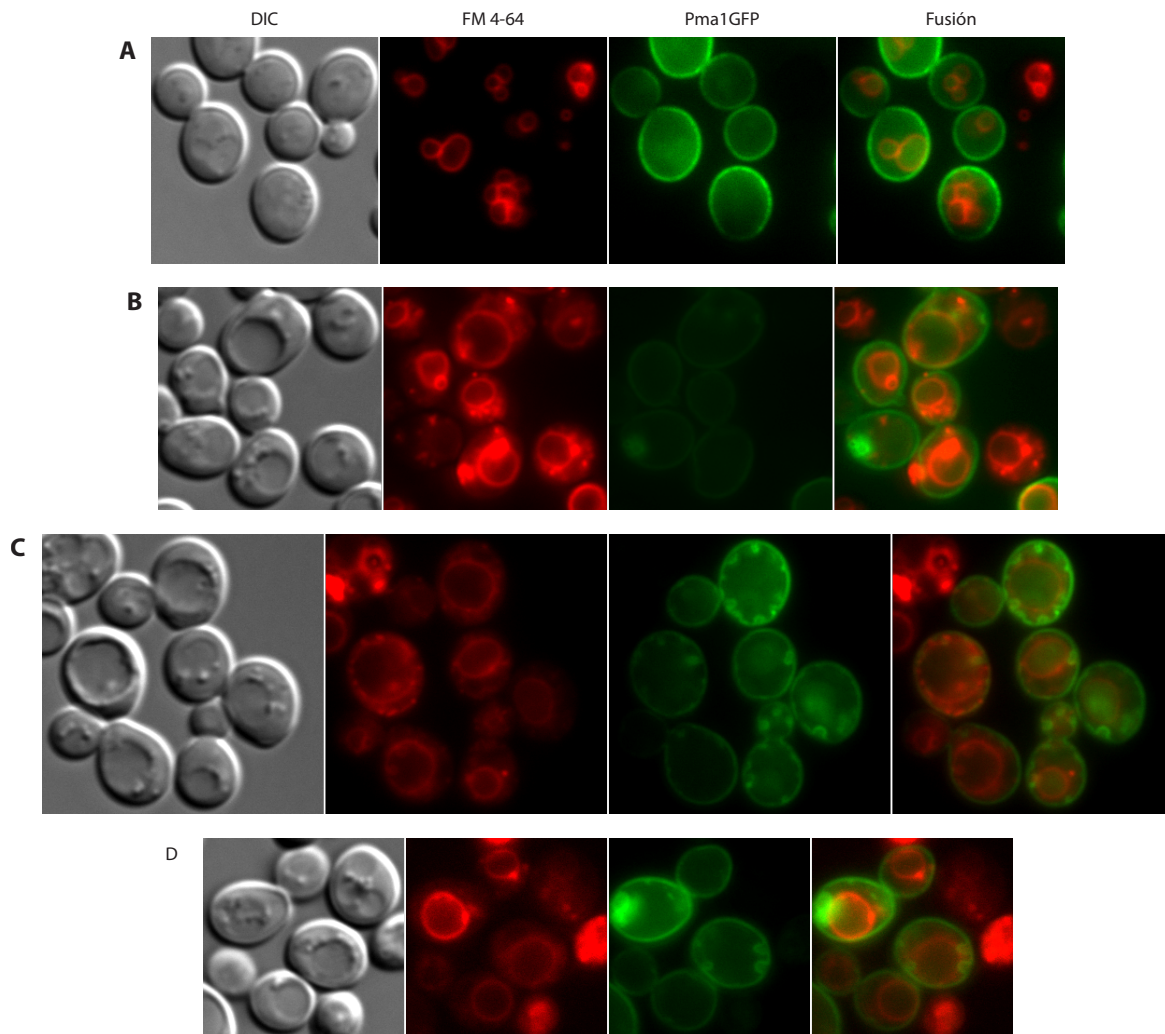


Ilustración 44: internalización de FM 4-64 a la vacuola en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX. **A:** control. **B:** edelfosina 10 μM 4 h. **C:** miltefosina 10 μM 4 h. **D:** perifosina 10 μM 4 h.

Mitocondria y toxicidad de ATLs

Papel de la fosforilación oxidativa en la respuesta a ATLs

Genes de la fosforilación oxidativa mitocondrial implicados en la toxicidad a edelfosina

Dentro de los mutantes en genes mitocondriales identificados en el *screening* de resistencia a edelfosina se encontró un significativo enriquecimiento de la fosforilación oxidativa, indicativo de la importancia de este proceso para la toxicidad del compuesto. Un primer grupo recogió genes

de la síntesis de ubiquinona o coenzima Q, una molécula que participa en la cadena de transporte de electrones como intermediario entre los complejos I/II y la citocromo *c* reductasa (complejo III). En la primera fase de la síntesis de ubiquinona se une al ácido 4-hidroxibenzoico una cadena terpenoide. El metabolismo de esteroides proporciona esa cadena y los genes implicados (*ERG13*, *ERG12*, *ERG8*, *ERG19* y *ERG20*), que son esenciales, no se encontraron disponibles en la colección de mutantes haploides. En una segunda fase participan exclusivamente genes específicos de la síntesis de ubiquinona (genes COQ). Se cree que esta fase consta de 7 pasos, aunque no se han identificado todos los genes que los catalizan³⁷². Se identificaron en el *screening* cuatro genes COQ tan sólo: *COQ3*, *COQ6*, *COQ7/CAT5* y *COQ9*. Sin embargo, su delección (o la de *COQ4*) provoca una bajada de la expresión del resto de genes COQ³⁷³, lo que podría indicar una relación funcional más estrecha. Otro componente de la cadena de transporte de electrones identificado en el *screening* fue el citocromo *c*₁ (*CYT1*), del núcleo catalítico del complejo III.

Los componentes de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) cuya delección provocó resistencia a edelfosina tienen diversas funciones: se identificaron genes implicados en la traducción del complejo (*MSS51*³⁷⁴, *PET122*³⁷⁵), ensamblaje del mismo (*COX6*²⁹², *COX16*³⁷⁶) o transporte del cobre necesario para el funcionamiento del complejo (*COX19*³⁷⁷, *COX23*³⁷⁸). No obstante, no se comprobó la resistencia de los mutantes en las subunidades catalíticas (*COX1*, *COX2* y *COX3*) al estar codificadas por genes mitocondriales²⁹².

El grupo de genes de la fosforilación oxidativa más abundante del *screening* se correspondió a subunidades de la F₀F₁-ATP sintasa mitocondrial. Se identificaron 6 subunidades de la ATP sintasa (*ATP4*, *ATP5*, *ATP7*, *ATP14*, *ATP18*, *ATP20*), un regulador (*INH1*) y 3 proteínas adicionales implicadas en el ensamblaje de la misma (*AEP2*, *ATP23*, *ATP25*). La ATP sintasa se compone de dos complejos, F₁ y F₀. Los mutantes del complejo F₁ no presentaron resistencia a edelfosina. En el complejo F₀, tres genes están codificados en el genoma mitocondrial y por tanto no fueron examinados en el *screening*. Se observó resistencia en los mutantes de todos los genes del estátor que une los complejos F₀ y F₁, así como en varias subunidades localizadas en la membrana (tabla 2).

Diferencias en la incidencia de la fosforilación oxidativa en la toxicidad de edelfosina y miltefosina

Es necesario explicar en este punto el criterio seguido a la hora de clasificar funcionalmente los genes mitocondriales identificados en el *screening* de resistencia, que en algunos casos podían interpretarse como pertenecientes a más de una categoría. Los genes de las subcategorías *Mantenimiento de la morfología mitocondrial* y *Fosforilación oxidativa* se englobaron en la categoría *Mitocondria* (las categorías definitivas en que se englobaron los genes se recogen en la ilustración 23 A). Por otra parte, genes de las subcategorías *Síntesis proteica mitocondrial* (fundamentalmente

Tabla 2: subunidades de la F₀F₁-ATP sintasa y resistencia de sus mutantes a edelfosina. Información adaptada de Jonckheere *et al*, 2012²⁹¹.

| Complejo ATPasa | Subunidad | Gen | Genoma | Resistencia |
|---|-----------|-------|--------------|-------------|
| F ₁ | α | ATP1 | nuclear | NO |
| | β | ATP2 | nuclear | NO |
| | γ | ATP3 | nuclear | NO |
| | δ | ATP16 | nuclear | NO |
| | ε | ATP15 | nuclear | NO |
| F ₀ – estátor | B | ATP4 | nuclear | SÍ |
| | OSCP | ATP5 | nuclear | SÍ |
| | D | ATP7 | nuclear | SÍ |
| F ₀ – Proteínas de la membrana | H | ATP14 | nuclear | SÍ |
| | F | ATP17 | nuclear | NO |
| | I/J | ATP18 | nuclear | SÍ |
| | K | ATP19 | nuclear | NO |
| | G | ATP20 | nuclear | SÍ |
| | E | TIM11 | nuclear | NO |
| | C | OLI1 | mitocondrial | ? |
| | A | ATP6 | mitocondrial | ? |
| | 8 | ATP8 | mitocondrial | ? |

subunidades del ribosoma mitocondrial y de la maquinaria de transcripción del orgánulo) y *Mantenimiento y reparación del ADN mitocondrial* se agruparon en las categorías *Síntesis proteica* y *Mantenimiento y reparación del ADN* respectivamente, junto con genes no mitocondriales. En los primeros dos casos se consideró que todos los procesos biológicos de la mitocondria contribuyen globalmente a la función del orgánulo, por lo que cabía considerar una función *Mitocondria*, más aun cuando el enriquecimiento en estos genes era notable. La pérdida de función en los genes de *Síntesis proteica* y *Mantenimiento y reparación del ADN*, según la interpretación dada en este trabajo, podría afectar otros genes que, a su vez, fueran los responsables del fenotipo observado. Esta interpretación sería válida para todos los genes, mitocondriales o no, por lo que se decidió agrupar los genes en dichas categorías sin tener en cuenta la localización celular donde actúan. A pesar de esta diferencia de criterio todos los procesos biológicos que tienen lugar en la mitocondria colaboran e influyen en el funcionamiento de la misma, por lo que el análisis aquí presentado los tuvo en cuenta, con independencia de su clasificación funcional.

Tabla 3: genes mitocondriales identificados en el *screening* de resistencia a edelfosina. CR: crecimiento respiratorio. CTE: cadena de transporte de electrones. Sí.: síntesis. ADN_{mit}: ADN mitocondrial.

| Gen | Rol celular | CR | Gen | Rol celular | CR |
|------|--------------------|---------|------|---------------|----------|
| ALO1 | Respuesta a estrés | | ADH3 | Bioenergética | |
| PET8 | Transportador | ausente | PKP2 | Bioenergética | |
| POR1 | Transportador | ausente | PPA2 | Bioenergética | reducido |

| Gen | Rol celular | CR | Gen | Rol celular | CR |
|----------------|--|----------|--------|---------------------------|----------|
| COX16 | CTE - Cit. c oxidasa | ausente | IFM1 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| COX19 | CTE - Cit. c oxidasa | ausente | IMG2 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| COX23 | CTE - Cit. c oxidasa | ausente | MRP20 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| COX6 | CTE - Cit. c oxidasa | ausente | MRP21 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| MSS51 | CTE - Cit. c oxidasa | ausente | MRP7 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| PET122 | CTE - Cit. c oxidasa | ausente | MRPL10 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| CYT1 | CTE | ausente | MRPL11 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| AEP2 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | MRPL15 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP14 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | MRPL33 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP18 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | MRPL35 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP20 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | reducido | MRPL38 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP23 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | MRPS8 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP25 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | MSF1 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP4 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | MSR1 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP5 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | MSY1 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| ATP7 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | ausente | RSM19 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| INH1 | CTE - F ₀ F ₁ -ATP sintasa | | RSM25 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| CAT5 (COQ7) | CTE - Sín. de ubiquinona | ausente | RSM7 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| COQ3 | CTE - Sín. de ubiquinona | ausente | SLM3 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| COQ6 | CTE - Sín. de ubiquinona | ausente | TUF1 | Sín. proteica y ribosomas | ausente |
| COQ9 | CTE - Sín. de ubiquinona | ausente | APJ1 | Maduración proteica | |
| HMI1 | Mantenimiento del ADN _{mit} | reducido | CPR3 | Maduración proteica | |
| MGM101 | Mantenimiento del ADN _{mit} | ausente | YTA12 | Maduración proteica | ausente |
| MSH1 | Mantenimiento del ADN _{mit} | ausente | ISC1 | Señalización | reducido |
| RRG1 | Mantenimiento del ADN _{mit} | ausente | MKS1 | Señalización | |
| RRG9 | Mantenimiento del ADN _{mit} | ausente | MSB1 | Señalización | reducido |
| DNM1 | Morfología mitocondrial | | PTC7 | Señalización | |
| GEM1 | Morfología mitocondrial | reducido | MTF1 | Transcripción | ausente |
| MDM38 | Morfología mitocondrial | ausente | RPO41 | Transcripción | ausente |
| PTC6 (AUP1) | Morfología mitocondrial | | AIM10 | Desconocido | ausente |
| UTH1 | Morfología mitocondrial | reducido | AIM25 | Desconocido | |
| CBS2 | Sín. proteica y ribosomas | ausente | SOV1 | Desconocido | ausente |
| DIA4 | Sín. proteica y ribosomas | ausente | YLH47 | Desconocido | |

Se identificaron en el *screening* de resistencia a edelfosina un total de 72 genes con función en la mitocondria (resumidos en la tabla 3, descripción completa en la tabla supl. 1), correspondientes a un 27,48% del total. De esos 72 genes, 40 (un 15,27% del total) fueron clasificados en la categoría *Mitocondria*, mientras que los otros 32 genes participaban en transcripción, síntesis y maduración de proteínas o mantenimiento del ADN mitocondrial. La alta incidencia de los mutantes de mitocondria indicó que el orgánulo participa en la toxicidad por edelfosina. Todos los procesos mencionados colaboran en el mantenimiento de la función mitocondrial, por lo que se comprobó el fenotipo

de crecimiento respiratorio (crecimiento en presencia de una fuente de carbono no fermentable, dependiente por tanto de la respiración) descrito para estos 72 mutantes en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae*. 60 de los 72 mutantes presentan reducción o ausencia de crecimiento. De los 21 mutantes de la *Fosforilación oxidativa*, que cabría esperarse tuvieran una afectación más clara, 20 presentaron este fenotipo. Dentro de los procesos mitocondriales la respiración parece ser fundamental para la toxicidad por edelfosina.

La incidencia de los genes mitocondriales en el *screening* de resistencia a miltefosina fue comparativamente menor, identificándose 21 genes con función mitocondrial, un 8,17% del total (siguiendo el mismo criterio que para la edelfosina, para la clasificación en la categoría *Mitocondria* se excluyeron los genes implicados en transcripción, síntesis y maduración de proteínas o mantenimiento del ADN mitocondrial, siendo tan solo 17 genes, el 6,61% del total, como muestra la ilustración 23 C). Únicamente 7 presentaron un fenotipo de crecimiento respiratorio reducido, un resultado coherente con el bajo número de los genes que participan directamente en la respiración (*EMI5*, *FMP25* y *ATP20*). Por tanto, ni la mitocondria ni concretamente la respiración parecen procesos centrales en el mecanismo de toxicidad de miltefosina. Sólo 4 mutantes fueron comunes en los conjuntos de resistentes a edelfosina y miltefosina –*UTH1*, *ISC1*, *DNM1* y *ATP20*–, con funciones muy diversas: metabolismo de esfingolípidos, morfología mitocondrial (2) y fosforilación oxidativa. No hubo ninguna indicación clara de una función mitocondrial compartida en los procesos de toxicidad de edelfosina y miltefosina.

Resistencia a ATLs de células ρ^-

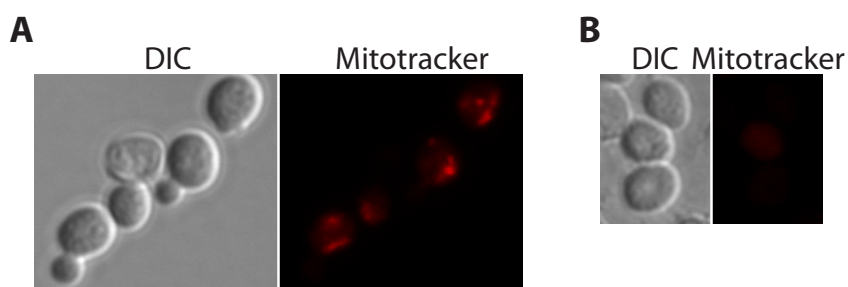


Ilustración 45: incorporación de Mitotracker en cultivos celulares en YPAD líquido. **A:** células WT. **B:** células ρ^- .

Dada la aparente importancia que tiene en la toxicidad de edelfosina –pero no en la de miltefosina– la respiración, se decidió estudiar con detalle la participación del proceso en células tratadas con ATLs. Se generó una cepa ρ^- , con una pérdida del ADN mitocondrial suficiente para impedir dicho proceso. Las mitocondrias de estas células no pueden realizar la fosforilación oxidativa, lo que se comprobó mediante tinción con Mitotracker Red CMXRos, un fluoróforo cuya incorporación a la mitocondria depende de la presencia de un potencial en el orgánulo (ilustración 45). Como consecuencia de los

defectos en la respiración, sólo pueden obtener energía de fuentes de carbono fermentables, y se comprobó también su incapacidad de crecer en medio de cultivo con glicerol (YPAGI).

Se comparó el crecimiento de las cepas ρ^- y WT en medio líquido (ilustración 46) y en sólido (ilustración 47). En medio líquido se observó una inhibición del crecimiento dosis-dependiente provocada por la edelfosina en la cepa WT (ilustración 46 A). Tal inhibición no se observó en la cepa ρ^- , que fue capaz de crecer en presencia de hasta 30 μM de edelfosina (ilustración 46 B). Sí se observó un retraso inicial del crecimiento a concentraciones mayores que 2 μM (ilustración 46 B, 8 h). A concentraciones tan elevadas como 30 μM de edelfosina sí se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células ρ^- aunque bastante reducido (ilustración 46 B, 24 h). Por el contrario,

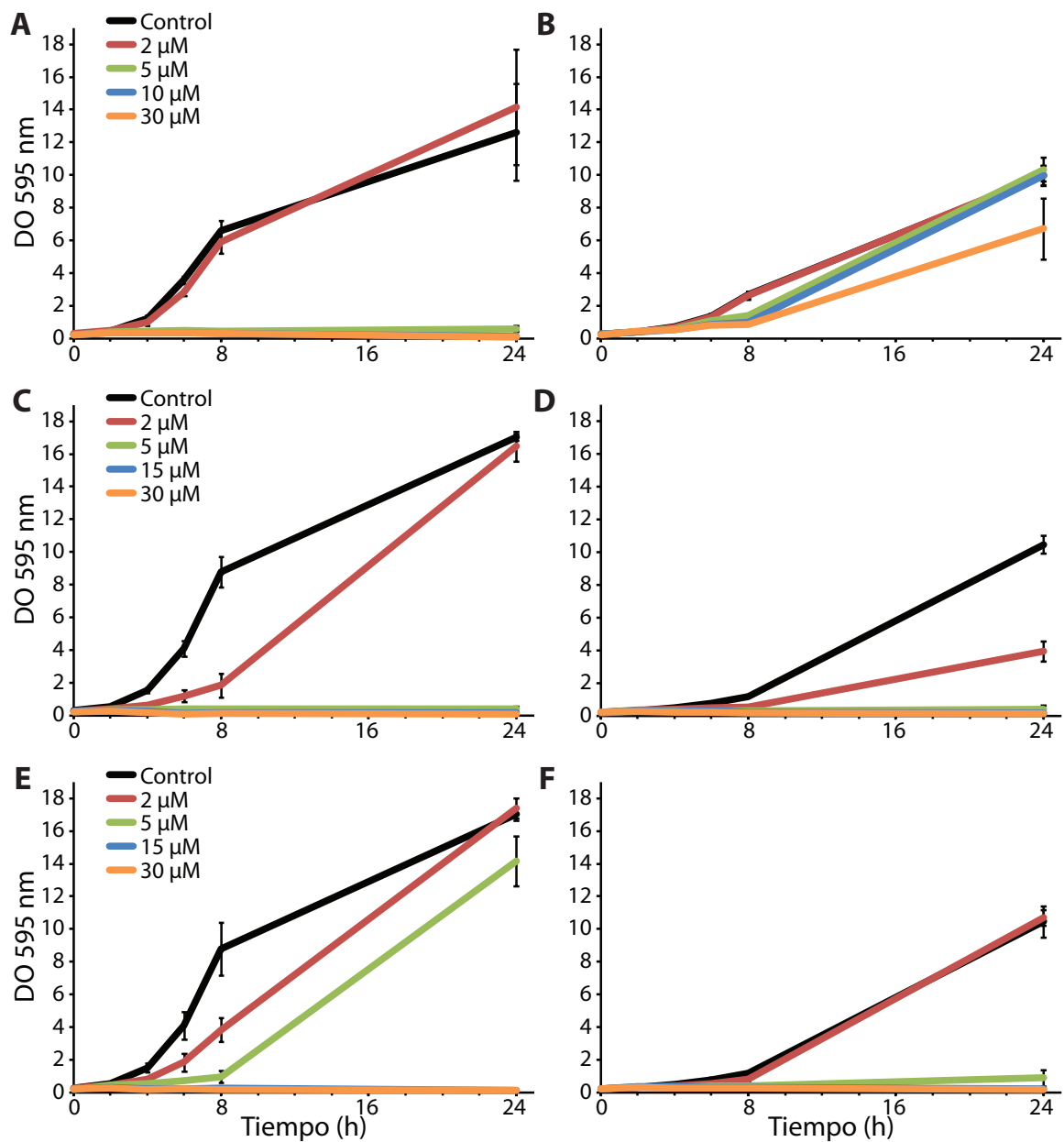


Ilustración 46: crecimiento de la cepa ρ^- en medio líquido en presencia de ATIs. A, B: Tratamiento con edelfosina. C, D: tratamiento con miltefosina. E, F: tratamiento con perifosina. Se comparó el crecimiento en la cepa WT (A, C, E) y la cepa ρ^- (B, D, F) para cada compuesto. Media de 3 experimentos \pm EEM.

las concentraciones de miltefosina y perifosina capaces de inhibir el crecimiento de las células WT (ilustración 46 C y E, respectivamente) también inhibieron el crecimiento en la cepa ρ^- (ilustración 46 D y F). Por tanto la respuesta de las células ρ^- a los compuestos es una diferencia fundamental entre la edelfosina y los otros dos ATLs.

Los estudios en medio sólido se realizaron con la cepa ρ^- junto con la cepa WT como control positivo de sensibilidad y el mutante resistente *lem3Δ* como control negativo. Las concentraciones de edelfosina capaces de inhibir el crecimiento de la cepa WT no afectaron sin embargo a las células ρ^- , que crecieron tanto como el control negativo que no incorpora el fármaco (ilustración 47 A). En los tratamientos de miltefosina y perifosina, por el contrario, la cepa ρ^- se comportó como el WT (ilustración 47 B-C). Los resultados refrendaron por tanto que la edelfosina precisa de una respiración mitocondrial funcional para ejercer su toxicidad, mientras que la miltefosina y la perifosina actúan con independencia de este proceso.

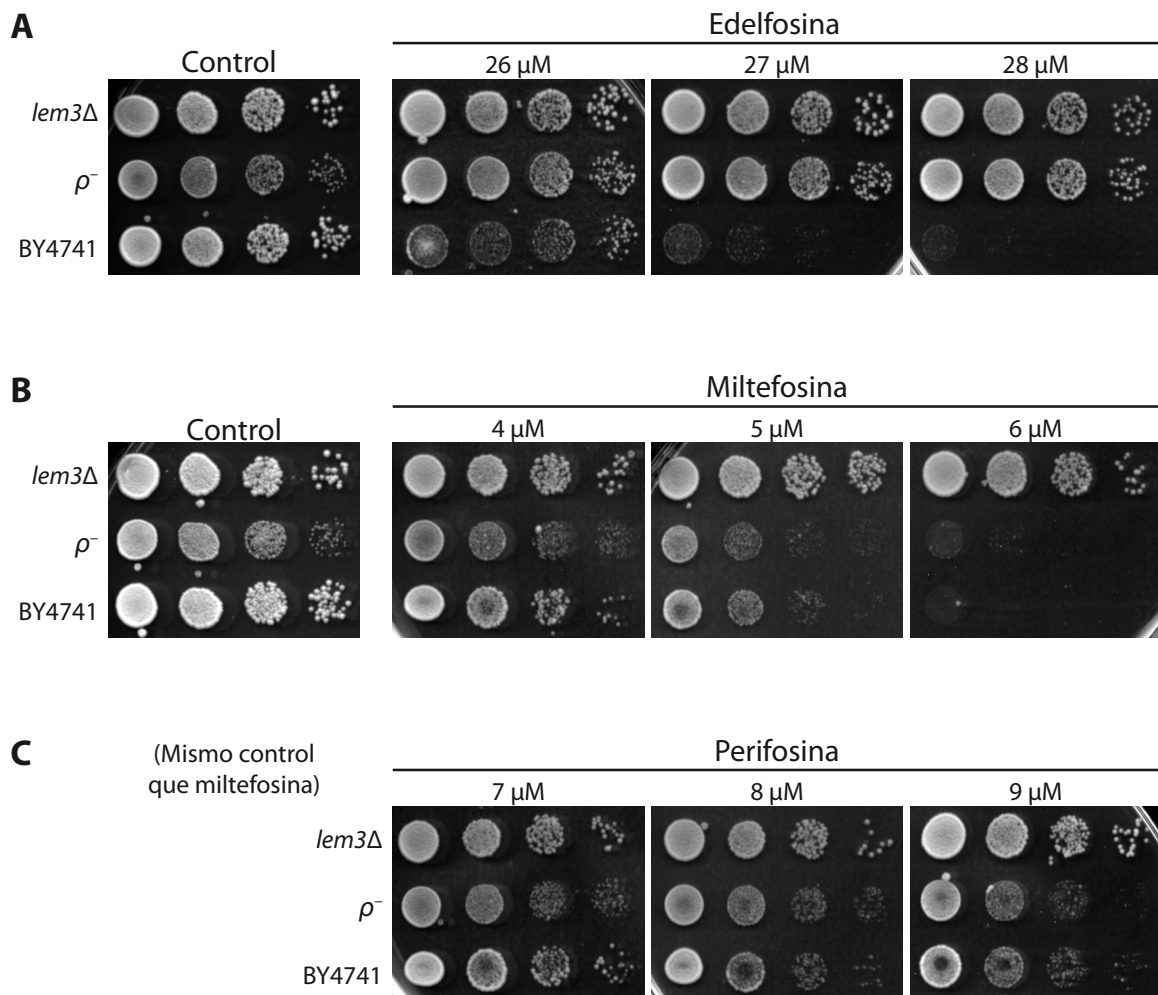


Ilustración 47: crecimiento de la cepa ρ^- en medio sólido en presencia de ATLs. **A:** Tratamiento con edelfosina. **B:** Tratamiento con miltefosina. **C:** Tratamiento con perifosina (el control es el mismo que en miltefosina, la primera imagen del panel B).

Influencia de la fuente de carbono en la toxicidad por ATLs

Se puede estudiar el papel de la mitocondria en el mecanismo de acción de los ATLs mediante el enfoque opuesto, es decir, incrementando la función mitocondrial. *Saccharomyces cerevisiae* obtiene energía preferentemente de la fermentación si se le suministra una fuente de carbono como la glucosa. En este caso la respiración se reprime, disminuyendo el potencial transmembrana mitocondrial y también el número y tamaño de las mitocondrias^{271,273,274}. Por el contrario, la energía obtenida de fuentes de carbono no fermentables como el glicerol procede exclusivamente de la respiración, y promueven un aumento del número y función mitocondrial. Se observó la sensibilidad a distintos ATLs en medio sólido con glucosa (preferentemente fermentativo) o con glicerol como única fuente de carbono (obligatoriamente respiratorio), observando simultáneamente la cepa WT y el mutante *lem3Δ* como control negativo. El crecimiento permitido por el medio con glicerol fue más lento, requiriéndose de 24 horas más que en el medio con glucosa para alcanzarse un crecimiento comparable. 14 μM de edelfosina fue suficiente para inhibir el crecimiento de las células WT en medio sólido glicerol, mientras que en medio con glucosa las células no se vieron afectadas (ilustración 48 B). El resultado encajó con las observaciones de la cepa ρ^- : si el ATL actúa a través de la mitocondria, se esperaría un incremento de la sensibilidad en un medio que favoreciera la respiración. Por tanto se confirmó el papel central de la mitocondria en el mecanismo de acción de la edelfosina: la toxicidad se evita con la pérdida del orgánulo y se incrementa al aumentar la respiración. Sin embargo, también se observó una mayor sensibilidad en presencia de glicerol a 2,5 μM de miltefosina y 6 μM de perifosina (ilustración 48 C-D). Si bien la participación de la mitocondria no es esencial en el mecanismo de acción de estos ATLs, el resultado sugiere que el orgánulo puede participar en algún proceso del mecanismo y aumentar así la respuesta citotóxica.

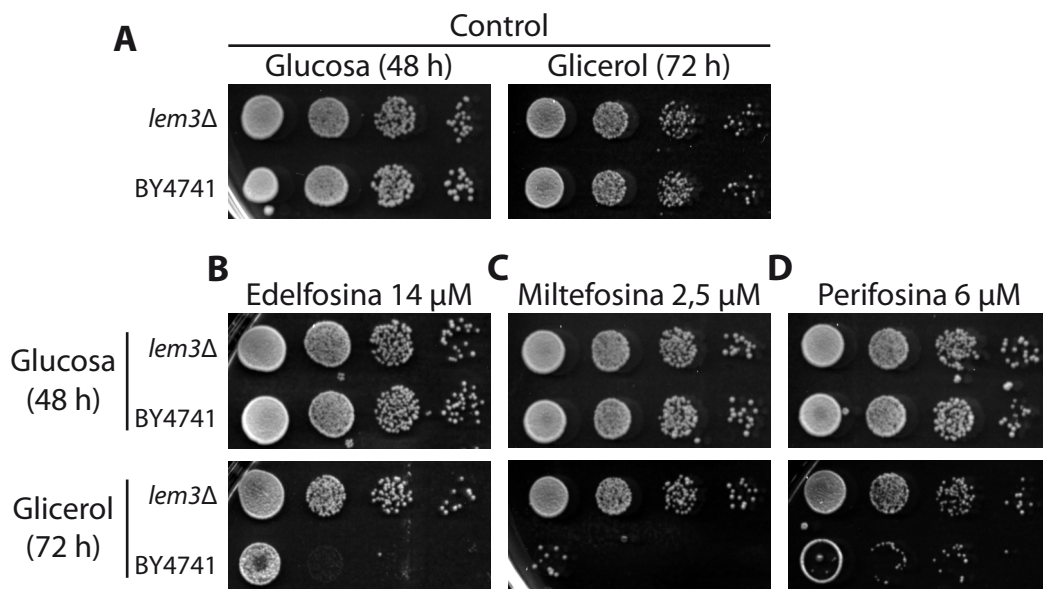


Ilustración 48: influencia de la fuente de carbono en la toxicidad por ATLs. Crecimiento, con glucosa o glicerol como única fuente de carbono, en medio sólido control (A) o tratado con edelfosina (B), miltefosina (C) o perifosina (D).

Estrés oxidativo durante el tratamiento con ATLS

El nexo entre la mitocondria y el proceso de toxicidad inducido por ATLS podría ser las especies reactivas de oxígeno (ROS). Una de las fuentes principales de estas moléculas es el transporte de electrones que sucede en la mitocondria. Las ROS pueden aparecer en diversos procesos celulares, produciéndose un estrés oxidativo cuando la cantidad de ROS generada sobrepasa los mecanismos de homeostasis *redox* de la célula. Se ha propuesto que el estrés oxidativo juega un papel central en múltiples procesos: toxicidad³⁷⁹, respuesta a estrés^{380,381}, muerte celular programada^{314,382} y envejecimiento^{383,384}. La magnitud de la producción de ROS determina en gran medida su efecto en la célula, donde pueden actuar en rutas de señalización, pero también provocar daño celular al reaccionar con ácidos nucleicos, proteínas y lípidos.

Se estudió el estrés oxidativo en células tratadas con ATLS empleando dihidroetidio (DHE) para la detección de ROS. El DHE es un compuesto neutro, permeable a las membranas celulares y de fluorescencia azul, mientras que su forma oxidada (etidio) emite fluorescencia roja y está cargado positivamente; por tanto, no sólo queda retenido dentro de la célula, sino que además se intercala en los ácidos nucleicos, lo que incrementa su fluorescencia³⁸⁵. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es una ROS que se origina en la cadena de transporte de electrones mitocondrial³⁸⁶ y que genera, mediante sucesivas reacciones, otras ROS (H_2O_2 , $HO\cdot$). El superóxido es también capaz de oxidar el DHE³⁸⁷, por lo que la aparición de la fluorescencia roja del etidio se puede asociar al estrés oxidativo celular. Tras la tinción con DHE se observaron por citometría de flujo (FACS) las distintas poblaciones diferenciadas por su nivel de estrés oxidativo. Para determinar las condiciones óptimas para el ensayo se emplearon células sin tratar como control negativo y células tratadas con 10 mM H_2O_2 como control positivo. Ambos tratamientos generaron poblaciones únicas distinguibles como picos separados en el histograma de fluorescencia (ilustración 49 A), y un tratamiento prolongado (6 h) de edelfosina generó también un pico único en el histograma, en la proximidad del observado en el tratamiento con H_2O_2 .

Los controles sin tratar presentaron una única población de baja fluorescencia de DHE (células DHE⁻). En los histogramas de las células WT tratadas con ATLS (ilustración 49 B-D) apareció una segunda población con mayor fluorescencia que las células control (células DHE⁺) cuyo número de células crecía durante el tratamiento. Por tanto, los ATLS provocan estrés oxidativo y la prevalencia de dicho fenotipo es proporcional al tiempo de tratamiento. El comportamiento de los ATLS ensayados no fue idéntico. Las células DHE⁺ aumentaron progresivamente con 10 μ M edelfosina (ilustración 49 B), siendo tras 90 minutos el 49% del total y llegando a 77% tras 4 horas (ilustración 50 A). El aumento fue mucho más lento con 10 μ M de miltefosina (ilustración 49 C), alcanzando tras 4 horas un máximo de sólo 41% (ilustración 50 B). Por el contrario, 10 μ M de perifosina indujeron estrés oxidativo en la gran mayoría de las células muy rápido (ilustración 49 D), alcanzándose un 96% de células DHE⁺ tras tan sólo 45 minutos de tratamiento (ilustración 50 C). Se empleó en el experimento la misma concentración de los tres ATLS, que tienen distintas eficacias, y el estrés provocado por

el compuesto más eficaz (miltefosina) fue sin embargo menor. Esto fue indicativo de que el estrés oxidativo tiene papeles y pesos distintos en el mecanismo de toxicidad de los tres ATLS.

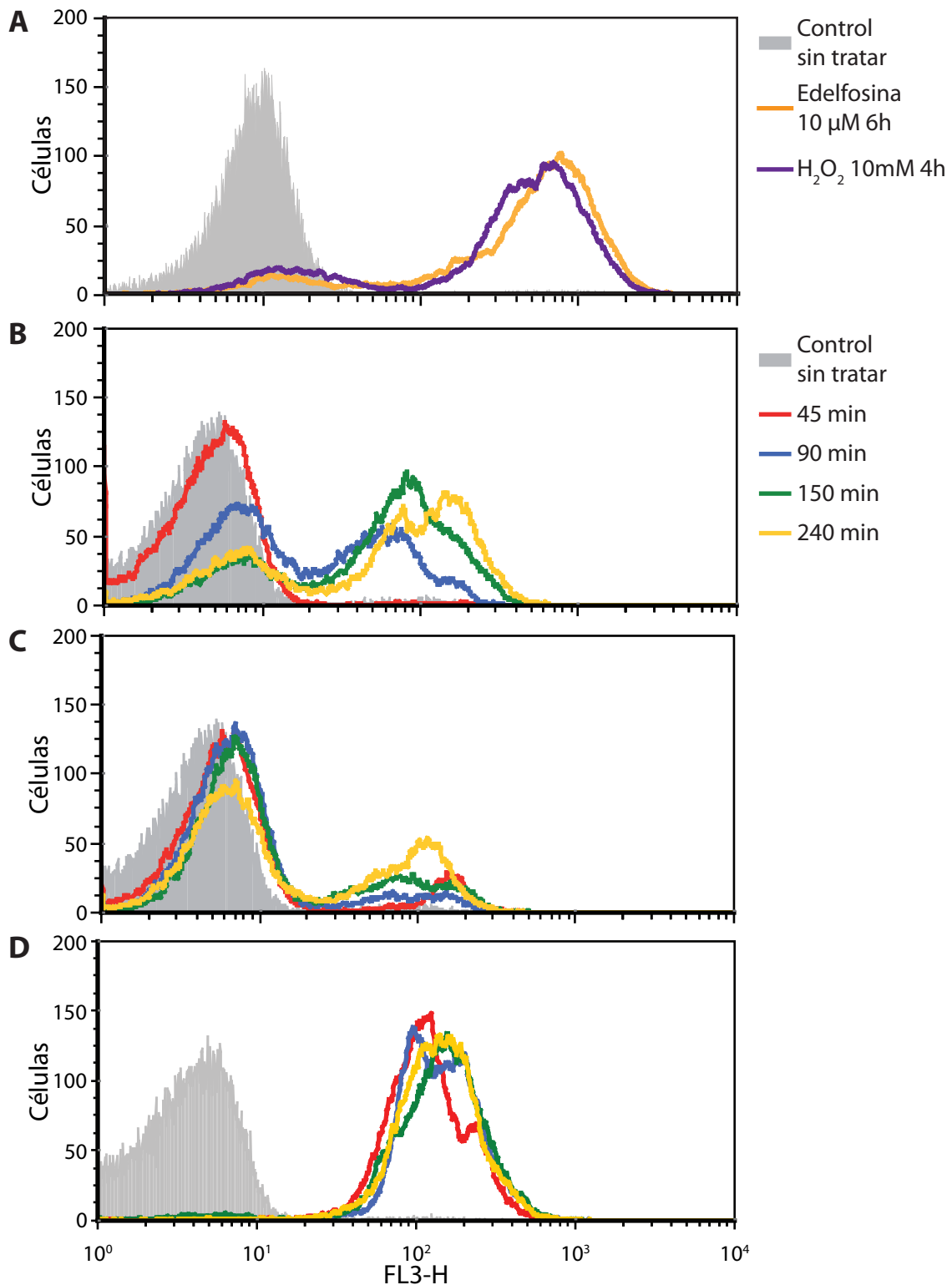


Ilustración 49: estrés oxidativo en células WT tratadas con ATLS. Histogramas de fluorescencia de células teñidas con DHE. A: determinación de las condiciones con células control y tratadas con H_2O_2 y edelfosina. B: células tratadas con edelfosina 10 μ M. C: células tratadas con miltefosina 10 μ M. D: células tratadas con perifosina 10 μ M. FL3-H: amplitud de la señal de fluorescencia en el canal rojo (unidades arbitrarias).

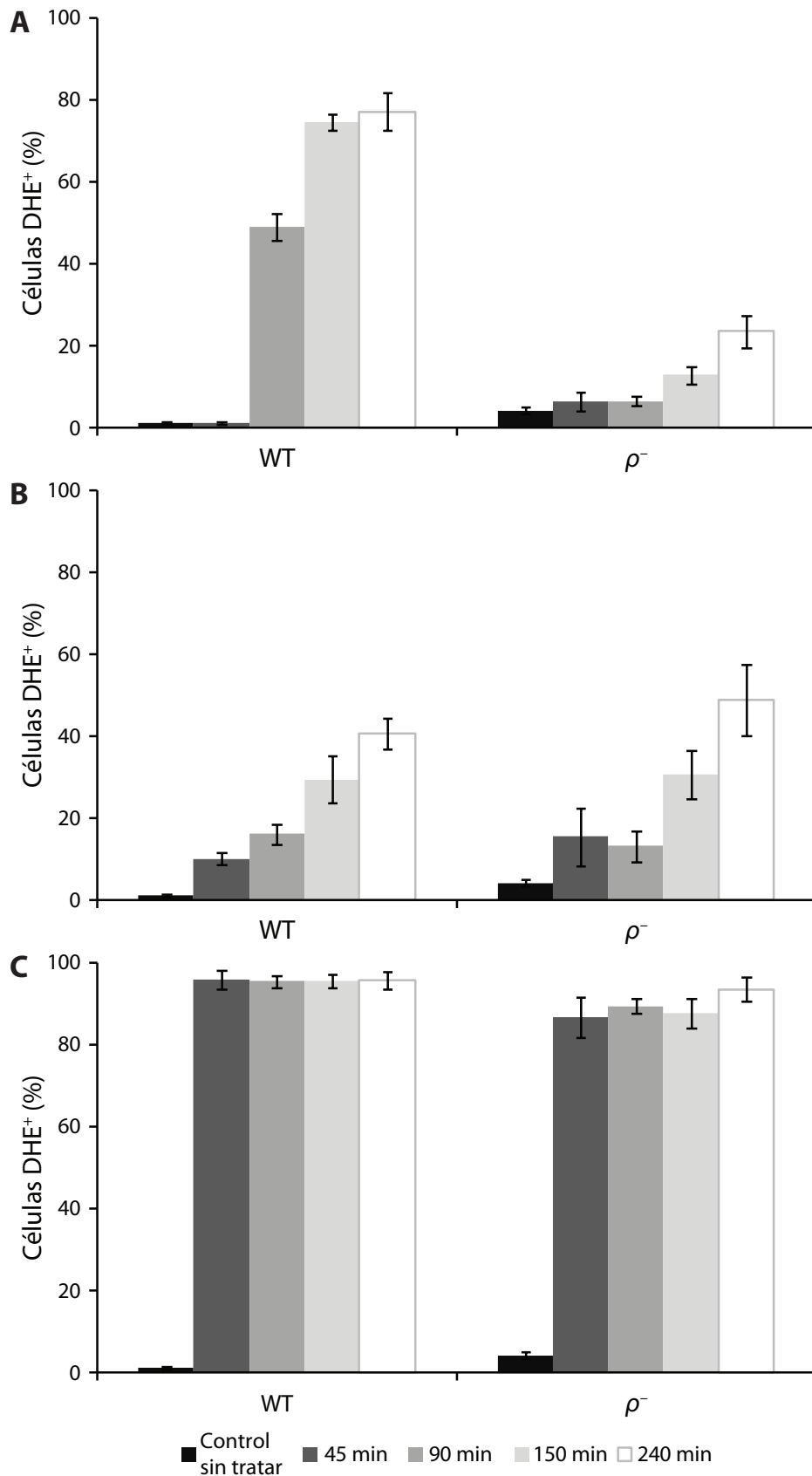


Ilustración 50: estrés oxidativo por tratamiento con ATLs, células WT y ρ^- . Cuantificación del número de células DHE⁺ (células con una tinción de DHE mayor que el control sin tratar) en tratamiento con 10 μ M edelfosina (A), 10 μ M miltefosina (B) y 10 μ M perifosina (C). Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm EEM.

Origen mitocondrial del estrés oxidativo

Paralelamente se estudió la generación de ROS en la cepa ρ^- para determinar si tenían su origen en la respiración mitocondrial. Nuevamente los tres ATLs se comportaron de maneras muy distintas. Las células DHE⁺ producidas por la edelfosina se redujeron significativamente en la cepa ρ^- (ilustración 50 A). Aunque esto indicaba un papel fundamental de la mitocondria en la generación de las ROS por edelfosina, los niveles no se redujeron completamente, por lo que cabe suponer que hay otras fuentes adicionales. Por el contrario, la miltefosina y la perifosina provocaron un estrés oxidativo semejante en células ρ^- y en células WT (ilustración 50 B, C), lo que sugirió un origen no mitocondrial de las ROS generados por estos compuestos.

Naturaleza del estrés oxidativo y relevancia para la toxicidad

Una vez demostrado que los ATLs provocan estrés oxidativo se buscó confirmar si dicho estrés intervenía directamente en la inhibición del crecimiento por estos compuestos. De ser así se esperaría una correlación entre dos magnitudes, estrés oxidativo y toxicidad: las células sin tratar no producirían ROS y serían viables, los tratamientos con ATLs provocarían ROS y la consiguiente toxicidad, y en este último caso se lograría disminuir la toxicidad celular disminuyendo los ROS. Para contrarrestar el estrés oxidativo se emplearon antioxidantes, compuestos capaces de reaccionar con las ROS, reducirlas (oxidándose a su vez) y generar una molécula con menor reactividad que la especie inicial³⁸⁸. Tras una preincubación de una hora con el antioxidante, se añadió el ATL y se monitorizó tanto el crecimiento (a lo largo de 24 horas, ilustración 51 A) como la generación de ROS, (únicamente en el punto de 4 horas de cotratamiento antioxidante-ATL, ilustración 52). En ausencia de antioxidante, el porcentaje de células DHE⁺ de los controles sin tratar fue cercano a 0. Semejantes porcentajes se observaron en todos los controles sin ATL a los que se les añadió un antioxidante (ilustración 51 A, barras *Control*), lo que indica que por sí mismos ninguno de los antioxidantes empleados provocaba cambios en el estado *redox* basal de las células. En ausencia de antioxidante, los tratamientos (ilustración 51 A, (-), barras *ATL*) con edelfosina y perifosina resultaron en cerca del 80% de células DHE⁺, mientras que con miltefosina las proporción de células DHE⁺ fue mucho menor. Estos resultados fueron semejantes a los anteriormente observados (ilustración 50).

Se emplearon en primer lugar tres antioxidantes hidrosolubles: N-acetilcisteína (NAC), la forma reducida del glutatión (GSH) y vitamina C o ácido ascórbico (Asc). Sorprendentemente, ninguno de los tres tuvo una eficacia completa. Se emplearon concentraciones cada vez más elevadas en sucesivos experimentos, hasta un máximo de 20 mM, sin observarse en ningún caso toxicidad en las células control (ilustración 52 B-C). Estas elevadas concentraciones de antioxidante permitieron tan sólo reducciones modestas del estrés oxidativo. En los tratamientos con edelfosina hubo alrededor de un 60% de células DHE⁺, mientras que en los tratamientos con perifosina la eficacia de los antioxidantes fue

algo mayor, con cerca de 40% de células DHE⁺ (ilustración 51 A). Los tratamientos con N-acetilcisteína o ácido ascórbico tampoco revertieron la toxicidad causada por los ATLS (ilustración 52 A-C). Estos resultados contrastan con la eficacia en ambos aspectos que estos antioxidantes demostraron frente al estrés oxidativo generado por otras condiciones^{379,389-392}. La persistencia de la toxicidad por ATLS en células tratadas con antioxidantes hidrosolubles podría deberse a que no hay relación entre estrés oxidativo y toxicidad. En este caso, las ROS observadas serían un fenómeno secundario y no esencial en el mecanismo de toxicidad de ATLS. Cabe sin embargo una alternativa: que la reducción del estrés oxidativo resultara insuficiente para evitar completamente la toxicidad. Los resultados con estos tres antioxidantes no permiten por tanto confirmar ni rechazar la hipótesis de que la toxicidad por ATLS esté mediada por las ROS producidas.

Dada la poca eficacia mostrada por los tres antioxidantes hidrosolubles, se decidió repetir los experimentos empleando vitamina E (α -tocoferol, α TF), un potente antioxidante liposoluble. Una concentración de 50 μ M de α TF (dos órdenes de magnitud menor que la usada con los antioxidantes hidrosolubles) llevó a una reducción significativa de los ROS en tratamientos con edelfosina (datos no mostrados), y con 250 μ M de α TF la reducción fue prácticamente completa, y la cantidad de células DHE⁺, 5%, semejante al control sin tratar (ilustración 51 A). En presencia de α TF los análogos de edelfosina PTE-ET y Et-BDP-ET se incorporan a las células con un patrón de localización semejante al de las células WT (ilustración 51 B, C). Esto descarta que el antioxidante simplemente interaccione con los ATLS en el medio e impida su incorporación. El α TF permitió además la recuperación de la viabilidad, creciendo las células al mismo nivel que los controles sin tratar (ilustración 52 D). También redujo el estrés oxidativo en el tratamiento con miltefosina hasta el nivel del control, mientras que en el tratamiento con perifosina la reducción fue menor aunque significativa, bajando en este caso las células DHE⁺ al 25% (ilustración 51 A). Curiosamente no hubo un paralelismo perfecto entre reducción del estrés oxidativo e inhibición de la toxicidad por ATLS: la toxicidad de la miltefosina se mantuvo en presencia de α TF, que sin embargo sí redujo la toxicidad de perifosina, aunque parcialmente (ilustración 52 D). Por tanto, en el caso de la edelfosina y la perifosina la toxicidad celular si parece depender de la producción de ROS. El comportamiento de la miltefosina fue muy distinto: aunque el estrés oxidativo fue menor en presencia de α TF, la reducción del mismo no se acompañó de una inhibición de la toxicidad. Este comportamiento indica que las ROS no son fundamentales para la toxicidad por miltefosina.

El comportamiento marcadamente diferente de los antioxidantes hidrosolubles y el α TF liposoluble parecía indicar que las ROS tenían carácter lipofílico, o se encontraban en un compartimento de esa naturaleza. Otra alternativa sería que el α TF interfiriera en procesos distintos a la producción de ROS que a su vez mediaran la toxicidad celular. Tal interacción del α TF sería independiente de su naturaleza antioxidante, y se debería a otras propiedades de la molécula. Para contrastar esta hipótesis se emplearon otros compuestos con estructura y propiedades químicas muy

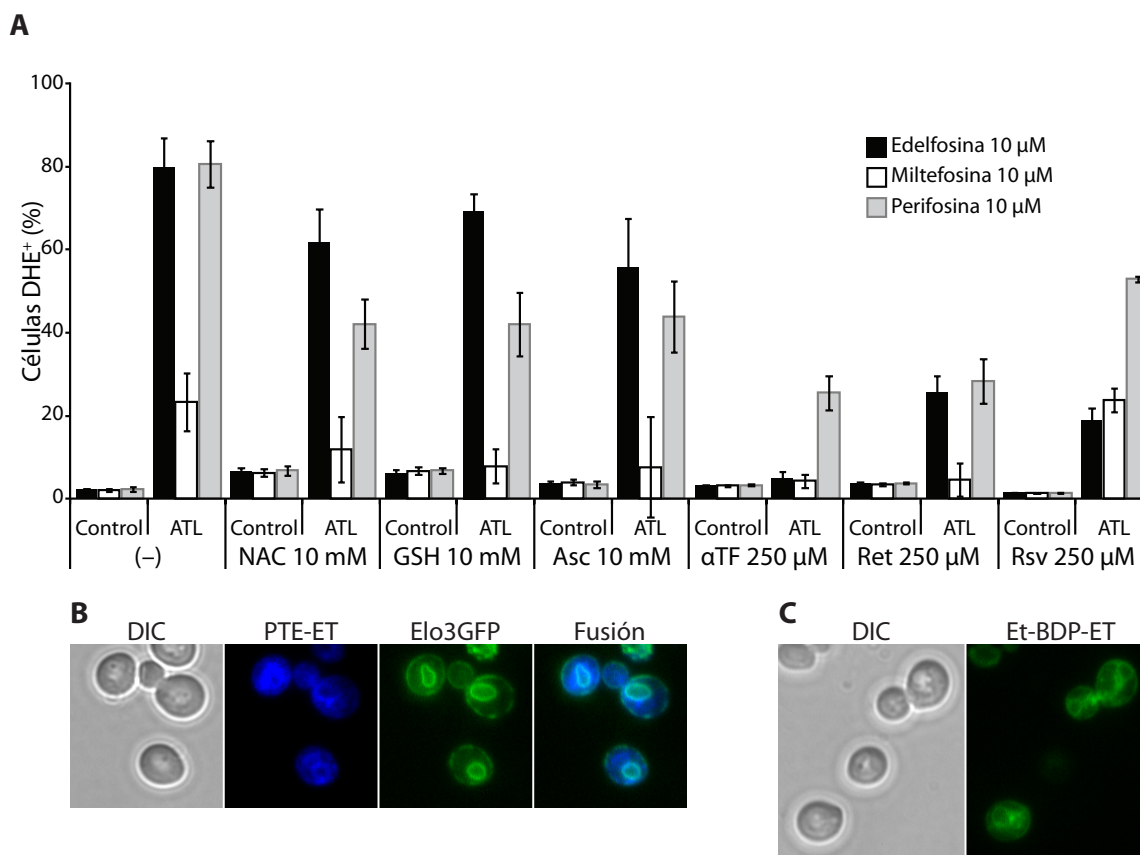


Ilustración 51: estrés oxidativo en cotratamientos antioxidante-ATL. **A:** cuantificación del número de células DHE⁺. NAC: N-acetilcisteína. GSH: glutatión reducido. Asc: ácido ascórbico. αTF: αtocoferol. Ret: ácido retinoico. Rsv: resveratrol. Promedio de 3 experimentos independientes ± EEM. **B:** localización del análogo de edelfosina PTE-ET (10 μM) en presencia de αTF. **C:** localización del análogo de edelfosina Et-BDP-ET (5 μM) en presencia de αTF.

distintas al αTF, pero que también fueran antioxidantes liposolubles. El ácido retinoico (Ret) fue tan eficaz como el αTF sólo en los tratamientos con miltefosina, mientras que en los tratamientos con edelfosina y perifosina redujo las células DHE⁺ a cerca del 25% (ilustración 51 A). Esta menor eficacia se asoció a una menor reducción de la toxicidad, permitiendo tan sólo el crecimiento de las células tratadas con edelfosina y sin alcanzar las tasas de crecimiento de los controles sin tratar (ilustración 52 E). El resveratrol (Rsv) fue ligeramente más eficaz frente al estrés oxidativo en los tratamientos con edelfosina, y considerablemente menos con miltefosina y perifosina (ilustración 51 A). Consecuentemente, también permitió el crecimiento únicamente de células tratadas con edelfosina (ilustración 52 F). Por tanto, antioxidantes liposolubles de muy distinta naturaleza fueron capaces de reducir el estrés oxidativo provocado por ATLs y evitar la toxicidad por edelfosina y, en menor medida, perifosina. Esto confirmó que el estrés oxidativo que media la toxicidad de edelfosina tiene naturaleza lipofílica. En este sentido se comprobó la eficacia de la hidroanisona butilada (BHA), un aditivo alimentario empleado para evitar la lipoperoxidación³⁹³. El BHA por sí sólo disminuyó la tasa de crecimiento de las células control; no obstante restauró el crecimiento en los tratamientos con edelfosina a las mismas tasas (ilustración 52 G). ROS de semejante naturaleza podrían además tener un papel en la toxicidad de perifosina; no obstante, la inhibición mucho más moderada de

la toxicidad por este fármaco podría indicar que el estrés oxidativo, aunque puede participar en la toxicidad, no es tan crítico.

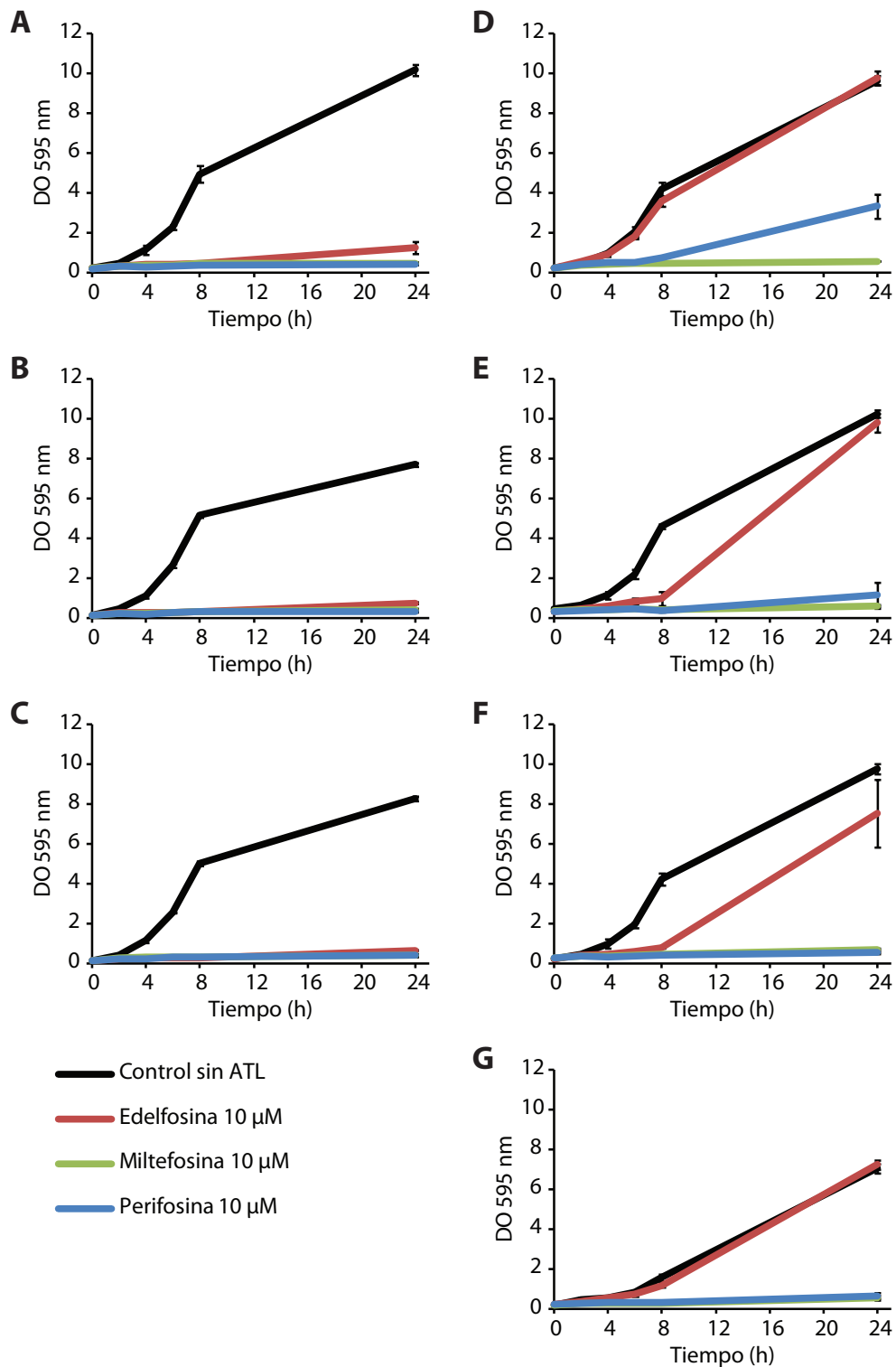


Ilustración 52: viabilidad celular en cotratamientos antioxidante-ATL. **A:** medio sin antioxidante. **B:** N-acetilcisteína 20 mM. **C:** ácido ascórbico 20 mM. **D:** α -tocoferol 250 μM . **E:** ácido retinoico 250 μM . **F:** resveratrol 250 μM . **G:** hidroanisona butilada 250 μM . Puntos de las curvas: promedio de 3 experimentos independientes \pm EEM.

Intervención de la cadena de transporte de electrones en el estrés oxidativo

El ADN_{mit} de *S. cerevisiae* codifica genes para tres de los complejos de la cadena de transporte de electrones. Su pérdida, en la cepa ρ^- , provoca una pérdida completa de la respiración celular; no obstante, es imposible asociar un fenotipo de la cepa a la pérdida de uno de los genes concretos. Para superar esta limitación y conocer más detalles del papel de la mitocondria en la generación de ROS se emplearon inhibidores específicos de los complejos de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. La estrategia seguida fue la misma que con los antioxidantes: el análisis de las células DHE⁺ por citometría de flujo y comprobar si inhibían la toxicidad por ATLS mediante la monitorización del crecimiento celular. Como control positivo de toxicidad se estudiaron tratamientos sólo con los ATLS (ilustración 53 A, F) para compararlos a los cotratamientos con inhibidores y ATLS.

El inhibidor del complejo III antimicina A³⁹⁴ fue el compuesto más eficaz en la reducción de ROS. En los tratamientos con los tres ATLS y antimicina A, el número de células DHE⁺ se mantuvo a niveles semejantes al tiempo 0 (los controles sin tratar): tras 4 horas alrededor del 11% de las células eran DHE⁺ (ilustración 53 B). El inhibidor de la F₀F₁-ATP sintasa oligomicina³⁹⁵ redujo, en los tratamientos con edelfosina y perifosina, las células DHE⁺ hasta niveles semejantes (5% y 18% respectivamente tras 4 horas, ilustración 53 C). Sin embargo, la oligomicina fue menos eficaz en el tratamiento con miltefosina, tanto en niveles absolutos (se mantienen un 26% de células DHE⁺ tras 4 horas, la fracción más elevada de los tres ATLS) como relativa (respecto al número de células DHE⁺ en los tratamientos únicamente con miltefosina, ya de por sí menor que en los tratamientos con los otros dos ATLS). Se emplearon también dos inhibidores del complejo II: malonato³⁹⁶ y 2-tenoiltrifluoroacetona³⁹⁷ (2TTFA), que llevaron a una reducción moderada de los ROS. El malonato permitió una ralentización de la formación de ROS por edelfosina y perifosina y una ligera disminución de los niveles tras 4 horas de tratamiento (cerca del 70% de células DHE⁺, ilustración 53 D), mientras que el 2TTFA fue algo más eficaz en tratamientos con edelfosina pero apenas redujo el estrés oxidativo producido por perifosina (41% y 78% respectivamente tras 4 horas, ilustración 53 E). En los tratamientos con miltefosina ninguno de estos dos inhibidores redujo significativamente la fracción DHE⁺.

Los cuatro inhibidores empleados fueron capaces de revertir, al menos parcialmente, la inhibición de crecimiento que causa la edelfosina (ilustración 53 G-J, comparar con la ilustración 53 F). Existió además una buena correlación entre la capacidad del inhibidor de disminuir el estrés oxidativo y la toxicidad provocadas por la edelfosina. La antimicina A permitió un crecimiento sólo ligeramente retrasado respecto a las células sin tratar (ilustración 53 G). Por el contrario, en presencia de oligomicina, malonato o TTFA a tiempos menores de 8 horas el retraso del crecimiento fue considerable, aunque tras 24 horas los cultivos habían logrado alcanzar el mismo crecimiento que el control sin tratar (ilustración 53 H-J). Respecto a la miltefosina, ninguno de los inhibidores fue capaz de contrarrestar la toxicidad del compuesto, con independencia de su eficacia reduciendo

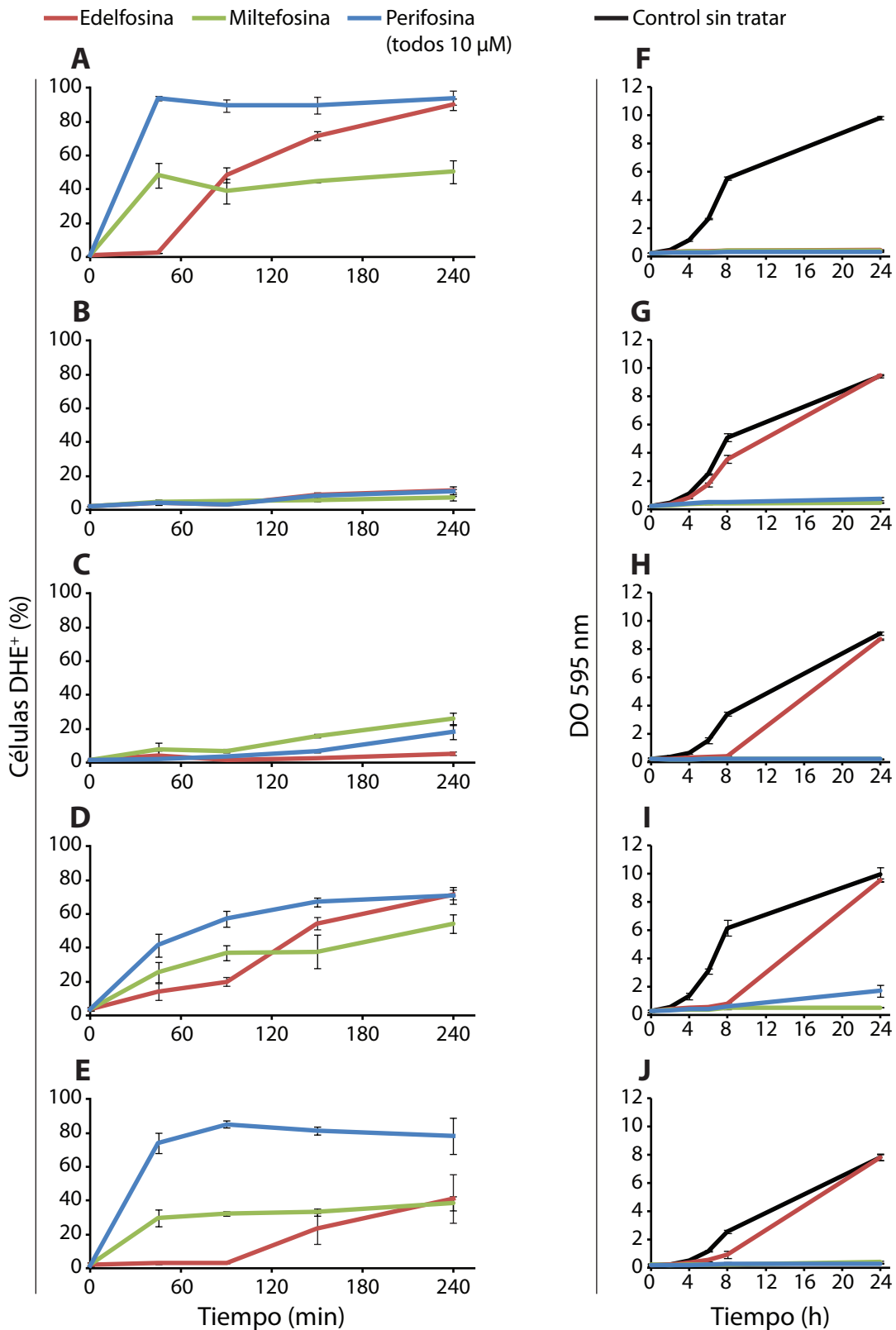


Ilustración 53: estrés oxidativo y viabilidad celular en cotratamientos inhibidor de la cadena de transporte de electrones-ATL. A-E: cuantificación del número de células DHE⁺. F-J: curvas de crecimiento en los cotratamientos. A, F: medio sin inhibidor. B, G: antimicina A 100 nM. C, H: oligomicina 40 μM. D, I: malonato 20 mM. E, J: 2TFA 500 μM. Los puntos corresponden a la media de tres experimentos ± EEM. Control negativo: 0 min de tratamiento (A-E) o control sin tratar con ATL pero sí con el correspondiente inhibidor (línea negra, F-J).

el estrés oxidativo causado por dicho ATL. Este resultado fue coherente con reducción del estrés oxidativo observada con antioxidantes, que no implicaba –fuera completa (α TF) o parcial (NAC)– una disminución de la toxicidad por miltefosina. Se confirmó por tanto que la toxicidad por miltefosina es independiente del estrés oxidativo.

Dos fenómenos observados mediante el uso de inhibidores mitocondriales fueron difíciles de conciliar con resultados anteriores. En primer lugar, los tratamientos con antimicina A u oligomicina redujeron las ROS provocadas por perifosina y edelfosina a niveles semejantes; sin embargo la toxicidad por perifosina no se redujo, mientras que la toxicidad por edelfosina se inhibió significativamente. En el tratamiento con perifosina la reducción de las ROS con α TF (ilustración 51 A) sí se había asociado a una inhibición de su toxicidad (ilustración 52 D). Sin embargo, el crecimiento tras 24 horas de tratamiento fue mucho menor que el control sin tratar, lo que posiblemente indique que la toxicidad persiste parcialmente a pesar de la reducción de las ROS. El tratamiento con ácido retinoico logró una reducción semejante de ROS (ilustración 51 A), pero se tradujo en una inhibición de la toxicidad más reducida incluso. Por tanto, aunque la reducción de ROS por perifosina se puede asociar a una inhibición moderada de la toxicidad, la bajada de las ROS por sí sola no garantiza tal inhibición.

La disminución de las ROS mediante el empleo de inhibidores mitocondriales en los tratamientos con miltefosina y perifosina también fue inconsistente con la producción de ROS observada en la cepa ρ^- (ilustración 53 B, C) a niveles semejantes a la cepa WT.

Fragmentación mitocondrial provocada por ATLs

Las mitocondrias son capaces de fusionarse y dividirse, variando su número y tamaño. El condrioma celular es por tanto dinámico y puede ser regulado por diversos procesos, como el metabolismo o la muerte celular programada. 5 de los 74 genes identificados en el *screening* de resistencia a edelfosina regulan precisamente la morfogénesis de la mitocondria en múltiples procesos. Las mitocondrias de los mutantes *dnm1* Δ , un gen que promueve la fisión mitocondrial, se concentran en un número reducido de filamentos de gran tamaño²⁸⁰. Semejantes defectos y también otras morfologías aparecen en otro de los mutantes identificados, *gem1* Δ , cuyo mecanismo de acción sobre la mitocondria es independiente de *DNM1*²⁸³. *UTH1*, *PTC6/AUP1* y *MDM38*, además del mencionado *DNM1*, intervienen en procesos de autofagia específicos de la mitocondria y relacionados con la fragmentación del orgánulo²⁸⁵.

La identificación de estos mutantes señaló que el mantenimiento de la morfología mitocondrial era necesario para la toxicidad de edelfosina. Para comprobarlo se monitorizó la morfología del orgánulo por microscopía de fluorescencia. Se trataron las células con Mitotracker Red CMXRos, un compuesto fluorescente que tiñe específicamente mitocondrias. Se empleó medio rico con glicerol como única fuente de carbono, para estimular la función mitocondrial. La morfología en las células

sin tratar consistió en un número reducido de cordones que recubren la célula (ilustración 54 A). El tratamiento con edelfosina 20 μM , ya tras 30 minutos, produjo cambios morfológicos: desaparecieron los cordones y se observaron puntos de menor tamaño (ilustración 54 C). El Mitotracker es un compuesto catiónico cuya acumulación en el interior de las mitocondrias depende de su elevado potencial de membrana. Por tanto, existía la posibilidad de que tal morfología fuera una alteración en la tinción debida a alteraciones locales del potencial de membrana mitocondrial. Se comprobó que realmente existía una fragmentación mitocondrial empleando células transformadas con un vector que codifica una GFP con una secuencia de localización mitocondrial (GFP_{mt}). Se observó la misma morfología de cordones en células sin tratar (ilustración 54 B) y numerosas estructuras punteadas tras el tratamiento con edelfosina (ilustración 54 D). Dado que la calidad de la imagen era mucho mejor, en adelante se empleó la cepa transformada con GFP_{mt} .

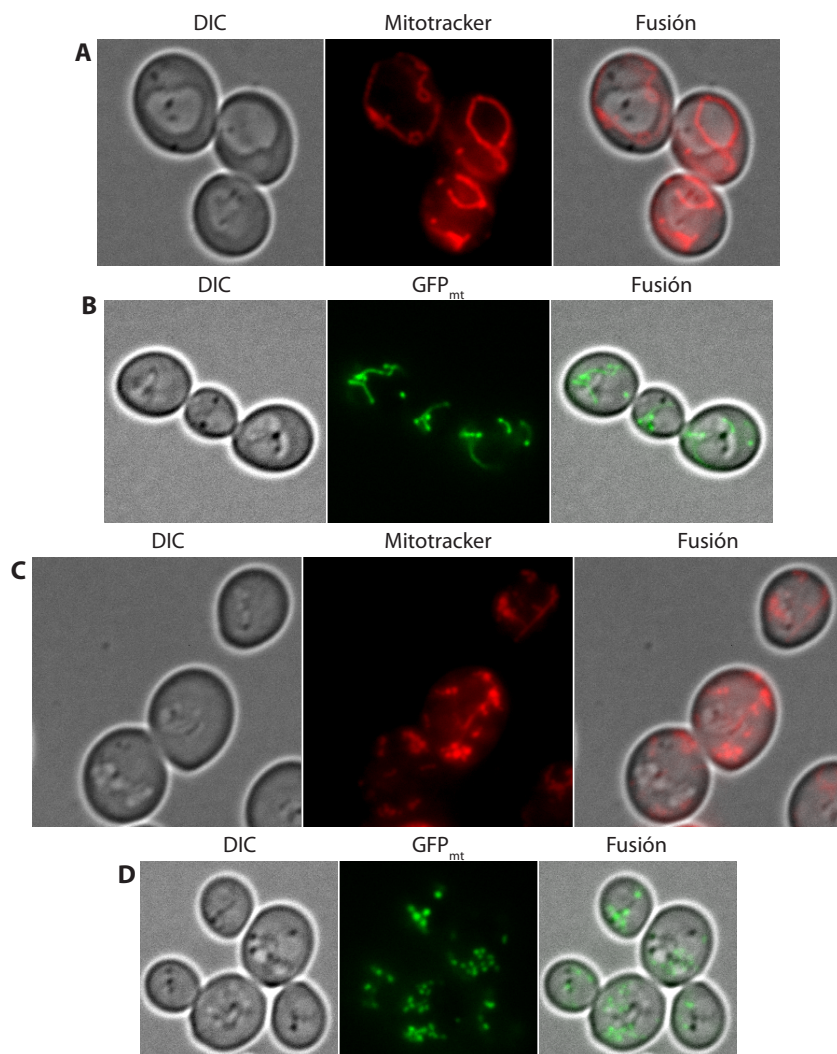


Ilustración 54: fragmentación mitocondrial por edelfosina. Mitocondrias marcadas con Mitotracker (A, C) o con GFP_{mt} (B, D). A, C: control sin tratar. B, D: tratamientos de 30 minutos con edelfosina 20 μM .

Se estudió posteriormente la fragmentación mitocondrial provocada por los 3 ATLs (edelfosina, miltefosina y perifosina) en paralelo, en las mismas condiciones empleadas en otros experimentos: 10

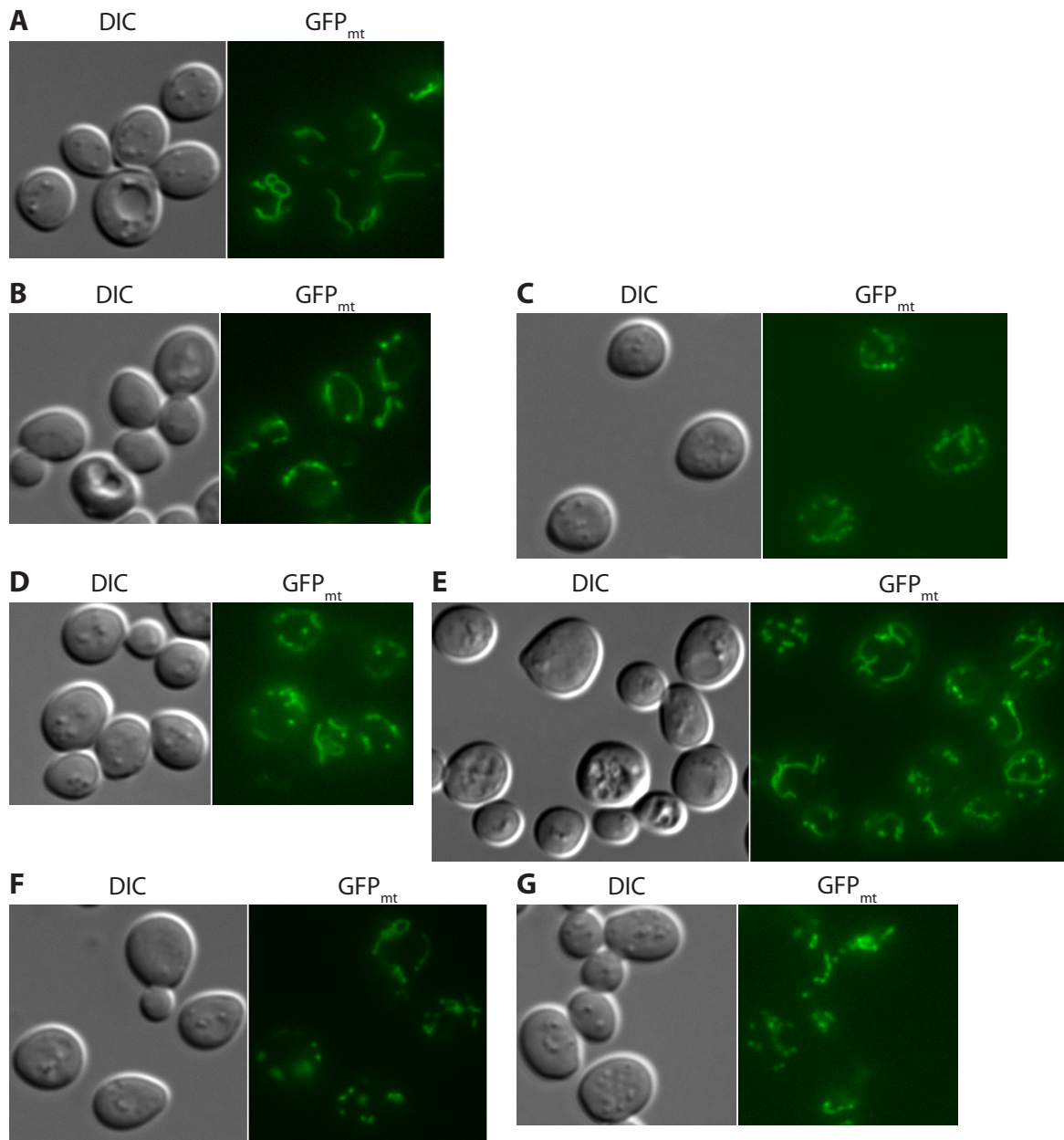


Ilustración 55: fragmentación mitocondrial por ATLs en medio con glucosa como fuente de carbono. A: células sin tratar. Tratamientos: edelfosina 10 μ M, 45 min (B) y 150 min (C); miltefosina 10 μ M, 45 min (D) y 150 min (E); perifosina 10 μ M, 45 min (F) y 150 min (G).

μ M de los compuestos y con glucosa como fuente de carbono. Las observaciones previas (ilustración 54) se corroboraron, observándose la misma morfología de cordones en las células control (ilustración 55 A) y fragmentación tras el tratamiento con ATLs (ilustración 55 B-F). Hay que señalar que las células presentaban mayoritariamente una mezcla de morfologías (bastones y puntos) y que una estructura alargada perpendicular al plano de enfoque sería indistinguible de una estructura punteada. Por tanto únicamente fue posible realizar observaciones cualitativas. No se observó a 45 min de tratamiento una fragmentación clara, apareciendo una mezcla de cordones y puntos (ilustración 55 B, D, F). Estas últimas estructuras podrían indicar los inicios de la fragmentación mitocondrial, a la vista de que tras 150 minutos la fragmentación fue clara y abundante en edelfosina y perifosina (ilustración 55 C, G).

Tal progresión temporal no fue clara sin embargo en la miltefosina (ilustración 55 E), lo que parece indicar que este compuesto induce menos fragmentación mitocondrial.

Con el fin de comprobar si existía una relación entre la actividad mitocondrial y la fragmentación inducida por ATLs se realizó el mismo experimento en medio con glicerol como única fuente de carbono. Las células sin tratar crecidas en este medio presentaron la misma morfología mitocondrial pero un mayor desarrollo de los orgánulos, indicado por el mayor número de cordones y ramificaciones de los mismos en cada célula (ilustración 56 A). Los tratamientos con ATLs provocaron fragmentación mitocondrial, tanto a tiempos cortos (45 minutos, ilustración 56 B, D, F) como largos (150 minutos,

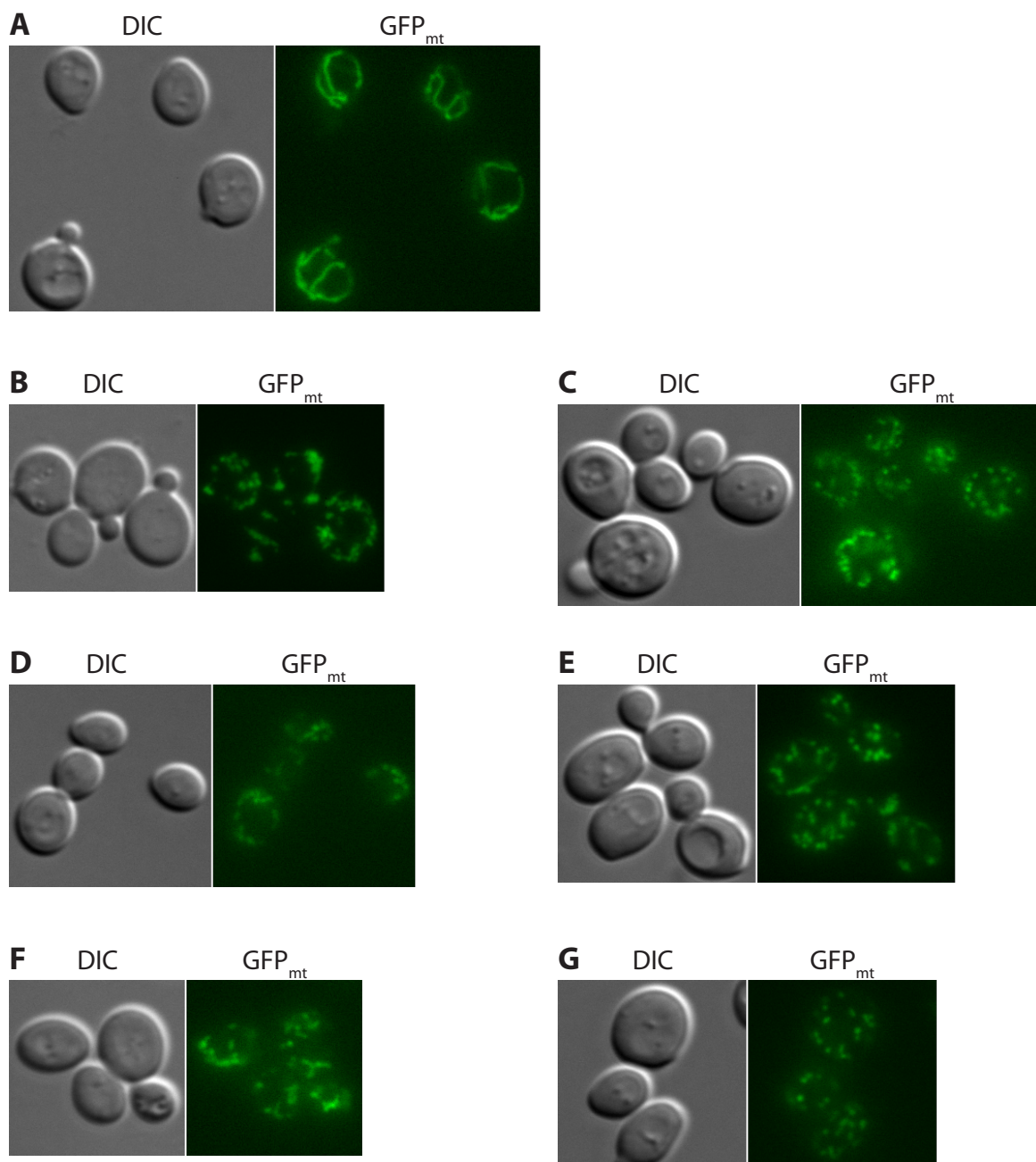


Ilustración 56: fragmentación mitocondrial por ATLs en medio con glicerol como fuente de carbono. A: células sin tratar. Tratamientos: edelfosina 10 μ M, 45 min (B) y 150 min (C); miltefosina 10 μ M, 45 min (D) y 150 min (E); perifosina 10 μ M, 45 min (F) y 150 min (G).

ilustración 56 C, E, G). Por tanto la presencia de glicerol como única fuente de carbono aceleró la fragmentación mitocondrial inducida por ATLS.

A pesar de observarse una asociación clara entre tratamiento con ATLS y fragmentación mitocondrial dos elementos eran llamativos. La fragmentación mitocondrial se comenzó a observar a tiempos muy cortos, ya a 45 minutos en algunos casos, con lo que podría ser un evento temprano en la toxicidad. Sin embargo se observó fragmentación con los tres ATLS, mientras que la mitocondria no parecía jugar el mismo papel en la toxicidad de todos ellos. Para clarificar la relación de la fragmentación mitocondrial con otros mecanismos de toxicidad se examinó la fragmentación mitocondrial inducida en presencia de α TF. En medio con glucosa el antioxidante pareció reducir la fragmentación por los tres ATLS sólo parcialmente, observándose una mezcla de morfologías de cordón y punteadas (ilustración 57 C, E, G). En relación a los tratamientos sólo con ATLS a 150 minutos, la fragmentación fue significativamente menor con edelfosina y perifosina. El antioxidante fue eficaz frente a la toxicidad de edelfosina, parcialmente frente a perifosina e irrelevante frente a miltefosina; por tanto pareció haber una buena correlación entre toxicidad y fragmentación mitocondrial en presencia de α TF. Cuando la fuente de carbono era glicerol el antioxidante fue incapaz de evitar la fragmentación mitocondrial (ilustración 57 D, F, H). Sin embargo, no se había determinado la eficacia del α TF frente a ATLS en este medio. A pesar de la relación observada entre ambos procesos, no está claro que la fragmentación mitocondrial sea crítica para la toxicidad por ATLS. La atenuación de la fragmentación por α TF parece indicar que es un proceso posterior al estrés oxidativo; sin embargo se observa fragmentación ya a tiempos tempranos, y también es producida por miltefosina, el ATL en el que el estrés oxidativo inducido es menor y menos relevante. No obstante, la inducción de fragmentación mitocondrial fue una consecuencia clara del tratamiento con los tres compuestos. La fragmentación mitocondrial podría ser parte de una respuesta general compartida por los tres ATLS pero no necesariamente inicial ni esencial en el mecanismo de toxicidad. La relevancia de este proceso no quedó completamente dilucidada, ni el papel que los genes de morfología mitocondrial identificados en el *screening* juegan en el proceso de toxicidad.

Para comprobar si la fragmentación mitocondrial precedía a la incorporación de estos orgánulos por mitofagia a la vacuola se marcaron estos últimos orgánulos mediante un pulso de FM 4-64 seguido de incubación en medio sin este compuesto. Las mitocondrias se localizaron preferentemente en la periferia celular en el control (ilustración 58 A). No se observa una concentración de GFP_{mt} en el interior de las vacuolas, y la única colocalización de las mitocondrias que se observa con las vacuolas es parcial y debida seguramente a la superposición de los orgánulos en el plano focal y no a la incorporación de las mitocondrias a las vacuolas. El tratamiento con edelfosina (ilustración 58 B, C) modifica la morfología mitocondrial a estructuras punteadas. En ningún caso se observa una colocalización significativa de dichas estructuras con las vacuolas. Tampoco se observa, en la imagen de GFP_{mt}, una señal difusa en las vacuolas, que se correspondería a la liberación de la proteína en la

vacuola si se estuviera produciendo mitofagia (fenómeno que sí se observa, por ejemplo, cuando se monitoriza una Pma1GFP). Estos resultados sugieren que la fragmentación mitocondrial inducida por edelfosina no conlleva mitofagia ni la degradación vacuolar de las mitocondrias.

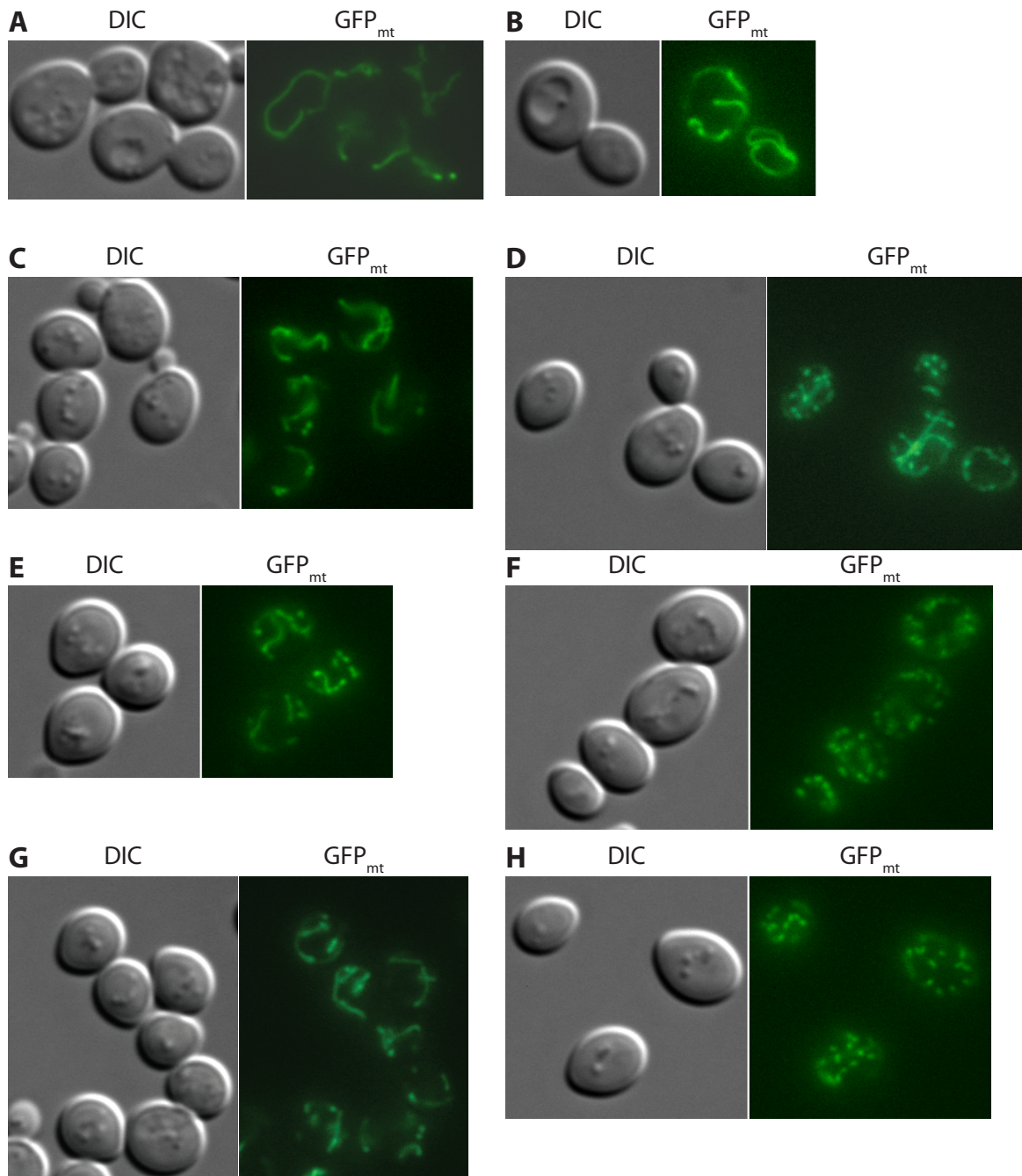


Ilustración 57: fragmentación mitocondrial por ATLs en presencia de α -tocoferol. A, B: células sin tratar. Tratamientos: edelfosina $10 \mu\text{M}$ 150 min (C, D); miltefosina $10 \mu\text{M}$ 150 min (E, F); perifosina $10 \mu\text{M}$ 150 min (G, H). Medio con glucosa (A, C, E, G) o glicerol (B, D, F, H) como única fuente de carbono.

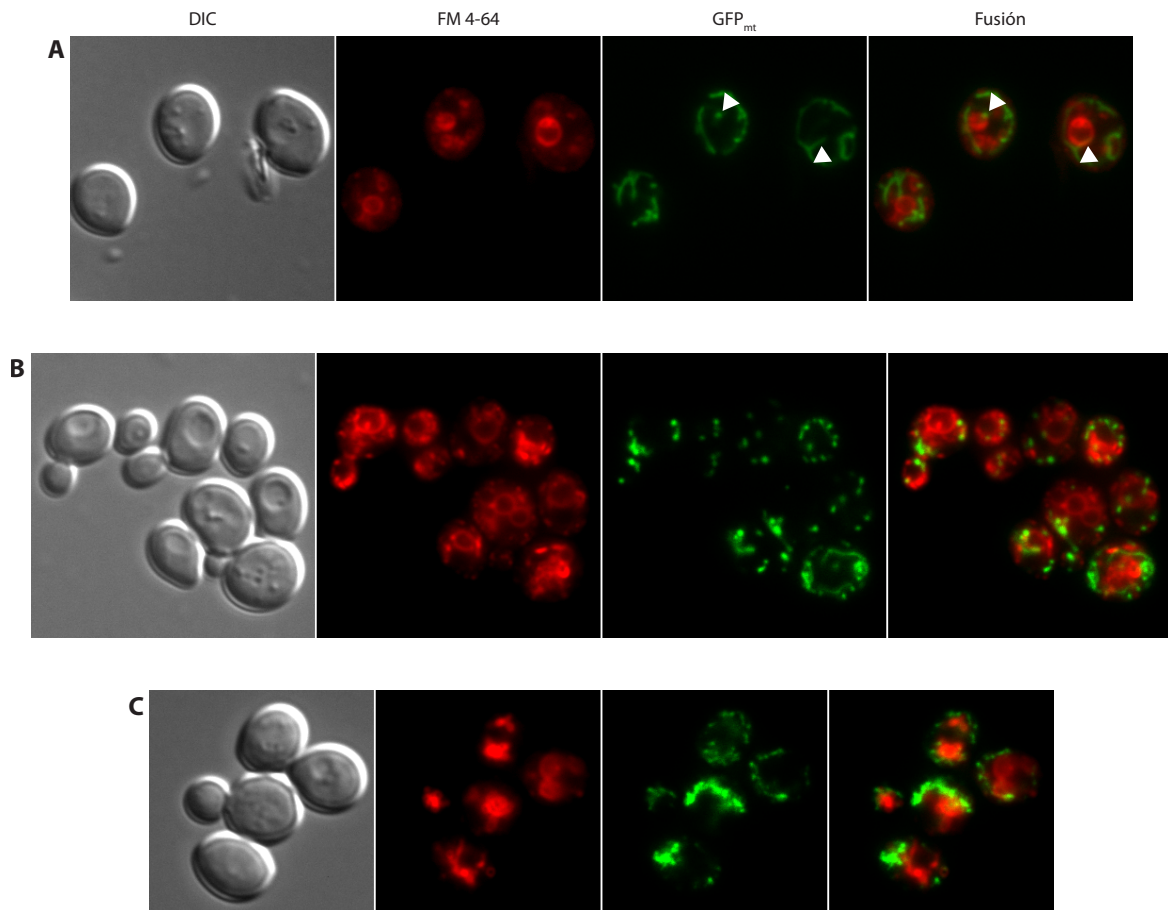


Ilustración 58: las mitocondrias fragmentadas no colocalizan significativamente con las vacuolas. A: control sin tratar. Células tratadas con edelfosina 10 μ M 40 min (B) o 180 min (C). \blacktriangleright : puntos de colocalización.

Análisis del potencial de membrana mitocondrial durante el tratamiento con ATLs

Además de su papel central en el metabolismo celular, las mitocondrias intervienen en rutas de señalización por diversos mensajeros (Ca^{2+} , ROS, proteínas como el citocromo C) y participan en la respuesta a cambios metabólicos, situaciones de estrés o procesos de muerte celular programada³⁹⁸. En este proceso se producen cambios del potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ (depolarización³⁹⁹, pero también hiperpolarización o secuencias complejas de ambos^{400,401}) que se asocian, además, a la producción posterior de ROS. Dada la implicación de la mitocondria y la producción de ROS en la toxicidad por ATLs, se quiso estudiar también la evolución del $\Delta\Psi_m$ durante los tratamientos a distintos tiempos.

Se empleó como sonda fluorescente DiOC₆(3) (ioduro de 3,3'-dihexiloxocarbocianina), un compuesto catiónico y lipofílico, cuya acumulación en compartimentos subcelulares depende del potencial transmembrana y es por tanto empleado para marcar mitocondrias^{402,403}. El control negativo consistió en células tratadas con un ionóforo capaz de disipar el gradiente de protones (CCCP, carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona) y como control positivo se emplearon células tratadas con

farnesol, un compuesto que provoca hiperpolarización mitocondrial⁴⁰⁴. Se cultivaron las células tanto en medio con glucosa como en medio con glicerol, para estimular la función mitocondrial.

Incorporación de DiOC₆(3) en controles sin tratar. Condiciones para el análisis de tratamientos con ATLs

Se estudió en primer lugar la incorporación de DiOC₆(3) mediante FACS. El uso de glicerol en vez de glucosa provocó una mayor intensidad de fluorescencia (FL1-H) en los controles sin tratar (ilustración 60 A, C), coherente con una mayor actividad mitocondrial y, por consiguiente, un mayor $\Delta\Psi_m$. El tratamiento con CCCP de células crecidas con glicerol redujo la intensidad (ilustración 60 C), lo que indicó que la tinción con DiOC₆(3) dependía, efectivamente, de la existencia de un potencial transmembrana. La fluorescencia de dichas células se redujo hasta los niveles observados en los controles con glucosa (ilustración 60 A). Sin embargo, el tratamiento con CCCP de células crecidas con glucosa no redujo la fluorescencia (observándose incluso un ligerísimo aumento respecto a las células control). Esto sugiere que en medio con glucosa la actividad mitocondrial es reducida ($\Delta\Psi_m$ cercano a 0). Los controles positivos (tratamientos con farnesol) mostraron efectivamente hiperpolarización mitocondrial, de acuerdo con las observaciones preexistentes⁴⁰⁴. Tanto en células crecidas con glucosa como con glicerol se observó un aumento de la intensidad de alrededor de un orden de magnitud (ilustración 60 A, C) respecto a los respectivos controles. Con el objetivo de analizar los cambios de $\Delta\Psi_m$ y cuantificar las células que sufrían dichos cambios, se dividió la escala de intensidades de fluorescencia en regiones. Las 3 regiones se establecieron en función de los resultados de los controles y se diferenciaban aproximadamente en un orden de magnitud de intensidad de fluorescencia. La región Ψ_m^{baj} se correspondió a las intensidades reducidas observadas en células control en glucosa, o células crecidas en glicerol y tratadas con CCCP. Ψ_m^{med} se correspondió con las intensidades observadas en células control en glicerol, o células crecidas en glucosa y tratadas con farnesol. Ψ_m^{alt} se correspondió con las mayores intensidades, en niveles semejantes a los presentados por células crecidas con glicerol y tratadas con farnesol.

Un problema de los experimentos de FACS es que no se observa directamente la acumulación celular de DiOC₆(3), habiendo que asumir que la fluorescencia refleja únicamente el potencial transmembrana de la mitocondria. Las cianinas, el grupo de compuestos fluorescentes al que pertenece el DiOC₆(3), tienen carga positiva y dobles enlaces conjugados, lo que permite deslocalizar la carga en toda la molécula. Su acumulación preferente en las mitocondrias se debe a estas dos características⁴⁰⁵, pues son atraídas por la distribución de cargas del $\Delta\Psi_m$ (negativa en el interior) pero pueden además atravesar la membrana del orgánulo y acumularse dentro de él. De lo anterior se deduce que otros compartimentos celulares con un potencial transmembrana también podrían teñirse con cianinas. Compuestos como el DiOC₆(3) tienen además cadenas alifáticas que incrementan la permeabilidad de la molécula a las membranas celulares y facilitan su carga, pero también su solubilidad en todo

tipo de membranas celulares y la posibilidad de una tinción indistinta de las mismas. De hecho, este principio ha sido empleado para teñir el retículo endoplásmico en líneas celulares⁴⁰⁶ y levaduras⁴⁰⁷. Hay que señalar, sin embargo, que en ambos casos la tinción del RE se logró empleando concentraciones dos órdenes de magnitud mayores de las empleadas en los experimentos aquí presentados; de hecho, concentraciones semejantes a las aquí empleadas resultaron en la tinción preferente de mitocondrias en levaduras⁴⁰⁷.

Para validar los experimentos de citometría se estudiaron por microscopía las estructuras celulares que acumulan DiOC₆(3). Se emplearon las mismas condiciones de tratamiento con ATLs, fuente de carbono del medio de cultivo y de tinción. Las observaciones fueron realizadas empleando los mismos ajustes en el microscopio, para poder comparar las intensidades de fluorescencia de distintas muestras. Un parámetro que no se pudo fijar fue el tiempo de exposición, debido a las grandes diferencias de fluorescencia. Los tiempos bajos, adecuados para células muy brillantes, impedían observar estructura alguna en células poco teñidas, mientras que a tiempos altos, adecuados para células poco teñidas, las células brillantes se saturaban, lo que imposibilitaba la comparación y degradaba la calidad de las fotos. Se optó por tomar, para cada campo, tres fotos con tiempos de exposición distintos (20 ms, 80 ms, 800 ms), cubriendo así todo el rango de intensidades que se dio en el experimento.

Las imágenes de los controles validaron la mayoría de las interpretaciones realizadas por citometría. En las células control crecidas con glicerol algunas células presentaron tinción en un anillo apartado de las vacuolas (identificadas en el DIC) y generalmente excéntrico que probablemente se corresponda con el RE (ilustración 59 E). La mayoría de células mostraron acumulación en estructuras, de acuerdo con las observaciones previas con GFP_{mit}, semejantes a las mitocondrias: pocos cordones, localizados en su mayoría en la periferia celular y que recubren casi toda la célula (ilustración 59 B 800 ms, C 80 ms, D). El histograma de estas células presentó una base muy ancha, lo que se reflejó en las imágenes de microscopía en un rango amplio de intensidades de fluorescencia en las distintas células (ilustración 59 B-C). Las células control crecidas con glucosa presentaron tinción en las mismas estructuras, con una mayor incidencia de la tinción del RE. La intensidad de la fluorescencia fue más homogénea en todas las células y menor que en las crecidas con glicerol: mientras con glucosa las mitocondrias aparecieron tenues a un tiempo de exposición de 800 ms (ilustración 59 A), a ese mismo tiempo aparecieron nítidas en células con glicerol (ilustración 59 B) e incluso, en algunos casos, a 80 ms (ilustración 59 C). El DiOC₆(3) también se acumuló, empleando medio con glucosa, en estructuras que coincidían con lo previamente observada con GFP_{mit} en dicho medio (cordones, de menor número y tamaño que con glicerol). Por tanto se confirmó que el DiOC₆(3) se incorpora a las mitocondrias y que la incorporación es mayor con glicerol que con glucosa, indicativo de su dependencia de $\Delta\Psi_m$. El desacoplante CCCP inhibió la incorporación de DiOC₆(3), e incluso forzando las condiciones de exposición fue imposible apreciar estructuras celulares teñidas

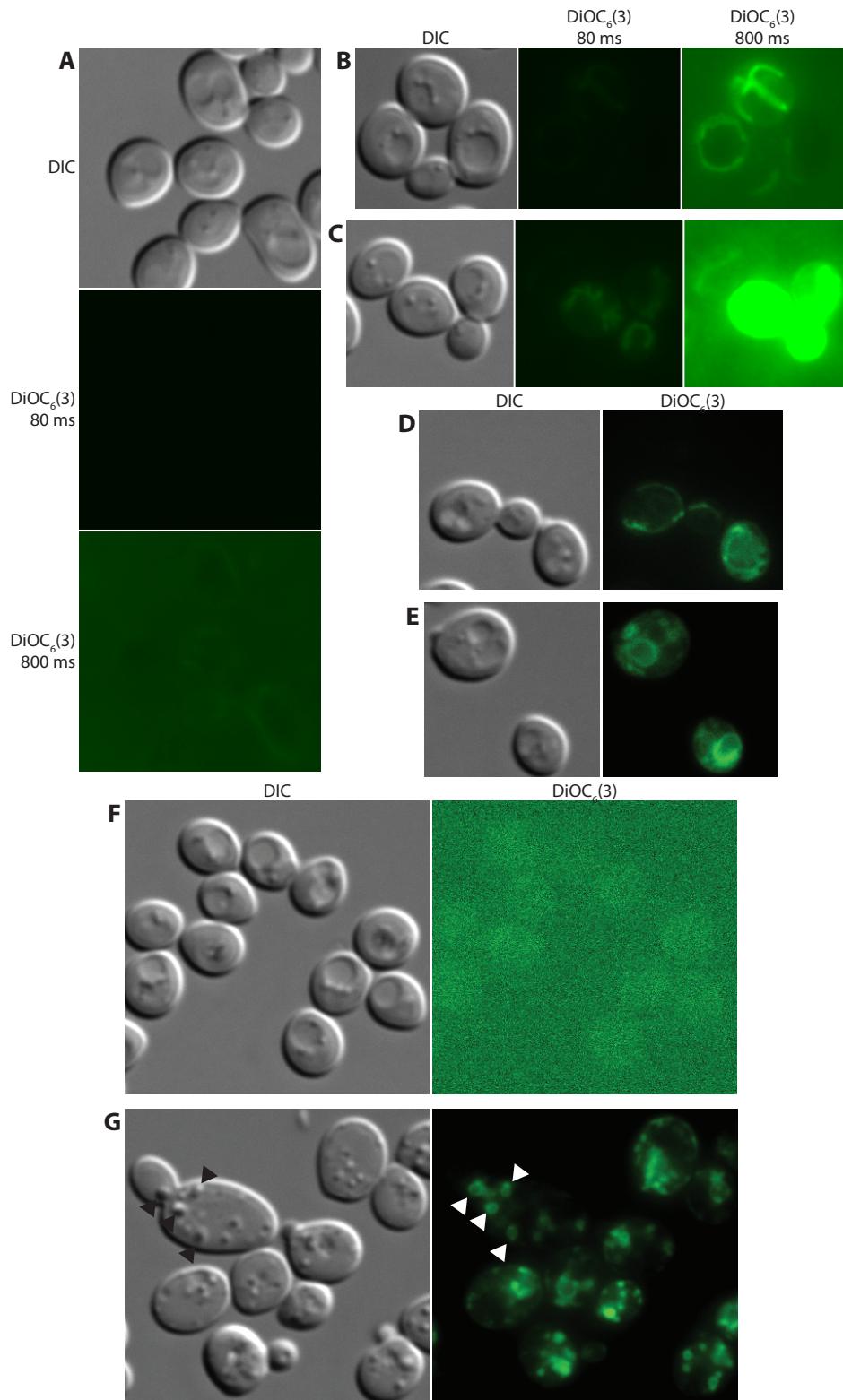


Ilustración 59: incorporación de DiOC₆(3) a estructuras celulares, células control. **A:** control crecido en glucosa. **B:** control crecido en glicerol, imagen representativa de la menor intensidad observada. **C:** control crecido en glicerol, imagen representativa de la mayor intensidad observada. **D:** detalle de la morfología identificada como mitocondrias. **E:** detalle de la morfología identificada como RE. **F:** células tratadas con CCCP, ajuste de imagen forzado al máximo. **G:** células tratadas con farnesol. ►: gránulos anulares que acumulan tinción. Únicamente las imágenes A-C fueron tomadas sin variar los parámetros del microscopio (excepto el tiempo de exposición indicado) para facilitar la comparación de intensidades. Las imágenes D-G fueron optimizadas para una mejor apreciación de las estructuras celulares marcadas.

(ilustración 59 F). Al igual que mostraban los histogramas de FACS, el CCCP redujo apreciablemente la fluorescencia en células crecidas con glicerol, pero la diferencia fue inapreciable en células crecidas con glucosa, confirmando que el $\Delta\Psi_m$ basal en medio con glucosa es muy reducido. El tratamiento con farnesol incrementó la fluorescencia tanto con glucosa como con glicerol. Las estructuras en las que se acumuló el DiOC₆(3) no tuvieron sin embargo la típica morfología mitocondrial, tratándose de estructuras punteadas de gran tamaño o, en algunos casos, de apariencia anular. Al contrario que las mitocondrias, también observables en las imágenes de DIC (ilustración 59 G, señaladas por ►).

Incorporación de DiOC₆(3) en células tratadas con edelfosina

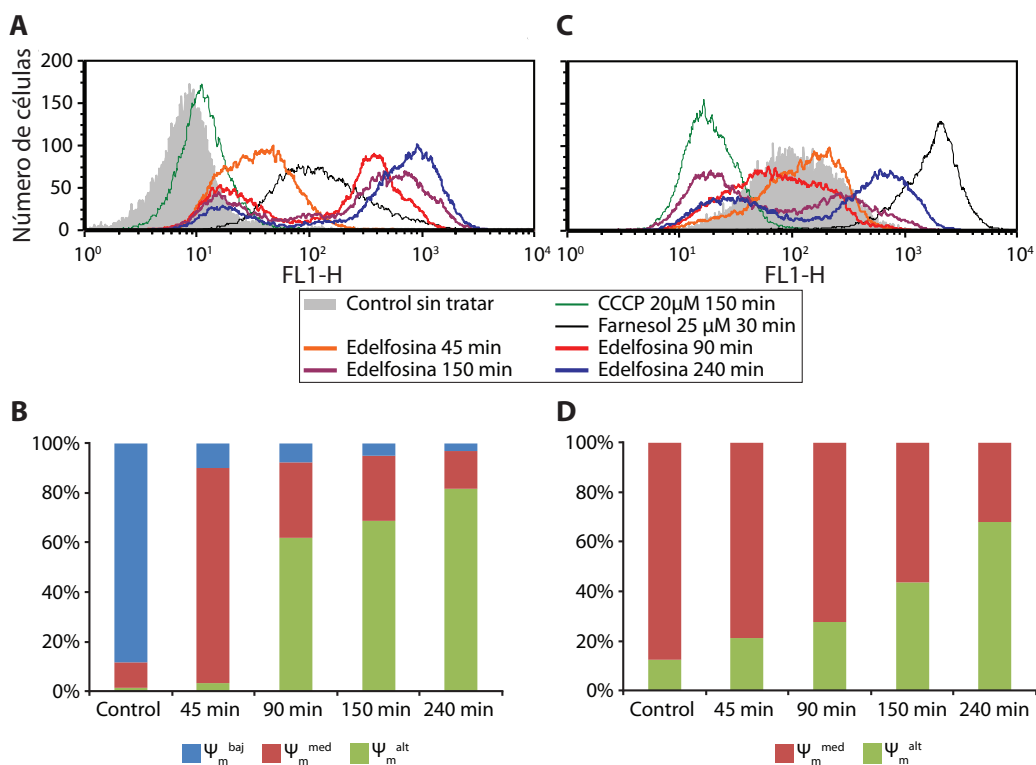


Ilustración 60: incorporación de DiOC₆(3) en células tratadas con edelfosina 10 μ M en medio con glucosa (A, B) o con glicerol (C, D). A, C: histogramas representativos. FL1-H: fluorescencia del DiOC₆(3), en unidades relativas. B, D: cuantificación de las células (promedio de tres experimentos).

El tratamiento en medio con glucosa con 10 μ M de edelfosina provocó, tras 45 minutos, un primer incremento de la intensidad en todas las células (ilustración 60 A), correspondiente con la transición de la mayoría de las células desde Ψ_m^{baj} a Ψ_m^{med} (ilustración 60 B). A partir de 90 minutos se observó la aparición de una segunda población con mayor intensidad de fluorescencia (ilustración 60 A), correspondiente a Ψ_m^{alt} . Esta población se incrementó en tratamientos más prolongados, reduciéndose sin embargo la población de la región Ψ_m^{med} (ilustración 60 B). Esto sugiere que las células tratadas con edelfosina sufrieron una primera hiperpolarización mitocondrial a tiempos cortos, para posteriormente sufrir un segundo incremento de $\Delta\Psi_m$. El comportamiento de las células

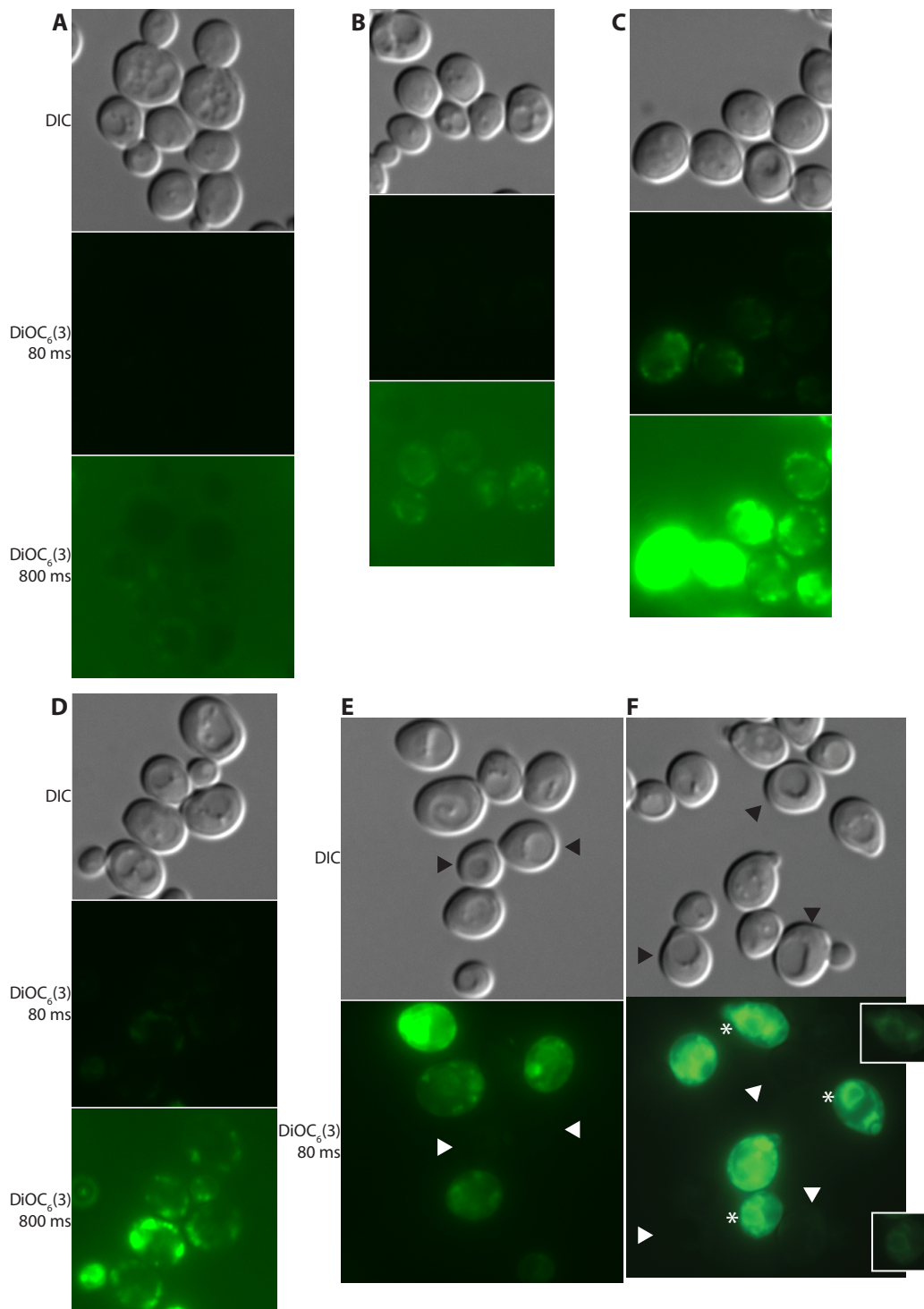


Ilustración 61: incorporación de DiOC₆(3) a estructuras celulares, tratamientos con 10 μM edelfosina. Tratamientos en medio con glucosa, 45 minutos (A), 90 minutos (B) y 150 minutos (C). Tratamientos en medio con glicerol, 45 minutos (D), 90 minutos (E) y 150 minutos (F). **F-recuadro:** detalle de células con un tiempo de exposición de 20 ms. ▶: células con una fluorescencia reducida a 80 ms. *: células en las que la estructura interna con tinción más intensa se asemeja al RE (imagen a 80 ms o recuadros a 20 ms).

crecidas con glicerol fue sólo parcialmente semejante. A 45 minutos de tratamiento se observó un incremento de la intensidad (ilustración 60 C), aunque debido a la escala logarítmica empleada en la medición de la fluorescencia este incremento fue más moderado, manteniéndose por tanto todas las

células en la región Ψ_m^{med} (ilustración 60 D). Los histogramas de los controles y del tratamiento a 45 minutos tenían una base más ancha que en las células crecidas con glucosa, lo que indicaba una gran variabilidad de una célula a otra en la intensidad de la fluorescencia. El histograma del tratamiento a 90 minutos continuó ensanchándose, y tras 150 minutos mostraba ya una distribución bimodal: una de las poblaciones se mantenía en la región Ψ_m^{med} , aunque en la parte más baja de la misma, mientras que otra se encontraba en la región Ψ_m^{alt} . Las poblaciones coincidieron además aproximadamente con las regiones en las que, en células crecidas con glucosa, se observaba la hiperpolarización temprana y la tardía.

Las imágenes de microscopía fueron en general coherentes con lo observado por FACS. Una limitación del empleo paralelo de ambas técnicas es que no pueden compararse los resultados concretos de cada tiempo de tratamiento. Las observaciones de microscopía se realizaron inmediatamente después de la recolección de las células, mientras que por la naturaleza misma de la técnica y los instrumentos de FACS, entre la recolección y la adquisición de los resultados pudo haber una diferencia de unos 30 minutos. Esta diferencia fue sin embargo constante para todos los experimentos, y para todos los tiempos examinados en cada experimento, por lo que deberían poder observarse los mismos cambios globales y la misma evolución temporal mediante ambas técnicas. En células crecidas con glucosa la primera hiperpolarización no se apreció claramente a 45 minutos (ilustración 61 A, muy semejante al control de la ilustración 59 A) pero sí tras 90 minutos (ilustración 61 B). A partir de 150 minutos sí se apreció la aparición de un segundo grupo de mayor intensidad de fluorescencia (ilustración 61 C, células ya apreciables a 80 ms) y a 240 minutos aumenta el número de las mismas, por lo que podrían reflejar la población que sufre una segunda hiperpolarización. Las células con glicerol tratadas 45 minutos presentaron aspecto semejante al control (ilustración 59 B-C), con mayor intensidad de fluorescencia que con glucosa y con una mezcla heterogénea de células con distintas intensidades de tinción (ilustración 61 D). Esta variabilidad se hizo más pronunciada a 90 minutos (ilustración 61 E): se hacen más abundantes las células con una mayor tinción, en las que la intensidad de fluorescencia aumenta, mientras otras apenas presentaban tinción (►). Dicho proceso continuó a 150 minutos (ilustración 61 F), diferenciándose ya dos poblaciones: de alta intensidad o de muy baja (►), correspondientes a la distribución bimodal del histograma (ilustración 60 C). La morfología de las estructuras que acumularon el $\text{DiOC}_6(3)$ fue semejante a la observada en mitocondrias con GFP_{mit} . En células con glucosa se observaron cordones a 45 minutos y progresiva fragmentación de los mismos en puntos a tiempos mayores (ilustración 61 C), mientras que con glicerol se apreció fragmentación intensa ya a 45 minutos (ilustración 61 D). Sin embargo, la abundante fragmentación observada con GFP_{mit} a 90 minutos o más no se observó con $\text{DiOC}_6(3)$, reduciéndose el marcaje a unos pocos gránulos. A 90 minutos y, especialmente, a 150 minutos apareció también un marcaje anular que aparenta ser el RE (ilustración 61 F, * a 80 ms o en los recuadros a 20 ms), particularmente prevalente en las células con mayor intensidad de fluorescencia.

Los experimentos de FACS y microscopía mostraron por tanto que la edelfosina provocó dos niveles distintos de hiperpolarización (correspondientes con las regiones Ψ_m^{med} y Ψ_m^{alt} de intensidad de fluorescencia). En presencia de glucosa en el medio de cultivo, la edelfosina hiperpolariza las células progresivamente, pasando de su estado basal de polarización reducida (Ψ_m^{baj}) a Ψ_m^{med} y finalmente a Ψ_m^{alt} . En presencia de glicerol en el medio de cultivo las células parten de un estado basal entre ambos niveles de hiperpolarización. La edelfosina hiperpolariza algunas células, que alcanzan directamente el segundo nivel (Ψ_m^{alt}) mientras que otras se depolarizan ligeramente al primero (Ψ_m^{med}). Es posible sin embargo que a tiempos prolongados de tratamiento siga existiendo una progresión del primer al segundo nivel de polarización, ya que se observa un progresivo aumento de la población en la región Ψ_m^{alt} a costa de la población en Ψ_m^{med} . El DiOC₆(3) se acumuló en las mitocondrias y por tanto reflejó el $\Delta\Psi_m$. No obstante, en células crecidas con glicerol las células con mayor fluorescencia acumularon el compuesto en el RE. Esto podría indicar un paso adicional en el proceso. Los resultados no indican si el cambio, de tinción mitocondrial al RE, se debe a cambios morfológicos en la mitocondria, a un descenso en el $\Delta\Psi_m$, una hiperpolarización del RE o una combinación de varios fenómenos.

Incorporación de DiOC₆(3) en células tratadas con miltefosina

El comportamiento de las células tratadas con 10 μM de miltefosina fue a grandes rasgos similar. Se observó, en células crecidas con glucosa, también una hiperpolarización temprana tras 45 minutos (ilustración 62 A) y la aparición de una segunda hiperpolarización, correspondientes a las regiones Ψ_m^{med} y Ψ_m^{alt} respectivamente. Al contrario que en los tratamientos con edelfosina, sin embargo, las células no progresaron a ese segundo estadio en tiempos más prolongados de tratamiento, manteniéndose los porcentajes de cada región sin grandes variaciones (ilustración 62 B). También se diferenció de la edelfosina en el comportamiento en medio con glicerol, semejante. Se observó también una temprana hiperpolarización respecto al nivel basal de las células sin tratar (ilustración 62 C), y una progresión a la segunda hiperpolarización en tiempos más prolongados (ilustración 62 D).

El análisis microscópico de las células con glucosa confirmó la secuencia de eventos descrita. Se apreció a 45 minutos de tratamiento (ilustración 63 A) un aumento de fluorescencia respecto a las células control y también respecto al tratamiento con edelfosina (ilustración 59 A e ilustración 61 A respectivamente, comparando exposiciones de 800 ms), lo que concuerda con la primera hiperpolarización observada por citometría (ilustración 62 A), que alcanzaba intensidades algo mayores que con edelfosina. Las células de mayor intensidad de fluorescencia, ya apreciables a 80 ms son probablemente las que sufren la segunda hiperpolarización apreciada por FACS. Estas células no llegan a ser mayoritarias en los tiempos posteriores de tratamiento (ilustración 63 B-D). Las células con las dos intensidades de fluorescencia también aparecen en medio con glicerol. Como se observó por FACS, las células de la región Ψ_m^{alt} se hicieron más abundantes durante el tratamiento (células ya visibles a 80 ms en las ilustración 63 E-H). Al igual que en los tratamientos con edelfosina, el DiOC₆(3)

se acumuló en estructuras punteadas semejantes a las mitocondrias fragmentadas (ilustración 63 C a 800 ms, F a 80 ms). También se apreció acumulación en el RE (ilustración 63, células marcadas con *) en las células de la región Ψ_m^{alt} .

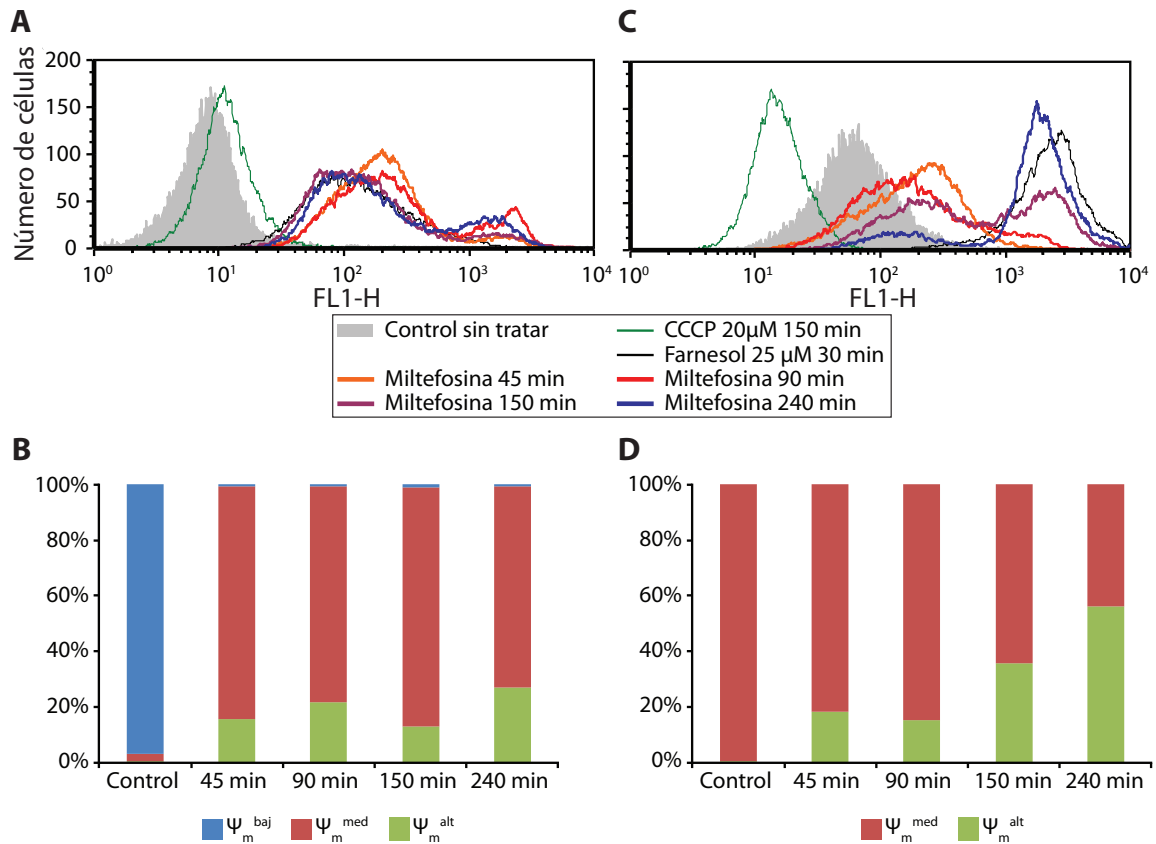


Ilustración 62: incorporación de DiOC₆(3) en células tratadas con miltefosina 10 μM en medio con glucosa (A, B) o con glicerol (C, D). A, C: histogramas representativos. FL1-H: fluorescencia del DiOC₆(3), en unidades relativas. B, D: cuantificación de las células (promedio de tres experimentos).

Las dos técnicas empleadas en el estudio mostraron que en los tratamientos con miltefosina (al igual que en los de edelfosina) se producen dos niveles de hiperpolarización, correspondientes con las regiones Ψ_m^{med} y Ψ_m^{alt} de intensidad de fluorescencia. La progresión temporal de la primera a la segunda hiperpolarización se da en medio con glicerol, mientras que en presencia de glucosa las células sufren mayoritariamente sólo la primera hiperpolarización, y sólo una fracción poco variable alcanza la segunda. El DiOC₆(3) se acumuló en las mitocondrias y, al igual que ocurrió con la edelfosina, también en el RE en las células de mayor intensidad de fluorescencia.

Incorporación de DiOC₆(3) en células tratadas con perifosina

La perifosina provocó un comportamiento semejante a la miltefosina, aunque más exacerbado. Tras tan sólo 45 minutos de tratamiento, las células crecidas en glucosa ya mostraron mayoritariamente una intensa fluorescencia (ilustración 64 A). Esta localización en Ψ_m^{alt} se mantuvo en tiempos más prolongados de tratamiento (ilustración 64 B). En las células crecidas con glicerol la respuesta fue

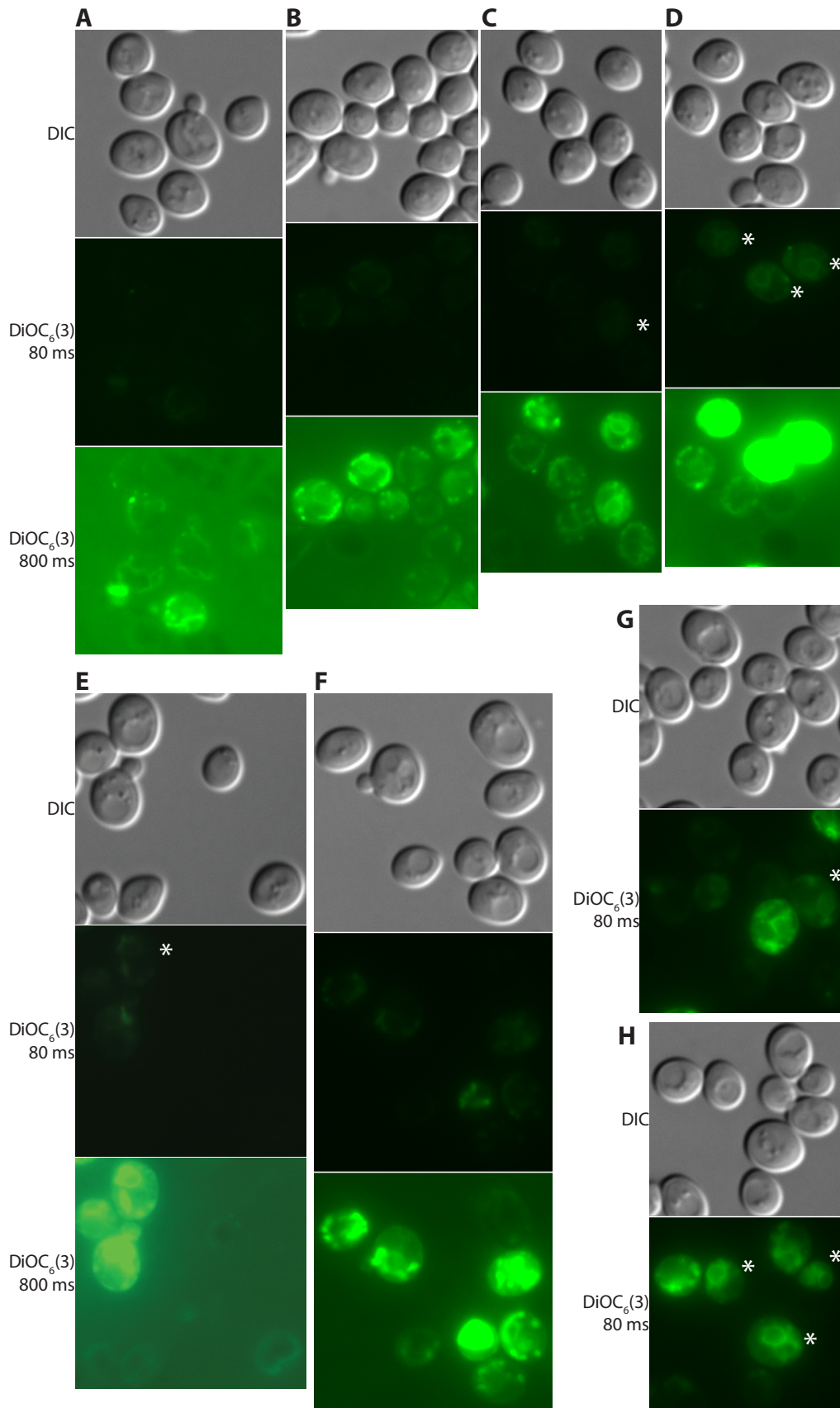


Ilustración 63: incorporación de DiOC₆(3) a estructuras celulares, tratamientos con 10 μ M miltefosina. Tratamientos en medio con glucosa, 45 minutos (A), 90 minutos (B), 150 minutos (C) y 240 minutos (D). Tratamientos en medio con glicerol, 45 minutos (E), 90 minutos (F), 150 minutos (G) y 240 minutos (H).

esencialmente idéntica, alcanzándose las mismas intensidades (ilustración 64 C) y proporciones de células en la región Ψ_m^{alt} (ilustración 64 D). Esto puede deberse a que la evolución con glucosa es tan rápida que no puede apreciarse una progresión más rápida con glucosa, a pesar de partir de una mayor polarización basal. Se confirmó por microscopía la elevada intensidad de fluorescencia de la mayoría de las células, alcanzándose tras 45 minutos de tratamiento niveles semejantes a los de 240 minutos, tanto en medio con glucosa (ilustración 65 A, B) como en medio con glicerol (ilustración 65 C, D). Al igual que con los otros dos ATLs estudiados, se observó acumulación de DiOC₆(3) en cuerpos de morfología semejante a las mitocondrias fragmentadas. También apareció tinción del RE en las células en medio con glicerol. Con edelfosina y miltefosina se había asociado una mayor prevalencia de esta localización del marcador con una mayor intensidad de fluorescencia; sin embargo, en tratamientos con perifosina la intensidad fue semejante en medio con glucosa y con glicerol, y aún así la tinción del RE fue mucho más acusada en células crecidas con glicerol. Curiosamente, en los tratamientos con edelfosina también se produjo acumulación en el RE preferentemente en células crecidas con glicerol. En presencia de glucosa se alcanzaba antes máxima hiperpolarización, con una menor incidencia de la tinción en el RE. Cabe por tanto plantear una interpretación alternativa: el factor que acentúa la acumulación de DiOC₆(3) en el RE podría ser la presencia misma de glicerol, y no el mayor $\Delta\Psi_m$ que se asocia al uso de dicha fuente de carbono.

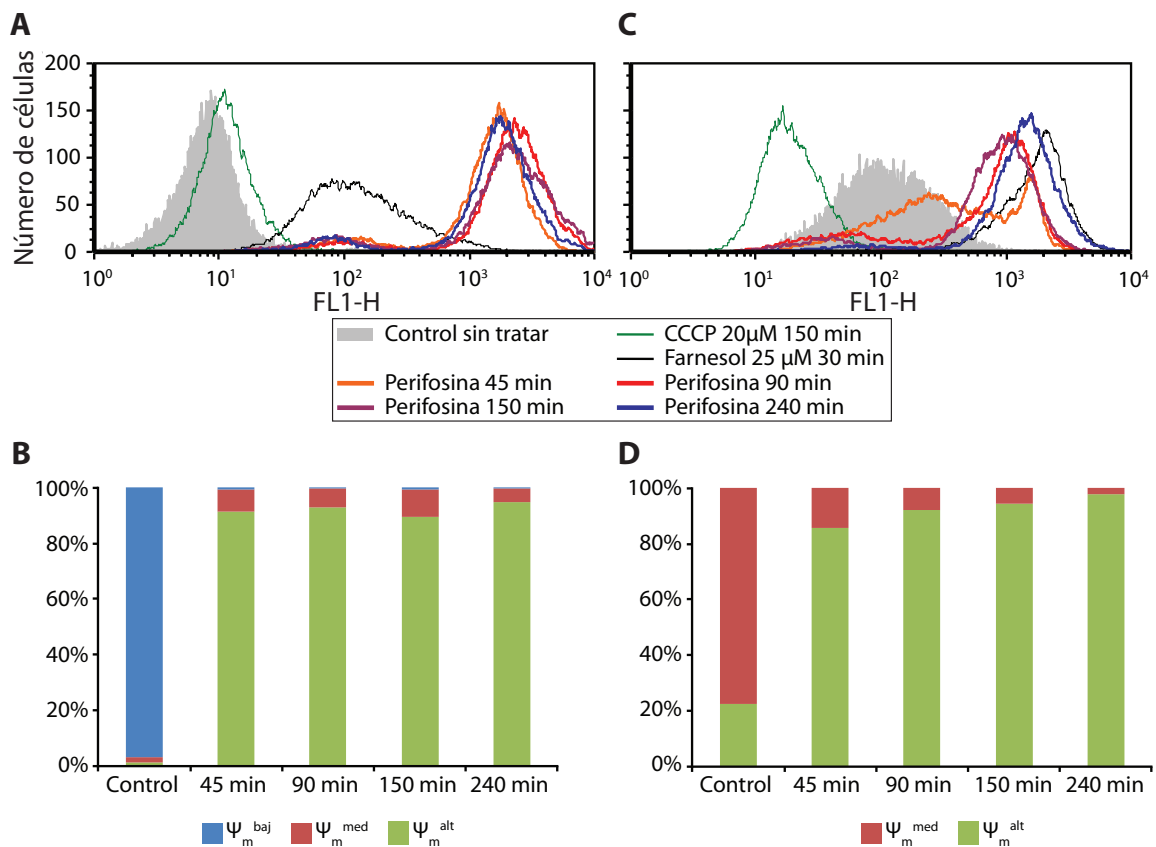


Ilustración 64: incorporación de DiOC₆(3) en células tratadas con perifosina 10 μ M en medio con glucosa (A, B) o con glicerol (C, D). A, C: histogramas representativos. FL1-H: fluorescencia del DiOC₆(3), en unidades relativas. B, D: cuantificación de las células (promedio de tres experimentos).

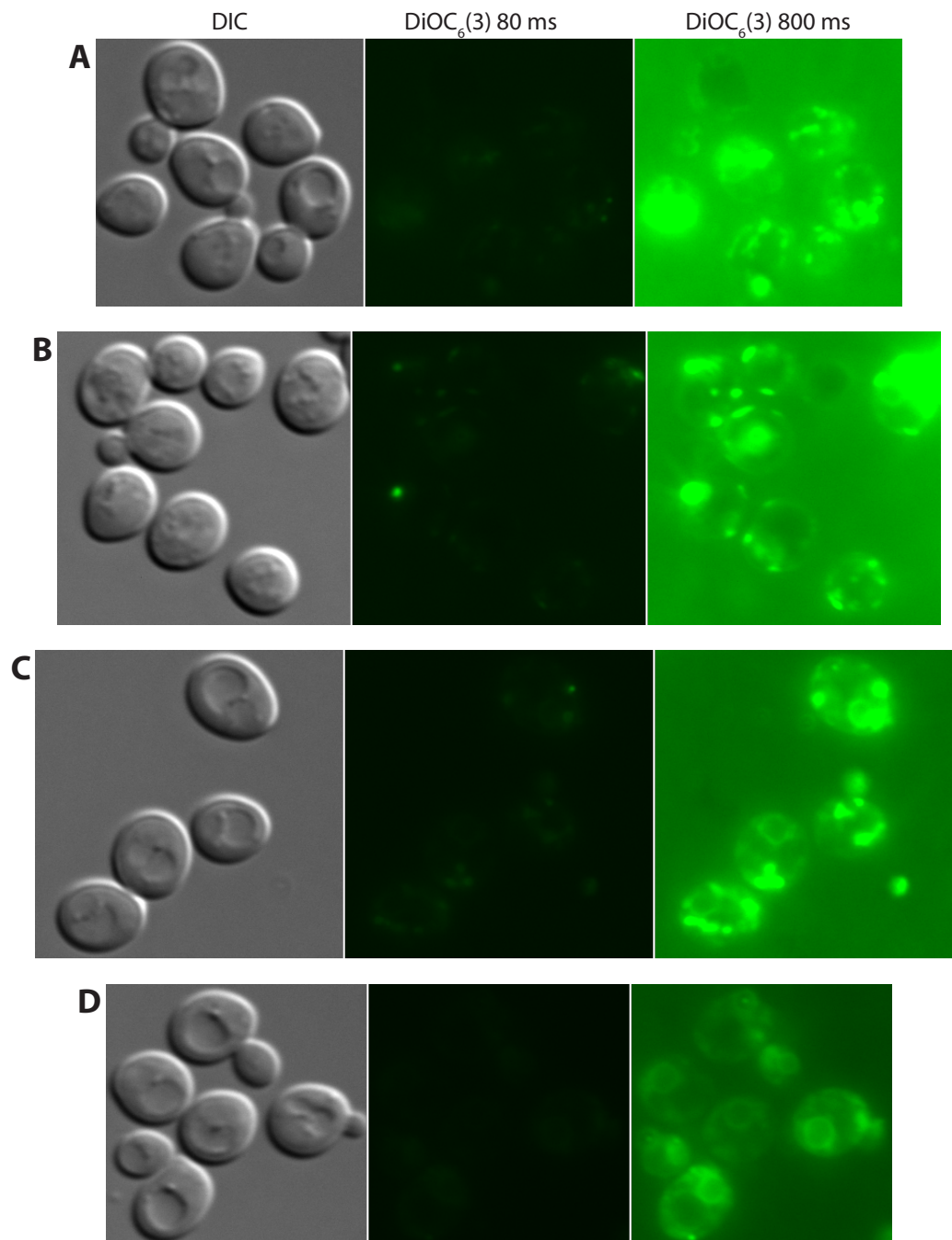


Ilustración 65: incorporación de DiOC₆(3) a estructuras celulares, tratamientos con 10 μM perifosina. Tratamientos en medio con glucosa, 45 minutos (A) y 240 minutos (B). Tratamientos en medio con glicerol, 45 minutos (C) y 240 minutos (D).

Otros fenotipos de células tratadas con ATLs

Estrés del retículo endoplásmico

Durante los experimentos realizados para estudiar el potencial transmembrana mitocondrial se observó en algunas células acumulación de DiOC₆(3) en estructuras identificadas por su morfología con el retículo endoplásmico. Este orgánulo también había sido identificado como el compartimento

donde se internaliza y acumula la edelfosina (ver *Localización subcelular de edelfosina*). En experimentos previos del laboratorio se comprobó que la edelfosina se acumula, en determinadas líneas celulares derivadas de tumores sólidos, en el RE⁴⁴. Dicha acumulación indujo marcadores de estrés de RE, liberación de calcio al citosol y apoptosis⁴³. La misma acumulación de edelfosina, estrés de RE y toxicidad celular se observó en líneas derivadas de tumores de páncreas⁴⁵; también se observó en dichas líneas desregulación del calcio celular, aunque en este caso se dio un aumento de su concentración en el RE. Se planteó por tanto la hipótesis de que al menos la edelfosina pudiera provocar parte de su toxicidad a través de un efecto directo en el RE.

Si un ATL provocara estrés de RE que a su vez causara toxicidad celular, la inducción con otro agente de un estrés de RE no tóxico podría afectar a la sensibilización de células frente al ATL. El agente empleado fue ditiotreitól (DTT), un agente reductor que interfiere en la formación de puentes disulfuro en el RE, provocando estrés de RE y activando la respuesta de proteínas mal plegadas⁴⁰⁸. El tratamiento con 5 mM de DTT no interfirió en la viabilidad celular en controles en medio sólido (ilustración 66 A). La toxicidad de los ATLs a concentraciones capaces de inhibir parcialmente el crecimiento de células WT BY4741 (ilustración 66 A, -) se incrementó ligeramente en presencia de DTT (ilustración 66 A, +DTT). Este efecto fue específico de la combinación de DTT y ATLs, pues no se dio en el mutante de incorporación de ATLs *lem3Δ*. Estos resultados se reprodujeron de manera más apreciable en medio líquido. 6 μ M de edelfosina, que provocaba un ligero retraso en el crecimiento en células WT, fue más tóxica en cotratamiento con DTT, y 8 μ M de edelfosina, en presencia además de DTT, prácticamente detuvieron el crecimiento (ilustración 66 A). 2 y 3 μ M de miltefosina también provocaron una inhibición parcial del crecimiento, pero en presencia de DTT éste prácticamente se detuvo (ilustración 66 C). El efecto del DTT fue únicamente visible en combinación con ATLs: la combinación de cualquiera de los dos ATLs con DTT en la cepa *lem3Δ* no inhibió el crecimiento más que el tratamiento únicamente con DTT (ilustración 66 B, D). Aunque el DTT por sí sólo provocó un ligero retraso del crecimiento durante las primeras 8 horas, tras 24 horas las células tratadas con DTT habían alcanzado una DO semejante al control (ilustración 66 B, D). A 24 horas, sin embargo, la inhibición del crecimiento provocada por el cotratamiento de DTT y ATLs era significativamente mayor que la inhibición observada en los tratamientos sólo con ATLs. Puede concluirse por tanto que la inhibición del crecimiento provocada por la combinación de DTT y ATLs es mayor que la combinación de las inhibiciones provocadas por cada compuesto por separado. Esto parece corroborar la hipótesis de que uno de los mecanismos de acción de edelfosina y miltefosina es provocar un estrés de RE. Es interesante destacar que no se detectó acumulación del análogo fluorescente de la miltefosina en el RE, por lo que el estrés de RE observado no necesariamente es una consecuencia de un efecto directo del compuesto sobre el orgánulo.

Se buscó confirmar la inducción de estrés de RE por ATLs mediante la observación directa de una actividad asociada a dicho estrés. Las proteínas entran a la vía secretora en el RE, y en

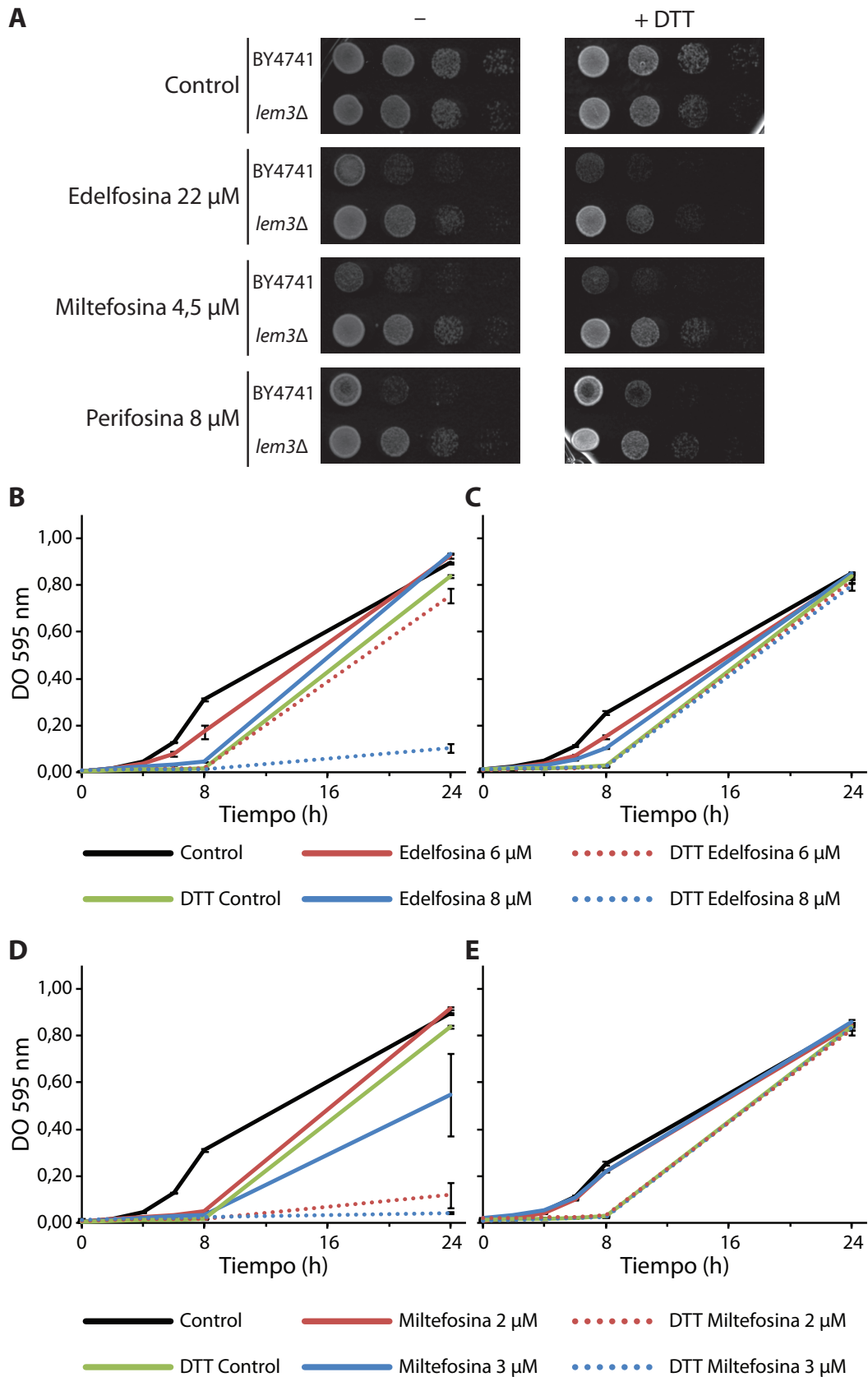


Ilustración 66: incremento de la toxicidad de ATLs mediante coincubación con DTT. **A:** diluciones seriadas de suspensiones celulares transferidas por réplica a placas con las concentraciones indicadas de ATLs \pm DTT 5 μ M. **B-E:** curvas de crecimiento en medio líquido en presencia de las concentraciones indicadas de ATLs \pm DTT 5 mM. Promedio de 3 experimentos \pm EEM. **B, D:** cepa WT (BY4741). **C, E:** mutante *lem3Δ*.

este orgánulo tiene lugar su correcto plegamiento y primeras modificaciones posttraduccionales. Las situaciones que impiden este proceso provocan estrés de RE y, como consecuencia, se induce el factor de transcripción Hac1p que activa la vía de señalización de respuesta de proteínas mal plegadas (UPR)⁴⁰⁹. El factor de transcripción activa los efectores de la UPR, encargados de promover el plegamiento de proteínas o facilitar la degradación de los péptidos mal plegados acumulados, restaurando de esta manera la homeostasis del RE. Por tanto, la activación de la UPR es indicativa de estrés de retículo. El reportero UPR-RFP, consistente en un promotor con cuatro elementos de unión a Hac1p seguido de una proteína fluorescente, ha sido empleado para monitorizar la activación de la UPR⁴¹⁰. Se observaron por microscopía de fluorescencia, empleando unas condiciones y tiempos de exposición constantes, células transformadas con dicho plásmido y tratadas con ATLS (ilustración 67 A). En el control sin tratar la fluorescencia basal fue muy reducida, y el tratamiento con DTT 2 mM por 4 horas indujo una fuerte señal, de acuerdo a lo descrito anteriormente⁴¹⁰. Se apreció en los tratamientos con 10 μ M de los 3 ATLS empleados un progresivo aumento de la fluorescencia; no obstante, la intensidad fue muy baja incluso tras 4 horas de tratamiento, y mucho menor que la provocada por el DTT. La cuantificación de la fluorescencia pudo realizarse en base a los histogramas de los píxeles las imágenes tomadas (ilustración 67 B). En el tratamiento con DTT se distinguió claramente un pico correspondiente a las células con alta intensidad de fluorescencia. Las células poco fluorescentes, casi indistinguibles de la fluorescencia de fondo, se agruparon en el otro extremo del histograma. Debido a la baja fluorescencia observada en todos los tratamientos con ATLS apareció únicamente este pico en las intensidades menores, y fue muy difícil apreciar diferencias. Un análisis detallado de la región de menores intensidades sí reveló un ligero desplazamiento del histograma a 240 minutos de tratamiento con edelfosina, miltefosina y, de manera más evidente, con perifosina (ilustración 67 C-E). Este aumento de la fluorescencia podría ser indicativo de activación de UPR en respuesta al tratamiento con ATLS. Sin embargo, tal activación parece ser mucho menos intensa que la producida por DTT. Sería necesario realizar nuevos experimentos empleando un mayor tiempo de exposición y condiciones más adecuadas para células muy débilmente fluorescentes. Esto permitiría un mayor contraste entre las células y el fondo y generaría histogramas más anchos, permitiendo apreciar desplazamientos de los mismos en la comparación de distintos tratamientos.

Fragmentación vacuolar

Durante la realización de otros experimentos se había apreciado una reducción de las vacuolas, visibles por DIC, en las células tratadas con ATLS. Para confirmar tal supuesto se trataron las células con FM 4-64, transfiriéndose posteriormente las células a medio fresco para permitir el transporte y acumulación del marcador desde la MP a las vacuolas. Para comprobar que la mera presencia de FM 4-64 en las vacuolas no alteraba su morfología, dos muestras se incubaron 60 y 240 minutos con medio fresco y se emplearon como controles. En otras muestras se añadieron al medio fresco los

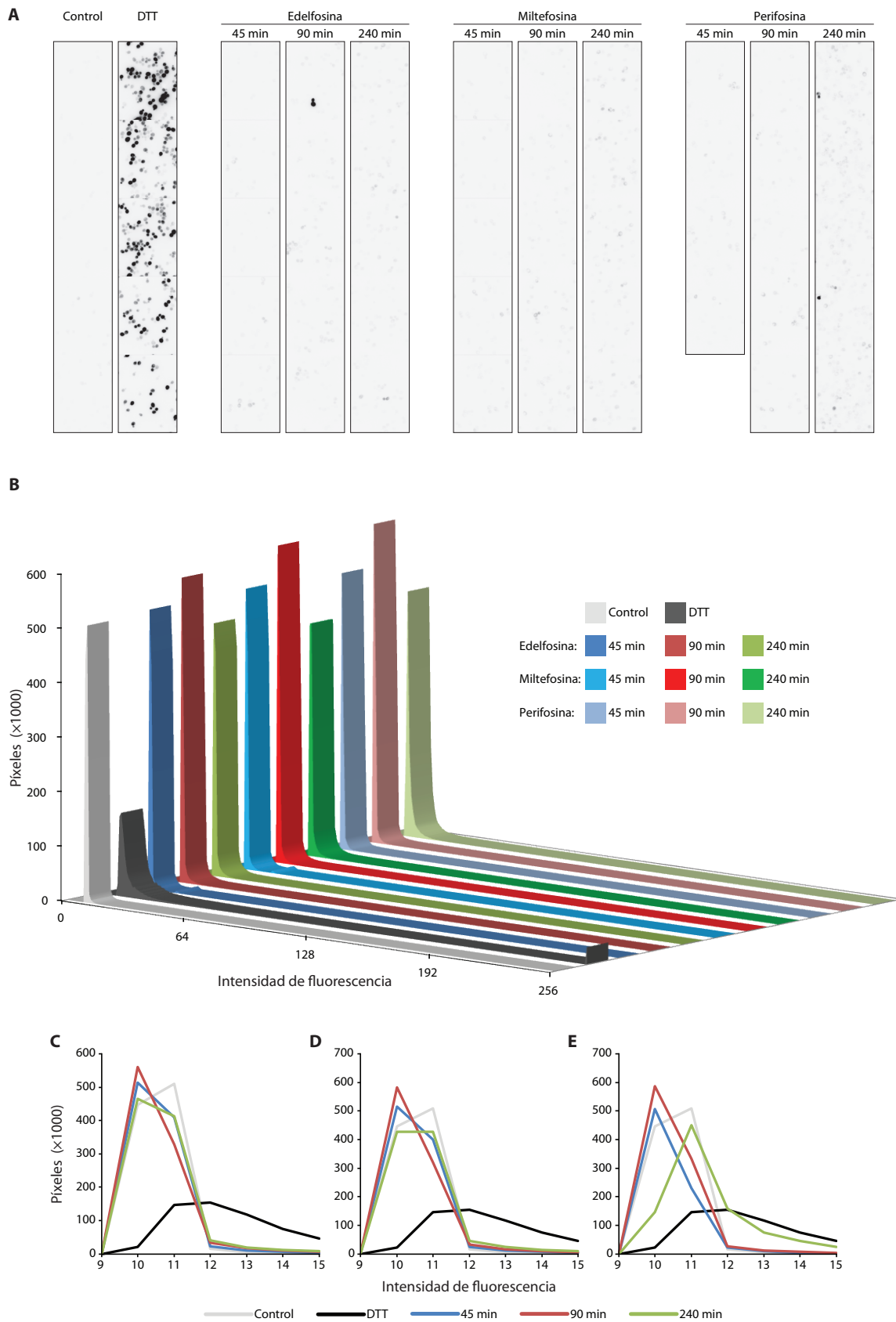


Ilustración 67: activación de UPR en los tratamientos con 10 μ M ATLs. **A:** fluorescencia de las células en los tratamientos indicados. Imágenes compuestas a partir de cinco campos independientes y tomadas con las mismas condiciones. **B:** histogramas de las imágenes mostradas en A. La región correspondiente a los valores más bajos de intensidad de fluorescencia se muestra en detalle en C (histogramas de edelfosina), D (histogramas de miltefosina) y E (histogramas de perifosina).

ATLs indicados. Las células se observaron por microscopía de fluorescencia y se cuantificaron las células con el número de vacuolas indicado.

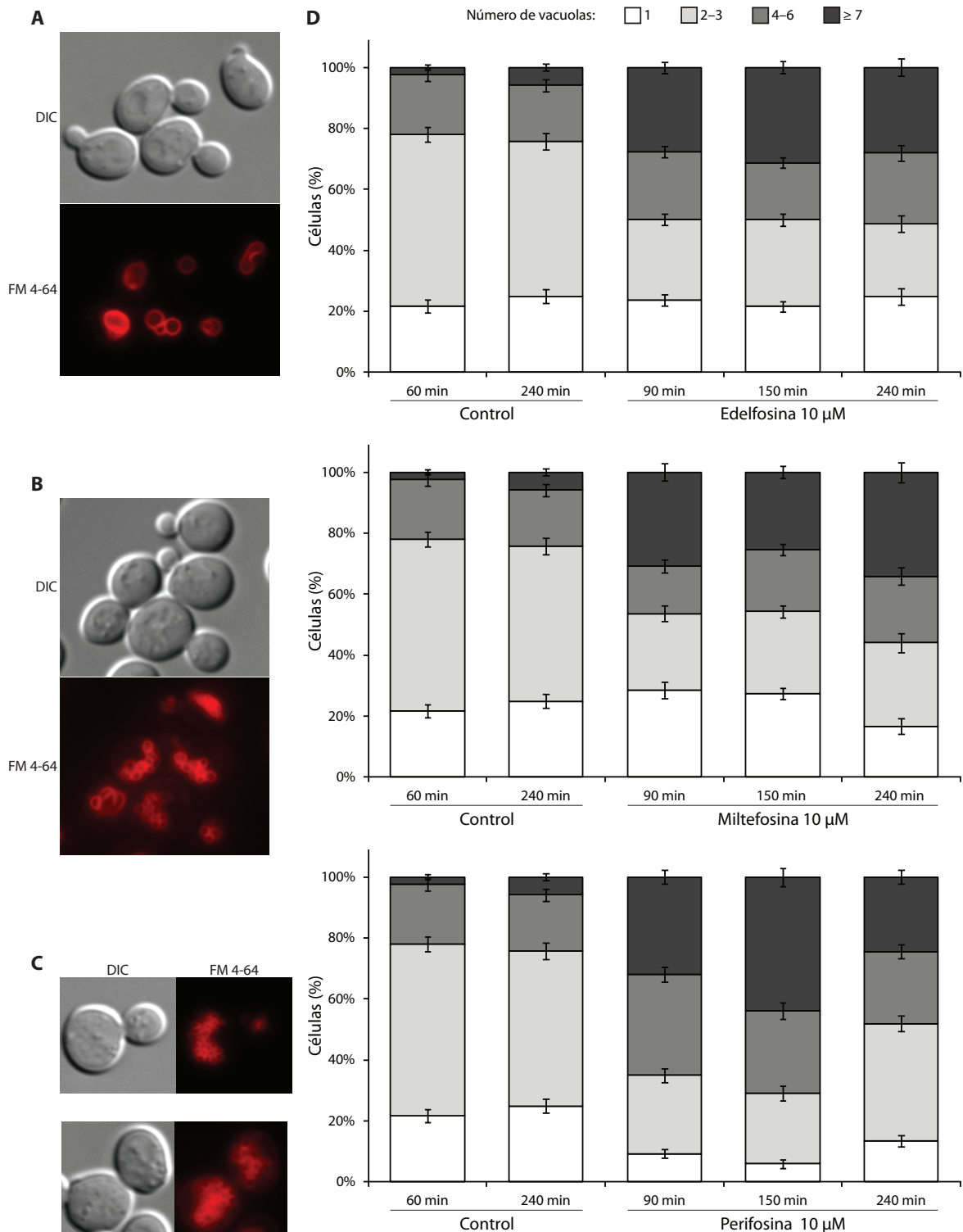


Ilustración 68: fragmentación vacuolar en los tratamientos con ATLs. Mediante el marcaje vacuolar con FM 4-64 (A-C) se pudo distinguir el número de vacuolas de cada célula: en los controles (A) predominaban células con < 3 vacuolas, mientras que en los tratamientos (B, perifosina 10 µM 150 min) predominaban las células con muchas vacuolas. C: fenotipo de múltiples vacuolas más extremo observado. D: cuantificación del número de vacuolas por célula observado en los tratamientos indicados. Promedio de 200-500 células ± EEM.

Las células sin tratar presentaron, mayoritariamente, una única vacuola o 2-3 vacuolas (ilustración 68 A, C). El aspecto de las células teñidas durante 60 y 240 minutos con FM 4-64 fue esencialmente idéntico (ilustración 68 D, *Control*), indicando que las diferencias entre los tratamientos con ATLS a distintos tiempos no eran debidas a la incubación con el marcador fluorescente. Los tratamientos llevaron a una fragmentación de la vacuola en múltiples cuerpos de menor tamaño (ilustración 68 B). En el fenotipo de fragmentación vacuolar más extremo se apreciaron múltiples vacuolas de pequeño tamaño agrupadas (ilustración 68 B, célula superior; C). Estos cúmulos presentaban un aspecto arracimado, las vacuolas individuales eran difícilmente distinguibles y la densidad de fluorescencia era mayor en el centro del cúmulo, lo que sugiere que se trataba de acumulaciones tridimensionales con una mayor densidad de vacuolas en el centro. Las células con 7 o más vacuolas se incrementaron ya a los 90 minutos de tratamiento con los tres ATLS (ilustración 68 D). No se observó una relación clara entre la duración del tratamiento y una mayor fragmentación vacuolar.

Marcadores de apoptosis de levadura

Se denomina apoptosis al conjunto de alteraciones morfológicas provocadas por la activación de un tipo específico de muerte celular programada³¹⁸. Las células apoptóticas se redondean y encogen, su núcleo se fragmenta, su membrana plasmática sufre la externalización de fosfatidilserina y formación de yemas, que pueden llegar a separarse y formar estructuras limitadas por membrana (cuerpos apoptóticos). En la activación y regulación de la apoptosis puede intervenir una clase de proteasas denominadas caspasas.

La apoptosis ha sido descrita en procesos de organismos multicelulares, como el desarrollo ontogénico, maduración del sistema inmune o respuesta a daño en los tejidos o a infección. Más recientemente se describió un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que mostraba varios fenotipos clásicamente asociados a la apoptosis³¹⁰. Estos fenotipos fueron posteriormente observados en respuesta a diversas condiciones y compuestos químicos, y se caracterizaron varios mecanismos moleculares que provocan su aparición. Uno de estos mecanismos fue la metacaspasa (*MCA1*), representante en levadura de una familia homóloga y distantemente relacionada con las caspasas⁴¹¹. Se observó una correlación entre la actividad de la metacaspasa y la aparición de los fenotipos apoptóticos de levadura, indicando que los mismos estaban regulados por un programa genético en el que intervenía *MCA1*³¹². El mutante *mca1Δ* se identificó en el *screening* como resistente a edelfosina. Por otra parte, múltiples estudios de apoptosis en levadura describen implicación mitocondrial en este proceso y producción de ROS^{314,412}, como se observó con el tratamiento con edelfosina. Por tanto, se planteó la hipótesis de que podría inducir apoptosis en levadura y así producir su efecto citotóxico.

Una de los fenotipos asociados con la apoptosis de levadura es la alteración morfológica del núcleo. Se observó la morfología nuclear en células fijadas y teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), un compuesto fluorescente que se une al ADN. Los núcleos mostraron un aspecto redondeado,

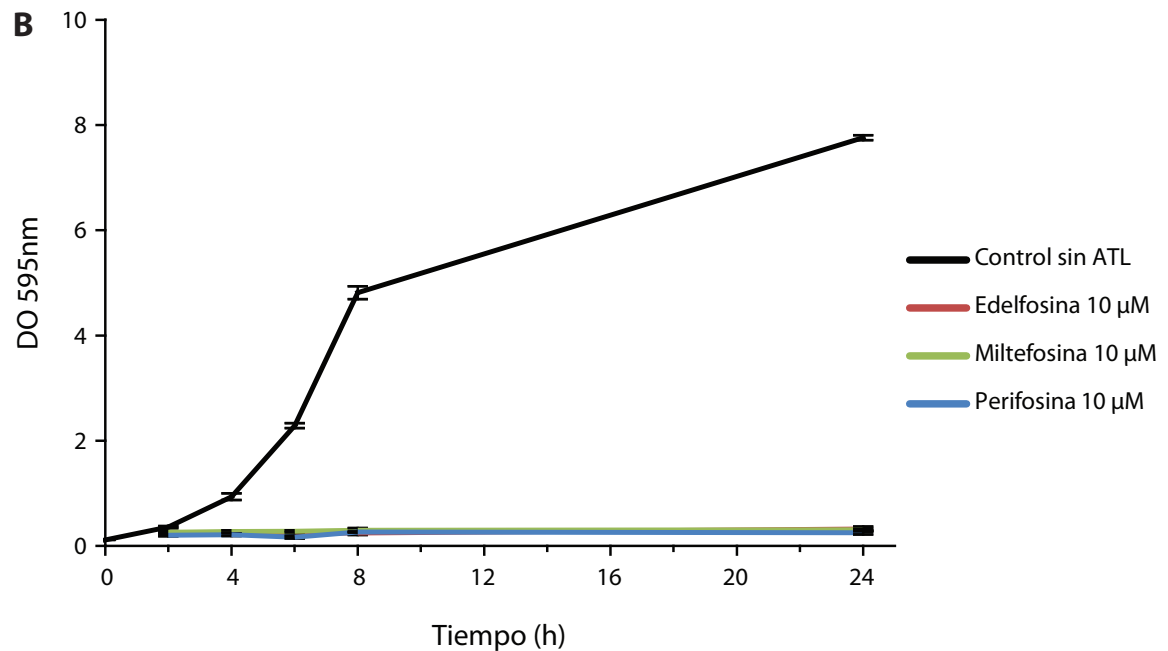
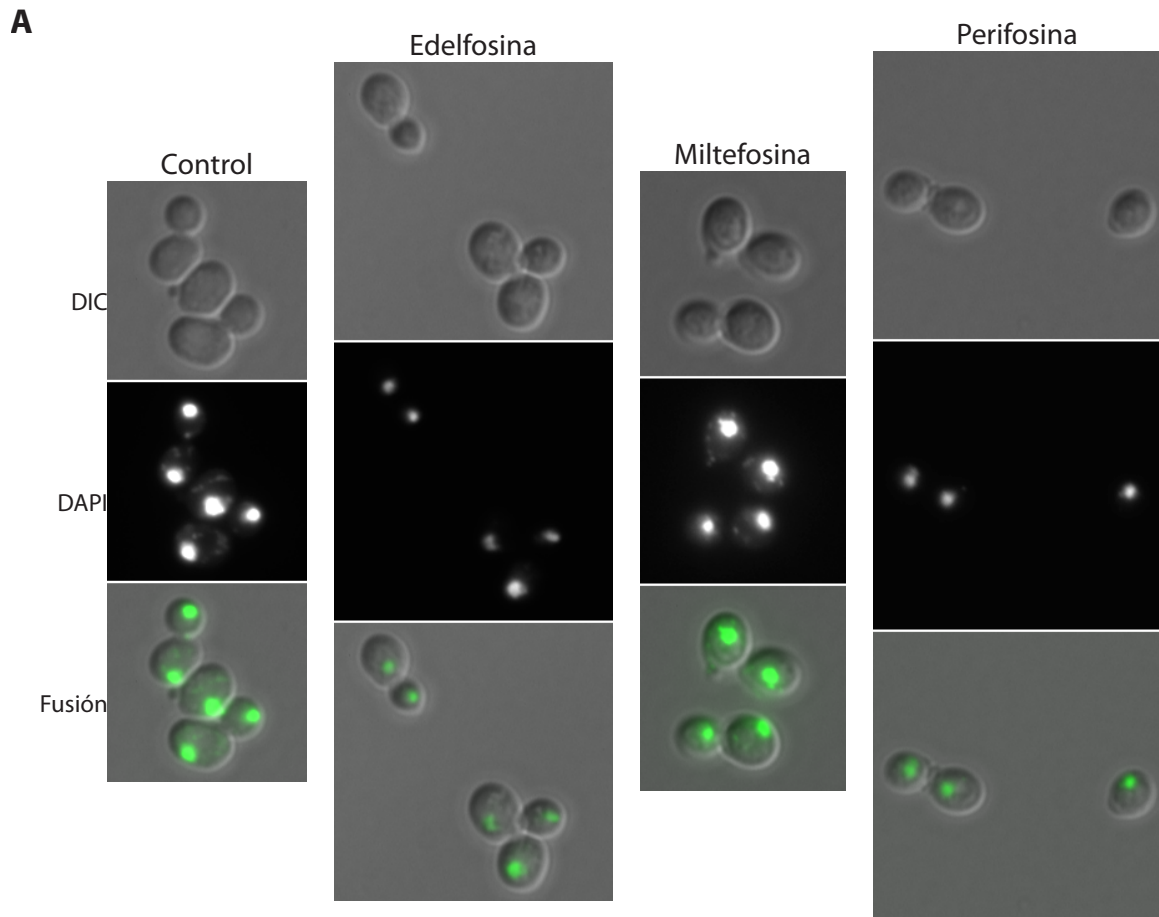


Ilustración 69: los tratamientos con ATLs no provocaron fenotipos apoptóticos de levadura. **A:** tinción nuclear con DAPI de células control (sin tratar) o tratadas 180 min con 10 µM de los ATLs indicados. **B:** curva de crecimiento de células cotratadas con el inhibidor de caspasas zDdbmk y los ATLs indicados. Promedio de tres experimentos independientes ± EEM.

observándose puntos más tenues en la periferia celular correspondientes al ADN_{mit} (ilustración 69 A). Ninguno de los ATLS estudiados, a 10 µM, provocaron alteraciones morfológicas del núcleo como las descritas en estudios de apoptosis en levadura³¹⁰ (ilustración 69 A). También se ha descrito que inhibidores irreversibles específicos de la actividad caspasa eran capaces de reducir la apoptosis en levadura³¹². Se trataron células con el inhibidor de caspasas de amplio espectro zDdbmk⁴¹³ y 10 µM de los ATLS indicados, y se monitorizó el crecimiento celular. Se observó que el inhibidor de caspasas no fue capaz de contrarrestar la toxicidad de los ATLS (ilustración 69 B). Hay que señalar sin embargo que estudios recientes discuten la capacidad de esta proteína de degradar sustratos de caspasas, lo que a su vez pone en entredicho la implicación de Mca1 en procesos de muerte celular programada en levadura⁴¹⁴⁻⁴¹⁷. No se identificaron por tanto ninguno de los fenómenos asociados con apoptosis en levadura tras el tratamiento con ATLS. El papel de Mca1 en la toxicidad por edelfosina posiblemente no se deba a su posible implicación en apoptosis, sino a una función alternativa de la proteína.

Screening de sobreexpresión

El *screening* de mutantes resistentes a edelfosina y miltefosina proporcionó la información inicial sobre los mecanismos de toxicidad de estos compuestos, determinando las posteriores líneas de investigación. Con el fin de complementar estos resultados mediante una estrategia alternativa se realizó un *screening* de sobreexpresión. Este enfoque podría conducir a la identificación de nuevos genes implicados en los procesos de toxicidad o confirmar la implicación de procesos conocidos. El *screening* de sobreexpresión se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Scott E. Erdman de la universidad de Syracuse (Nueva York, EE. UU.). Para la primera parte del aislamiento de plásmidos, realizada durante una estancia en su laboratorio, se contó con la asistencia de Jihad Ben Gabr (tabla 4, serie E). Esta primera fase condujo al aislamiento de seis supresores de la sensibilidad. Además de una segunda fase del *screening*, la comprobación de todos los candidatos y la secuenciación de los plásmidos confirmados se realizaron en nuestro laboratorio.

Condiciones del screening

La estrategia seguida en este experimento fue la opuesta a los *screenings* que empleaban la colección de mutantes de delección. El aumento de la dosis génica conlleva un incremento en los productos del gen. Cuando estos productos interaccionan con un compuesto exógeno, dicho incremento puede modificar la sensibilidad al compuesto, dando lugar a un fenotipo detectable⁴¹⁸. Se generó una colección de células que sobreexpresaban uno o varios genes, y se cribaron aquellos

clones con un crecimiento en presencia de ATLS distinto de la cepa WT. La sobreexpresión de un gen que provoca un aumento de la sensibilidad al ATL (cepas hipersensibles o ATL^S) puede indicar la participación del gen en el mecanismo de toxicidad; este supuesto sin embargo no puede asumirse automáticamente, ya que con los niveles fisiológicos de expresión de dicho gen (los presentes en la cepa WT) la aportación del gen a la toxicidad final puede ser irrelevante. Los genes cuya sobreexpresión aumenta la resistencia a ATLS (cepas resistentes o ATL^R) pueden señalar qué procesos contrarrestan la toxicidad por los compuestos. Por tanto, la identificación de ambos tipos de genes podría facilitar la identificación de los mecanismos y rutas implicados en la toxicidad.

La sobreexpresión de un gen concreto se consiguió mediante el aumento de su dosis génica (el número de copias de dicho gen presentes en la célula). Se empleó como vector para los genes el plásmido YEp351, con secuencias derivadas del plásmido natural 2 μ que le permiten replicarse autónomamente en células de *S. cerevisiae* y mantener un elevado número de copias⁴¹⁹. La genoteca 2J351 se construyó insertando en dicho plásmido fragmentos del genoma de levadura de alto peso molecular (6 kb de promedio), generados por digestión parcial de ADN genómico⁴²⁰. Por tanto se desconocen tanto el número de plásmidos distintos presentes en la genoteca como qué genes exactos están presentes en un plásmido concreto. La colección de cepas empleadas en el *screening* se obtuvo transformando la genoteca en la cepa BY4741, empleándose como WT la misma cepa transformada con el plásmido YEp351 vacío. Una vez aislados los clones ATL^{R/S} se recuperaron los plásmidos que portaban para, posteriormente, analizarlos e identificar los genes presentes en los mismos.

La respuesta frente a ATLS de los clones se realizó en medio sólido. Los primeros clones (tabla 4, series E y A) se cultivaron en parches sobre medio sólido sin compuesto y fueron transferidos por réplica en placa a medio sólido con el ATL correspondiente, incluyéndose como controles la cepa WT y el mutante resistente *lem3* Δ . Sin embargo, el número de células transferidas fue muy variable con esta técnica, por lo que no fue posible en muchos casos hacer una réplica homogénea en las placas con ATLS. Esto aumentó la dificultad de distinguir entre parches que crecen (clones resistentes) y parches que no (clones sensibles). Para superar esta limitación se modificó la técnica en un segundo grupo de candidatos (tabla 4, serie B). Los clones se cultivaron primero en medio líquido hasta saturación. Se transfirió luego el mismo volumen de cultivo a una placa de medio sólido sin compuesto –en la que se comprobó que se partía de semejantes densidades celulares para todas las cepas analizadas– y a placas con ATLS, en las que se identificaron aquellas cepas con un crecimiento mayor que los controles (clones resistentes). Esta técnica también permitió identificar, en placas con concentraciones subletales de ATLS, clones hipersensibles con un crecimiento menor a los controles (tabla 4, serie H). El fenotipo de las cepas candidatas aisladas por cualquiera de las técnicas se confirmó posteriormente y se comprobó que se debía a la presencia del plásmido candidato. Los plásmidos que llegados a este punto se confirmaron como supresores de la toxicidad a ATLS (habría realmente que hablar de activadores de la toxicidad para la serie H de clones hipersensibles) fueron secuenciados.

Tabla 4: resumen del número de plásmidos identificados mediante las distintas metodologías en el *screening* de sobreexpresión.

| Serie | Clones analizados | Candidatos | Supresores confirmados |
|-------|-------------------|------------|------------------------|
| E | 10.039 | 54 | 6 |
| A | 1.596 | 23 | 4 |
| B | 1.372 | 34 | 9 |
| H | | 18 | 12 |
| Total | 13.007 | 129 | 31 |

Identificación y análisis de los genes presentes en los plásmidos

Los límites de tiempo no permitieron realizar un *screening* exhaustivo. Únicamente dos de los plásmidos fueron identificados más de una vez: E159 (idéntico a E189) y A21 (idéntico a B31). Aunque esto confirmó que los criterios aplicados para distinguir clones resistentes eran consistentes, también indicó la reducida potencia estadística del experimento. La probabilidad, al examinar clones de la genoteca, de dar con un inserto concreto (o de dar varias veces con el mismo) aumenta con el número de clones procesados. En general, cuanto mayor es el número de clones examinados, mayor es la probabilidad de haber examinado todos los insertos disponibles en la genoteca al menos una vez. El número de clones N que deben analizarse para asegurar, con una probabilidad P , que un inserto genómico cualquiera va a estar incluido en esos N clones viene dado por la ecuación⁴²¹ $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \frac{\text{inserto}}{\text{genoma}}\right)}$.

Con un tamaño medio de inserto de 6 kb⁴²⁰ y un tamaño de genoma de 12.068 kb²⁹⁵, para $P = 0,95$ el número de clones necesario es $N = 6024$. Para $P = 0,999$ el número de clones necesario es $N = 13.890$. Por tanto, en el *screening* se realizó una cobertura del genoma muy reducida: no pudo asegurarse con certeza estadística que se examinaran todos los genes del genoma ni, por tanto, los supresores identificados representarían todos los genes cuya sobreexpresión genera resistencia (o sensibilidad) frente a ATLS. Los supresores identificados fueron únicamente una muestra aleatoria del total de esos genes, y al no ser necesariamente representativos, un análisis estadístico de las categorías funcionales más frecuentes tendría un sesgo, por lo que no se llevó a cabo. La excepción fue la serie E, en la que se analizaron 10.039 clones. A pesar de una cobertura del genoma suficiente, el cribado de clones resistentes tuvo deficiencias debidas a la inexperiencia, dado que la serie E fue la primera realizada. Esto se reflejó en el bajo rendimiento de identificación de supresores, y de hecho supresores identificados en posteriores series no aparecieron en la serie E. Por lo tanto, tampoco los genes aislados en la serie E fueron una muestra representativa.

Los genes incluidos en fragmentos cromosómicos que portan los 31 supresores confirmados se recogen en la tabla 5. Dado que los fragmentos presentes en la genoteca se generaron de manera aleatoria (mediante digestión parcial de ADN genómico), algunos de ellos de hecho no portaban un gen completo (E81, E188, B5, B13). En el resto de insertos se encontró al menos un gen completo, portando siete de los plásmidos un único gen (E198: *TVP15*; A21: *SUB2*; B4: *IMA3*; B12: *APT2*; H4:

PMC1; H7: *UBC8*; H15: *MIH1*), lo que permitió asociar la resistencia observada a la sobreexpresión del mismo. En el resto de casos sería necesario subclonar por separado cada gen presente en el supresor para verificar si su sobreexpresión es la causante del fenotipo. Teniendo esto presente, se identificaron sin embargo de manera preliminar algunos genes potencialmente interesantes, de confirmarse que ellos provocan el fenotipo. *PDR3* (supresor E145) es un factor de transcripción de la respuesta pleiotrópica a drogas. Uno de los mecanismos activados por esta respuesta son los transportadores ABC que expulsan diversas moléculas de la célula. Se ha descrito que la edelfosina es un sustrato de estos transportadores³⁰², y una mayor resistencia a edelfosina en mutantes de ganancia de función de *PDR1* y *PDR3*¹⁰¹. La sobreexpresión de *PDR3* y un aumento consiguiente de la respuesta pleiotrópica a drogas podrían por tanto explicar la resistencia a ATLS.

Uno de los mecanismos de toxicidad por ATLS propuestos en este trabajo implica tráfico vesicular a través del endosoma. Varios de los supresores identificados portan genes implicados en procesos de transporte, que podrían ser el mecanismo por el que estos supresores incrementan la resistencia a ATLS. *Tvp15p* (E198) se asocia con *Tlg2p* en las vesículas intermedias entre el endosoma y el AG⁴²². *Tvp18p*, otra proteína asociada en ese mismo complejo⁴²², se identificó además en el supresor B2. Otros genes que intervienen en tráfico vesicular son *AGE1* (supresor B11)¹⁸² y *MDR1* (supresor B25)⁴²³. Los cuatro genes presentes en el supresor E150 pertenecen a la familia DUP240⁴²⁴. Se cree que interaccionan con proteínas del coatómero⁴²⁵, por lo que podrían participar en procesos de tráfico vesicular. El complejo p24 también interacciona con proteínas del coatómero⁴²⁶, y uno de sus miembros (*ERP4*) se identificó en el plásmido H1 que incrementa la sensibilidad a ATLS.

Un segundo proceso implicado en la toxicidad por ATLS es el mantenimiento de la homeostasis del pH, en el que participa la ATPasa vacuolar. Los mutantes de delección de subunidades de la v-ATPasa son hipersensibles a edelfosina. En dos de los supresores identificados se encuentran genes de subunidades de la v-ATPasa: A5 (*VMA3*) y B25 (*VMA21*)³⁶⁴. Por lo tanto, la sobreexpresión de los plásmidos podría conducir a un aumento de la función de la v-ATPasa y así incrementar la resistencia a edelfosina. Hay que señalar también el plásmido H4, que incrementa la sensibilidad a ATLS, porta únicamente el gen *PMC1*, que codifica una bomba de Ca²⁺ vacuolar.

El papel de la mitocondria en la toxicidad de ATLS se ha postulado también en este trabajo. Varios de los supresores portan genes mitocondriales que podrían interactuar con dicho mecanismo. *NDE1* (supresor B29) codifica una de las tres NADH:ubiquinona oxidoreductasas mitocondriales de *S. cerevisiae* y tiene como función la reoxidación del NADH producido durante la glucólisis²⁸⁸. Curiosamente también se identificó otra de las oxidoreductasas (*NDE2*²⁸⁸) en el supresor A21, aunque el gen está truncado en el inserto (falta la región promotora y los primeros 22 codones de la región codificante). El plásmido H18, que incrementa la sensibilidad a ATLS, porta el gen *RIP1*, que codifica uno de las subunidades catalíticas del complejo III de la cadena de transporte de electrones.

Tabla 5: localización y genes presentes en los insertos contenidos en los plásmidos supresores confirmados. Los asteriscos indican que los genes no se encontraron completos en los insertos.

| Plásmido | Cromosoma | Localización | Genes |
|-------------|-----------|---------------------|--|
| E81 | IX | 101.929–104.456 | <i>ASG1*</i> |
| E93 | V | 282.098–287.816 | <i>YER064C, ICL1</i> |
| E145 | II | 215.383–220.581 | <i>SLA1*, LDB7, PDR3</i> |
| E159 (E189) | I | 184.665–189.577 | <i>YAR028W, YAR029W, PRM9, MST28</i> |
| E188 | mit | 39.000–40.500 | <i>COB*</i> |
| E198 | IV | 654.000–656.600 | <i>BMH2*, TVP15, ARX1*</i> |
| A1 | V | 268.061–275.360 | <i>RPL34A, HMF1, PET117, PCL6, FCY21*</i> |
| A5 | V | 100.705–103.083 | <i>VMA3, SNU13, YEL025C*</i> |
| A17 | XIV | 736386–746953 | <i>MNT4, FRE4, YNR061C, YNR062C, YNR063W</i> |
| A21 (B31) | IV | 303275–306555 | <i>NDE2*, SUB2</i> |
| B2 | XIII | 405.295–411.350 | <i>UBX4*, AVO2, NAT5, MOT3, TVP18</i> |
| B4 | IX | 15.911–21.962 | <i>VTH1*, IMA3, HXT12</i> |
| B5 | XIV | 389.061–390.037 | <i>SPC98*, ESBP6*</i> |
| B11 | IV | 1.486.374–1.489.682 | <i>SPS1*, AGE1, YDR524W-C</i> |
| B12 | IV | 1.344.095–1.345.974 | <i>DOT1*, APT2, SSN2*</i> |
| B13 | XVI | 531.062–533.969 | <i>RRP12*, TAF3*</i> |
| B25 | VII | 688.634–698.800 | <i>TEL2*, MDR1, PCP1, YGR102C, NOP7, SRB5, VMA21</i> |
| B28 | | 541.862–545.894 | <i>GAT2*, PSO2, CIN4</i> |
| B29 | | 551.065–559.319 | <i>RPS16A, YMR144W, NDE1, TIF34, YMR147W</i> |
| H1 | XV | 354.326–361.212 | <i>YOR011W-A, YOR012W, RTS1, ERP4</i> |
| H2 | IV | 412.983–420.248 | <i>GPM2, RPN4, OSH2*</i> |
| H3 | II | 552.432–557.979 | <i>SLI15*, ICS2, AMN1</i> |
| H4 | VII | 484.851–489.970 | <i>PMC1</i> |
| H5 | II | 83.510–88.673 | <i>ILS1*, SSA3, AAR2, RPS8A*</i> |
| H6 | XIII | 104.032–111.077 | <i>ATP18*, YML081W, DUS1, YML079W, CPR3*</i> |
| H7 | V | 130.481–134.463 | <i>UBC8, GLC3*</i> |
| H8 | XV | 683.106–686.628 | <i>YOR186W, TUF1, MSB1*</i> |
| H10 | V | 443.964–454.512 | <i>YER138C*, RTR1, YER140W, COX15*</i> |
| H15 | XIII | 341618–346362 | <i>MIH1, MSN2*</i> |
| H17 | XV | 894.066–898.609 | <i>SNU66, NOP58</i> |
| H18 | V | 104.992–112.364 | <i>YEL025C*, RIP1, YEL023C, GEA2*</i> |

Resistencia a ATLS por sobreexpresión de *AGE1*

Tras la realización del *screening* de sobreexpresión se realizaron experimentos para determinar qué papel tenía el supresor B11 en la toxicidad por ATLS. De los dos genes completos que porta B11, YDR524W-C es un marco abierto de lectura teórico (detectado por análisis informático) que codificaría una proteína de sólo 29 aminoácidos. Resulta más probable que la resistencia se origine por la sobreexpresión de *AGE1*, una ArfGAP que promueve el tráfico vesicular del TGN. En relación con esta posible función, se había observado hipersensibilidad a edelfosina del mutante en la fosfolipasa

D *spo14Δ*, y también se observó hipersensibilidad a miltefosina y perifosina (ilustraciones 70 y 71). La fosfolipasa D promueve la curvatura de las membranas internas y, así, la formación de vesículas en el TGN. Por tanto, es posible que ambos fenotipos reflejen una supresión de la toxicidad por ATLS mediada por un proceso de tráfico vesicular en el TGN: promoviéndolo (sobrexpresión de B11) disminuiría la toxicidad, mientras que reprimiéndolo (delección de la fosfolipasa D) potenciaría el efecto de los compuestos.

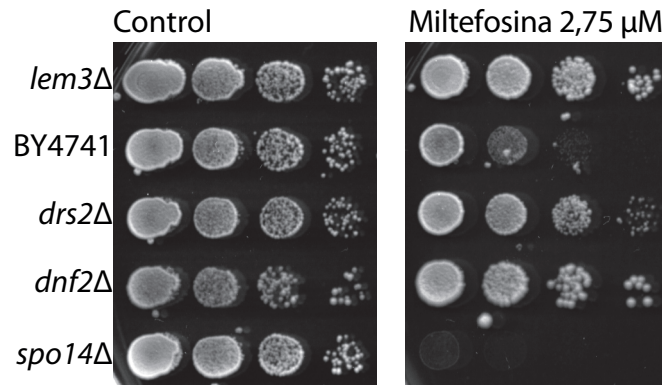


Ilustración 70: hipersensibilidad de la cepa *spo14Δ*. Se incluyen también la cepa silvestre BY4741 y tres mutantes resistentes como controles.

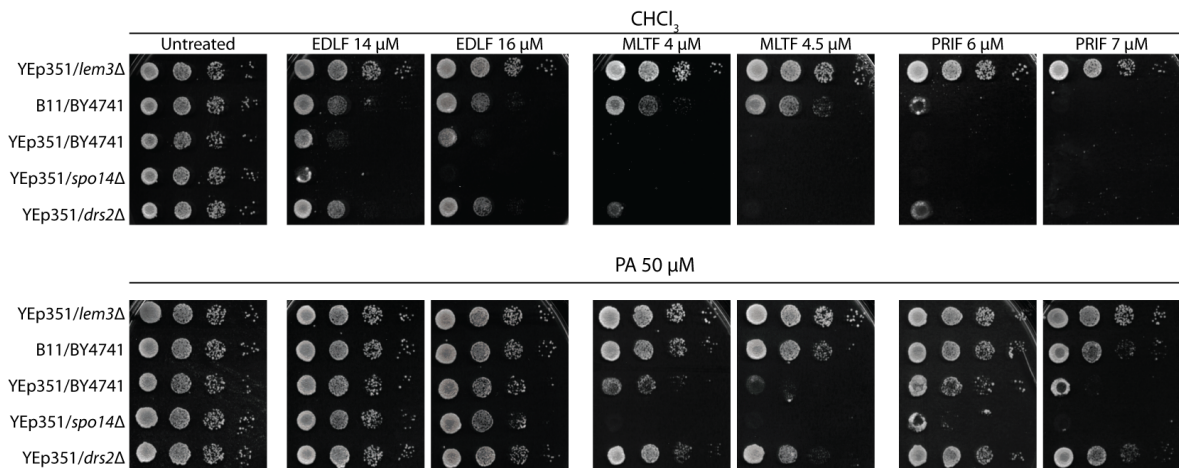


Ilustración 71: resistencia a ATLS inducida por el supresor B11 y por ácido fosfatídico. EDLF: edelfosina. MLTF: miltefosina. PRIF: perifosina. Junto a la cepa silvestre BY4741 transformada con B11 y el plásmido vacío YEp351, se incluyen también dos mutantes resistentes (*lem3Δ*, *drs2Δ*) y uno hipersensible (*spo14Δ*) transformados con YEp351. Se añadió a las placas ácido fosfatídico (PA) disuelto en cloroformo (fila inferior) o una cantidad equivalente únicamente del vehículo (fila superior).

Se comprobó también el efecto de suplementar el medio de cultivo con ácido fosfatídico, el producto de la fosfolipasa D y un lípido que promueve el transporte vesicular. El ácido fosfatídico fue capaz de inhibir la toxicidad de los tres ATLS en la cepa silvestre y de aliviar parcialmente la sensibilidad de la cepa *spo14Δ* a, al menos, edelfosina y perifosina (ilustración 71). También incrementó la resistencia proporcionada por el plásmido B11 (ilustración 71), y se ha demostrado que Age1p interacciona con diacilglicerol (que se deriva del ácido fosfatídico). Estos resultados sugieren que

un proceso de transporte aún por determinar en el TGN contrarresta la toxicidad a ATLS. Otro gen relacionado con el transporte en el TGN es la flipasa de membranas internas Drs2p, que también se ha propuesto como un inductor de la curvatura necesario para la formación de vesículas en el TGN. Sin embargo, y al contrario de lo observado con la fosfolipasa D, el mutante *drs2Δ* es resistente a ATLS (ilustración 71). Son por lo tanto necesarios experimentos mucho más detallados para confirmar e identificar el proceso de transporte que se opone la toxicidad por ATLS, y la relación del mismo con las proteínas que actúan en el TGN en la formación de vesículas.

Discusión

Genes que determinan la toxicidad a ATLs

Los genes fundamentales para la toxicidad por edelfosina participan en un número limitado de procesos celulares

Los genes identificados mediante sendos *screenings* de resistencia a dos ATLs, edelfosina y miltefosina, se han analizado en el presente trabajo. Un número semejante de mutantes resistentes fueron identificados en cada caso, 262 y 257 respectivamente. Una delección génica que provoca resistencia a un compuesto indica que para el mecanismo de toxicidad de dicho compuesto el gen mutado es fundamental. Sin embargo, no siempre es posible determinar a partir del gen mutado cuál es la función que se halla alterada y que es responsable de la resistencia: algunos genes cumplen funciones diversas, se desconoce completamente la función de otros y, en algunos casos, únicamente se conocen algunas características generales de su función pero no los detalles (por ejemplo, los restantes componentes celulares con que interacciona). Obtener conclusiones funcionales a partir de un mutante particular puede ser imposible; no obstante, el análisis en paralelo de todos los genes ofrece la alternativa de identificar características compartidas por varios de los genes, como localización, función bioquímica o participación en procesos celulares concretos. Si una de esas características identificadas no es verdaderamente relevante para la toxicidad, la frecuencia con la que aparece en los genes identificados en el *screening* será semejante a la que se observaría en una muestra aleatoria de genes. El caso contrario se daría en procesos celulares esenciales para el mecanismo de toxicidad del compuesto. Los procesos celulares implican generalmente varios genes, por lo que pueden verse

alterados a causa de distintas mutaciones. Se esperaría por tanto que esas distintas mutaciones tuvieran como resultado común la resistencia al compuesto. Como resultado, la participación en dicho proceso significativo para la toxicidad sería una característica asociada a varios de los genes identificados y se hallaría sobrerrepresentada en esa muestra de genes.

El análisis bioinformático permitió analizar qué características comunes a varios genes aparecían en ambos *screenings* y su enriquecimiento, señalando los procesos fundamentales para la toxicidad de cada compuesto. Sin embargo, la información revelada por este análisis fue mucho mayor en el caso de la edelfosina. Varios de los procesos enriquecidos en este *screening* estaban relacionados con la biosíntesis y maduración de proteínas o la reparación y mantenimiento de ADN (ilustración 23 A). Aunque no se puede descartar un papel importante de estos fenómenos en la toxicidad por edelfosina, se decidió no profundizar en los mismos al consistir en fenómenos muy generales y que podrían, a su vez, tener un efecto pleiotrópico que haría difícil precisar el origen de la resistencia de cada mutante. Otros procesos notablemente enriquecidos se recogieron en dos categorías, la de genes relacionados con tráfico vesicular a través del endosoma y genes mitocondriales. En el primer caso, diversos genes participan en los mismos complejos (retrómero, ESCRT) o se han descrito en la literatura existente en procesos comunes (endocitosis, maduración endosomal, reciclaje por transporte retrógrado). Del mismo modo, los genes mitocondriales se asociaron fundamentalmente a la cadena de transporte de electrones y la morfología del orgánulo. La prevalencia de estos procesos fue además coherente con los resultados de posteriores experimentos (internalización de Pma1, producción de ROS), confirmando la relevancia de estas dos características para la toxicidad de edelfosina. Mediante la combinación de ambos enfoques fue posible construir modelos globales del mecanismo de toxicidad de edelfosina. Un *screening* de mutantes hipersensibles a edelfosina fue igualmente revelador, y las funciones enriquecidas en el mismo fueron coherentes con estos modelos: ATPasa vacuolar, señalización por glucosa y metabolismo lipídico (ilustración 23 B), procesos que podrían explicarse a la luz de los modelos globales de toxicidad establecidos.

Un número reducido, de entre los mutantes resistentes a edelfosina o miltefosina, es resistente a ambos compuestos

El *screening* de resistencia a miltefosina fue menos informativo acerca de las funciones celulares implicadas en la toxicidad por este compuesto, y el análisis bioinformático reveló, entre los 257 genes identificados, muy pocos procesos enriquecidos. Al igual que con edelfosina, diversos genes estaban relacionados con fenómenos globales y potencialmente pleiotrópicos: biosíntesis de proteínas, reparación y mantenimiento de ADN y metabolismo (ilustración 23 C). El número de genes relacionados con la mitocondria fue menor con miltefosina, y no se observó enriquecimiento significativo en ninguna función mitocondrial concreta. Los genes relacionados con tráfico vesicular fueron un número semejante al del *screening* de edelfosina. El tráfico a través del endosoma se ha

relacionado, en el caso de la edelfosina, con la internalización de Pma1. Dado que este proceso también sucede en células tratadas con miltefosina, podría ser también relevante en la toxicidad de este último compuesto. Sin embargo, sólo uno de los procesos concretos asociados al endosoma o al tráfico vesicular (*Transporte retrógrado endosoma-aparato de Golgi*) mostró un enriquecimiento significativo. La mayoría de los genes endosomales no se asociaron mediante ninguna otra característica. Los genes relacionados con este proceso no fueron, en su mayoría, los mismos en ambos *screenings*. Una explicación podría ser que el transporte endosomal cumple, en la toxicidad por miltefosina, una función o funciones distinta de la planteada en el caso de la edelfosina. Otra alternativa sería que, debido a alguna dificultad metodológica durante la realización del *screening*, los resultados hubieran sido menos fiables. Una posibilidad para comprobar este supuesto sería comprobar de nuevo la resistencia a miltefosina del grupo de mutantes endosomales resistentes a edelfosina. Al ser un grupo reducido de mutantes, esto permitiría monitorizar la resistencia a miltefosina mediante técnicas más sensibles que las que fueron empleadas durante el *screening*, como curvas de crecimiento o réplicas en sólido de diluciones seriadas.

Se identificaron 50 genes cuya delección confiere resistencia tanto a edelfosina como a miltefosina. Entre estos 50 genes se encuentran los dos componentes de la flipasa de la membrana plasmática (*DNF2* y *LEM3*) cuya participación en la incorporación de ambos ATLs había sido descrita previamente. Entre los genes implicados en el transporte endosomal se encuentran los tres componentes del complejo de reconocimiento de carga del retrómero (*VPS26/PEP8*, *VPS29*, *VPS35*) y tres genes implicados en un paso posterior del transporte retrógrado, la fusión de las vesículas con el *transGolgi* (*VPS52*, *SWF1*, *TLG2*). También se identificaron varios componentes del ESCRT (*SRN2/VPS37*, *VPS20*, *BRO1*). El transporte a través del endosoma es por tanto un proceso importante en la toxicidad de ambos compuestos.

***Saccharomyces cerevisiae* es un modelo para el estudio de los mecanismos moleculares de incorporación de ATLs**

La actividad antitumoral de los ATLs es consecuencia de la activación de ciertos procesos celulares. Un paso esencial y previo a esta activación es la incorporación a la célula de los compuestos. La incorporación es además crítica para varios aspectos relevantes en el uso de los ATLs como posibles agentes terapéuticos. En primer lugar, la incorporación diferencial (en células tumorales y no en células sanas) determina la selectividad de los compuestos. Alteraciones en los procesos de

incorporación pueden también determinar la aparición de resistencia tras un tratamiento prolongado. La susceptibilidad de un fármaco a generar resistencia puede limitar su utilidad clínica real, pero conocer los mecanismos habituales de resistencia puede permitir evitar resistencias cruzadas o diseñar terapias combinadas que minimicen este efecto. Finalmente, la misma incorporación diferencial indica que existe una característica diferencial entre células tumorales y sanas que podría servir de diana molecular, con estos u otros compuestos. Por todos estos aspectos es crítico conocer cómo se incorporan los ATLS a las células.

Uno de los aspectos analizados en el presente trabajo es el mecanismo que emplea *Saccharomyces cerevisiae* para incorporar ATLS desde el medio extracelular. La incorporación es un paso imprescindible para la toxicidad en levadura: empleando el análogo fluorescente de edelfosina Et-BDP-ET se observó en los mutantes *lem3Δ* y *dnf2Δ*, resistentes al compuesto, una incorporación reducida (ilustración 24). En este sentido la levadura se comporta igual que las células tumorales, y podría ser un modelo para aquellos mecanismos de incorporación que se hallen conservados.

Los ATLS se incorporan a través de flipasas de membrana

El primer paso para la incorporación de fosfolípidos y moléculas análogas en levadura es la asociación de las moléculas con la cara extracelular de la membrana plasmática. Una flipasa transloca entonces los compuestos a la cara citosólica. La flipasa de la MP es un heterodímero compuesto por una ATPasa de tipo P4 como subunidad catalítica (codificada por los genes *DNF1* o *DNF2*)⁹⁶ y la subunidad accesoria necesaria para su localización y estabilidad *LEM3*⁹⁵. Hanson y colaboradores determinaron que este sistema mediaba la incorporación de ATLS al observar que la mutación *lem3Δ* confería resistencia a edelfosina y miltefosina¹⁰¹. Cabría esperar una resistencia semejante en los mutantes en las subunidades catalíticas, que ha sido observada recientemente por Baldrige y Graham para la cepa *dnf1Δ*¹⁰². El *screening* de resistencia aquí presentado confirma que la cepa *dnf2Δ* es también resistente a edelfosina y miltefosina. No se identificó en el *screening* la cepa *dnf1Δ*. Sin embargo, la flipasa de la MP tiene dos posibles subunidades catalíticas, y se ha demostrado que *DNF2* es más importante que *DNF1* en el transporte de análogos fluorescentes de fosfolípidos⁹⁶ o de lisofosfolípidos marcados radiactivamente¹⁰⁰. Los resultados obtenidos encajan por lo tanto con el modelo establecido por el que la flipasa de MP (compuesta por el heterodímero Lem3p/Dnf2p y, minoritariamente, Lem3p/Dnf1p) media la incorporación de ATLS.

La resistencia a ATLS observada en los mutantes de la flipasa de MP se había explicado previamente como consecuencia de un defecto en la incorporación de los mismos. No obstante, no se había observado directamente tal defecto en la incorporación de edelfosina, que en estos mutantes se había observado con otros análogos de la fosfatidilcolina^{96,100}. Mediante el empleo de análogos fluorescentes de edelfosina se ha confirmado aquí que los mutantes resistentes *lem3Δ* y *dnf2Δ* presentan una reducida incorporación respecto a las células WT (ilustración 24). La incorporación

de estos análogos mimetiza la de los ATLS originales, ya que se ha podido confirmar empleando edelfosina marcada radiactivamente que el mutante *lem3Δ* presenta una reducida incorporación. Existe además una buena correlación entre la incorporación (*lem3Δ* < *dnf2Δ* << WT, ilustración 24) y la sensibilidad de las tres cepas a edelfosina (ilustración 20 A), lo que confirma que la incorporación es esencial para la toxicidad de estos compuestos en *S. cerevisiae*.

Los ATLS son transportados desde la membrana plasmática al retículo endoplásmico y/o a la vacuola

Tras la incorporación a la capa citosólica de la MP los análogos fluorescentes de la edelfosina son internalizados a estructuras internas. Las estructuras más frecuentemente observadas por microscopía de fluorescencia son dos, y presentan morfología anular. Se ha identificado una de ellas como la membrana vacuolar, al ser este orgánulo visible en las imágenes correspondientes de microscopía DIC. La otra estructura se corresponde con el retículo endoplásmico, como puede comprobarse por colocalización con los marcadores fluorescentes del RE Elo3GFP y Sec63GFP, o por ser la estructura anular que envuelve el núcleo, indicado por el marcador nuclear Sik1RFP (ilustración 26). La acumulación en el RE aparece en la mayoría de las células, con o sin acumulación en la vacuola simultáneamente. Sin embargo, la deficiente fluorescencia de los análogos empleados hizo difícil esta cuantificación. Una alternativa podría ser realizar experimentos de fraccionamiento celular para separar el RE de otras membranas y cuantificar, con edelfosina marcada radiactivamente, la acumulación en cada orgánulo del compuesto. Esta estrategia permitiría confirmar los resultados y determinar con precisión el porcentaje promedio de edelfosina que se asocia a cada orgánulo.

No fue posible observar, ni siquiera tras incubaciones muy cortas con los análogos, una acumulación de los análogos fluorescentes de edelfosina en la MP. Sin embargo, un análogo fluorescente de miltefosina si se acumuló en la MP tras 5 minutos de incubación (ilustración 29). Tras un tratamiento más prolongado fue posible observar acumulación de dicho análogo en las vacuolas, pero no en el RE. Por tanto, los ATLS están sujetos a procesos de transporte tanto al RE como a la vacuola. En el mutante *lem3Δ* no se observó acumulación en ninguno de los dos orgánulos, lo que indica que la flipasa actúa con anterioridad a estos mecanismos de transporte, a los que expone los ATLS.

La incorporación de edelfosina y miltefosina presenta dos diferencias fundamentales. El análogo fluorescente de miltefosina se acumula en la MP antes de acumularse en estructuras internas, mientras que nunca llega a observarse en ese compartimento acumulación de los análogos fluorescentes de edelfosina. El tránsito de la edelfosina por la MP es por tanto más rápido que el de la miltefosina. Por otro lado, los dos ATLS parecen tener distintas afinidades por los mecanismos de transporte: mientras que la edelfosina es transportada tanto a la vacuola como al RE, la miltefosina no se acumula en cantidades significativas en el RE. Una posible vía de transporte a la vacuola es la vía endocítica:

los ATLS incorporados a la MP se incorporarían a las vesículas endocíticas, posteriormente a los endosomas y finalmente se acumularían en la vacuola. Bajo esta hipótesis, la acumulación de la miltefosina en la MP a tiempos cortos de tratamiento, y en las vacuolas a tiempos más largos de tratamiento, indicaría que la vía endocítica es un mecanismo de transporte de ATLS “lento”. La falta de acumulación de la edelfosina en la MP se debería a la presencia de un mecanismo alternativo de transporte de ATLS “rápido”, causante de la acumulación en el RE.

El modelo postulado, por tanto, es que la flipasa de la MP expone los ATLS a dos posibles mecanismos de transporte: la vía endocítica, mediante el cual se acumula el compuesto en la vacuola, y un mecanismo no endocítico, mediante el cual se acumula el compuesto en el RE. Existen alternativas a este modelo. Los ATLS podrían ser transportados secuencialmente de un orgánulo al otro. La falta de acumulación de miltefosina en el RE excluiría el transporte MP → RE → vacuola. Otra secuencia podría ser MP → vía endocítica y, desde ésta, transporte al RE (únicamente la edelfosina) o a la vacuola (edelfosina y miltefosina). Esto no explicaría sin embargo la acumulación en la membrana plasmática de la miltefosina pero no de la edelfosina. Con relación a esta hipotética vía, una de las primeras hipótesis que se manejó fue que existiera un transporte vía endocítica → RE mediado por el retrómero. Este complejo participa en la recuperación de proteínas del endosoma y su reciclaje a la red del *trans*-Golgi, desde la cual podría haber vías de transporte retrógrado hasta el RE. Sin embargo, los análogos de edelfosina se acumulan en el RE en los mutantes del retrómero, sin diferencias respecto al tipo silvestre (ilustración 28). Se confirmó finalmente que el transporte al RE es independiente de la endocitosis monitorizando la incorporación simultáneamente de marcadores de endocitosis y de un análogo de edelfosina. Dos experimentos independientes en los que la endocitosis estaba reducida (células WT a 4 °C y un mutante *end4*, con un defecto en la vía endocítica) mostraron acumulación del análogo en el RE y ausencia de transporte de los marcadores de endocitosis (ilustración 27).

Estos experimentos apoyaron por tanto la idea de que existen dos vías de transporte de ATLS posteriores a la flipasa de MP: la vía endocítica (la vía “lenta”, a la vacuola) y otro mecanismo independiente (la vía “rápida” al RE). La independencia de ambas vías quedaría reflejada en sus distintas afinidades: la vía endocítica transportaría tanto edelfosina como miltefosina, mientras que la vía del RE sólo tendría afinidad por edelfosina. El transporte de edelfosina al RE se ha observado también en células tumorales, y su acumulación en el orgánulo se ha asociado con la aparición de un estrés en el RE. Este estrés induce apoptosis en algunos tipos tumorales a través de caspasa^{43,45} y se ha sugerido que podría activar la señalización proapoptótica mediante JNK⁴⁶. Por tanto, el transporte de ATLS al RE es de especial interés, y un posible mecanismo homólogo en levadura podría servir como modelo experimental.

Nichols y colaboradores han estudiado el destino de análogos fluorescentes de fosfolípidos tras ser incorporados desde el medio extracelular. La localización de un análogo de fosfatidilcolina

(NBDC₆-fosfatidilcolina, ver ilustración 5 D) es muy semejante a la de los análogos de edelfosina: en la vacuola y en el RE⁴²⁷. Con anterioridad al transporte a ambas localizaciones se produce la inserción del análogo en la MP y su translocación (*flip*); sin embargo, el transporte a la vacuola es dependiente de genes implicados en el transporte vesicular, mientras que el transporte al RE es dependiente de una proteína pero no del transporte vesicular⁴²⁷. A bajas temperaturas se bloquea el transporte a la vacuola, pero no al RE (al igual que se observó con el análogo de edelfosina PTE-ET). El transporte a la vacuola ocurre a través de un compartimento endosomal⁴²⁸. La similitud de los resultados del presente trabajo y los observados por Nichols y colaboradores sugieren que se trata, de hecho, de la misma situación, y refuerza la hipótesis anterior de las dos vías de transporte independientes.

Hay dos diferencias notables entre la internalización de edelfosina y del análogo de fosfatidilcolina. El primero compuesto se localiza en la membrana del orgánulo, mientras que el segundo se acumula en el lumen vacuolar. Los autores han explicado esta localización como una consecuencia de la degradación del análogo por enzimas vacuolares, liberándose al lumen vacuolar la cadena lateral portadora del fluoróforo⁴²⁷. Tal degradación no podría darse en los análogos de edelfosina al no ser el enlace éter hidrolizable. En segundo lugar, el transporte independiente de la ruta endocítica no llevaba únicamente a la acumulación del análogo en el RE, sino también en las mitocondrias. La localización de los análogos fluorescentes de edelfosina también se analizó junto con marcadores mitocondriales; sin embargo, y al contrario de lo observado por Nichols y colaboradores, no se observó una acumulación de edelfosina en la mitocondria de manera reproducible. Sólo se dio colocalización en casos muy puntuales, y en ningún caso se observó que los análogos de edelfosina se acumularan en estructuras morfológicamente semejantes a las mitocondrias. Los resultados no parecen sugerir que la edelfosina se acumule en las mitocondrias de levadura; no obstante, experimentos más sensibles (por ejemplo, tratamiento de las células con edelfosina marcada radiactivamente y aislamiento de la fracción mitocondrial de las células) serán necesarios para aclarar definitivamente este punto.

El posible mecanismo de transporte al RE es aún desconocido. El intercambio lipídico entre las membranas podría ocurrir por simple difusión, un mecanismo sugerido por Nichols para moléculas como la NBDC₆-fosfatidilcolina en virtud de la corta longitud de sus cadenas alifáticas⁴²⁹. Moléculas como los ATLS, con cadenas más largas, serían más hidrofóbicas, y el transporte espontáneo entre membranas a través de un medio acuoso sería energéticamente poco favorable. Una alternativa sería la participación de proteínas transportadoras de lípidos. En este sentido, se ha demostrado que el ergosterol es transportado entre el RE y la MP en ambos sentidos mayoritariamente por mecanismos no vesiculares. Se ha propuesto que proteínas de la familia *OSH* actúan como transportadores de ergosterol, aunque hay evidencias contradictorias⁴³⁰. Los fosfolípidos y moléculas análogas, como los ATLS, podría transportarse de manera semejante asociadas a proteínas específicas.

Es improbable que *S. cerevisiae* haya adquirido durante su evolución mecanismos de incorporación y transporte específicos para ATLS, que son compuestos sintéticos no presentes en la naturaleza. Riekhof y Voelker han propuesto que existen mecanismos en levadura que permiten el aprovechamiento como nutriente de la lisofosfatidilcolina (LPC) exógena. La fosfatidilcolina puede sintetizarse en levadura a partir de colina o por metilación de fosfatidiletanolamina, que a su vez se sintetiza a partir de etanolamina o serina. Otra ruta biosintética posible es la acilación de LPC (ilustración 4), un proceso energéticamente menos costoso. Durante el crecimiento de la levadura en materia orgánica en descomposición, la disponibilidad en el medio extracelular de LPC (o de fosfatidilcolina) permitiría por tanto su aprovechamiento directo como nutrientes, con el consiguiente ahorro energético. La flipasa de membrana anteriormente mencionada sirve como vía de entrada a la célula de LPC¹⁰⁰; de hecho ésta podría ser su principal función, con independencia de que participe en el mantenimiento de la asimetría lipídica de la MP en colaboración con otros transportadores. Una vez incorporada en la cara citosólica de la membrana, un ácido graso es transferido a la LPC para transformarla en fosfatidilcolina. Dado que la aciltransferasa Ale1p se encuentra en el retículo endoplásmico⁴³¹, esta transformación requiere una vía de transporte MP → RE que emplea mecanismos aún por determinar¹⁰⁰. La célula es capaz de incorporar y aprovechar la LPC a una velocidad que excede la síntesis normal de fosfatidilcolina, y de hecho parte de la LPC se cataboliza parcialmente a metabolitos de colina que pueden aprovecharse para la síntesis *de novo*, que también ocurre en el RE¹⁰⁰. Por tanto, la incorporación de LPC se asocia con su transporte al RE para formar una vía muy eficiente de aprovechamiento de este nutriente. Esta vía parece corresponderse con los procesos que sufre la edelfosina: incorporación a través de la flipasa de MP y transporte al RE. Dada la semejanza que la estructura molecular de la edelfosina presenta con la LPC (ilustración 5 B y C), podría ser sustrato de los mismos mecanismos que afectan a la LPC⁹⁴. Una vez localizada en el RE, sin embargo, los enlaces éter impedirían su degradación y transformación. La presencia de dos pasos distintos en esta vía explica además el comportamiento distinto de la miltefosina. Las diferencias estructurales entre edelfosina y miltefosina no serían relevantes en la flipasa de MP, y ambos ATLS compartirían esa parte inicial de la vía. Sin embargo, el mecanismo de transporte al RE sería sensible a esas diferencias, y sólo el ATL más semejante a la lisofosfatidilcolina sería transportado eficientemente al RE.

El transporte de la MP al RE también podría tener lugar en dominios específicos de ambos compartimentos que estuvieran próximos, lo que facilitaría el transporte entre los mismos. El retículo endoplásmico en levadura está formado, además de por una región perinuclear, por extensiones que irradian hacia la periferia y se localizan en la proximidad de la membrana plasmática, la región cortical. La función de este RE cortical no es bien conocida; sin embargo, se sabe que está enriquecido respecto al resto del RE en proteínas encargadas de la biosíntesis lipídica, lo que se cree que facilita la exportación de lípidos de nueva síntesis a la MP⁴³². El RE cortical podría así ser una plataforma que facilitara el intercambio lipídico con la membrana, y asociarse a proteínas transportadoras de lípidos.

La futura caracterización funcional del RE cortical podría por tanto revelar posibles candidatos a mediar el transporte de ATLS. Una posibilidad más para identificar este mecanismo sería cribar la colección de mutantes y aislar aquellos en los que los análogos de edelfosina se acumularan sólo en la vacuola y no en el RE. Sin embargo, la labilidad de los análogos convierte la adquisición de imágenes en un proceso laborioso y poco productivo, por lo que tal *screening* podría no resultar exitoso. Una estrategia más prometedora podría deducirse de los experimentos de Riekhof y Voelker, que sugirieron que la vía de transporte de edelfosina es la que sigue la lisofosfatidilcolina exógena. Una cepa auxótrofa para fosfatidilcolina es capaz de crecer en presencia de LPC, al incorporarla y transportarla al RE para convertirla en fosfatidilcolina; por tanto, mutaciones en esos dos procesos impedirían a la cepa crecer. Esta cepa podría emplearse para un *screening* de mutantes con defectos en el crecimiento en presencia de lisofosfatidilcolina en el medio. Estos mutantes serían candidatos para presentar también defectos en la incorporación o el transporte al RE de edelfosina.

AGP2 y DOC1 participan en la incorporación de edelfosina

El análisis de los mutantes resistentes a edelfosina con una reducida incorporación del compuesto permitió identificar qué genes eran esenciales para dicho proceso (ilustración 25). De los tres genes identificados, el papel de *LEM3* en la incorporación de edelfosina ya era conocido. Por el contrario, *AGP2* y *DOC1* participan en procesos aparentemente no relacionados con la incorporación y no se había descrito anteriormente en sus mutantes un defecto en la misma. Es destacable también que, al contrario de lo que ocurría con *lem3Δ* y *dnf2Δ*, *agp2Δ* y *doc1Δ* fueron resistentes sólo a edelfosina pero no miltefosina.

AGP2 codifica un transportador de aminoácidos putativo, situado en la membrana plasmática y que participa en la incorporación de distintos compuestos: aminoácidos (transporte de baja afinidad e inducible), carnitina, poliaminas y bleomicina A5 (una forma de bleomicina cuyo extremo amino terminal es idéntico a la poliamina putrescina)⁴³³⁻⁴³⁶. Debido a su diversidad de sustratos se ha sugerido que *AGP2* regula a otros transportadores además de, o en lugar de, ser un transportador en sí mismo⁴³⁵. Curiosamente, *agp2Δ* se identificó en otro *screening* que empleaba la colección de mutantes de delección, identificándose como mutante hipersensible a PAF (1-O-hexadecil-2-acetilglicerofosfocolina)⁴³⁷. De los diez mutantes hipersensibles a PAF identificados en dicho trabajo, tres aparecieron también mostraron hipersensibilidad a edelfosina (*bem1Δ*, *snf6Δ* y *spo14Δ*, ver tabla supl. 2), lo que sugiere que el mecanismo de acción de PAF y edelfosina está conservado parcialmente. *agp2Δ* fue, sin embargo, sensible a PAF y lisoPAF (1-O-hexadecilglicerofosfocolina), pero resistente a edelfosina. Las moléculas de PAF y lisoPAF son muy semejantes estructuralmente a la edelfosina, pero se desconoce si son también transportadas por la flipasa de la membrana plasmática. Los estudios existentes acerca de la función de *AGP2* son insuficientes para sugerir una función clara para este gen,

y por el momento no hay un modelo claro de cómo puede interactuar con el mecanismo de acción de edelfosina.

DOC1 codifica un adaptador del complejo promotor de la anafase. La función de este complejo multiproteico es la modificación por ubiquitinación de varias proteínas, promoviendo su degradación⁴³⁸. Entre sus sustratos se incluyen ciclinas, y a través de su degradación el complejo regula la progresión del ciclo celular. La mayoría de las subunidades del complejo son esenciales (*APC1/2/4/5/11*, *CDC16/20/23/27*), por lo que no aparecen en la colección de mutantes de delección. Doc1p participa en el reconocimiento por este complejo de sus sustratos⁴³⁹, y en este proceso coopera con Cdh1p, cuyo mutante también resultó ser resistente a edelfosina. No está claro el rol que estos genes pueden jugar en la incorporación de ATLS, ya que no tienen una relación funcional aparente con las flipasas conocidas. La función última del complejo es la regulación de la actividad de otras proteínas, lo que sugiere que Doc1p no es un transportador en sí mismo, pero participa en la regulación de un transportador.

AGP2 y *DOC1* participan en la incorporación de edelfosina y representan mecanismos no descritos anteriormente para este proceso. Los dos mutantes comparten además otra característica por la que son de especial interés: sus mutantes son resistentes a edelfosina pero no a miltefosina, mientras que los mutantes de la flipasa de MP presentaban resistencia a ambos ATLS. Estudios futuros deberían revelar más acerca del papel exacto que estos genes juegan en la incorporación de los ATLS. Doc1p participa en un complejo que regula a otras proteínas, y se ha sugerido que Agp2p podría actuar como regulador de otros transportadores. Una hipótesis a considerar es que Agp2p y Doc1p podrían intervenir en el transporte de edelfosina mediante la regulación de la flipasa de MP.

Relevancia fisiológica de la internalización de edelfosina al retículo endoplásmico

El transporte de edelfosina al RE no se ve afectado en mutantes del retrómero o en el mutante *end4^{ts}pep4Δ*, por lo que es independiente de la ruta endocítica. Sin embargo, en ambos casos la mutación provocó una resistencia a edelfosina. En el modelo más simple, la toxicidad de la edelfosina es consecuencia de la alteración de algún proceso biológico o una combinación de los mismos; por tanto, la ausencia de toxicidad implica que no se producen esas alteraciones. Según esta lógica, la acumulación de edelfosina en el RE no puede ser, en sí misma, la única alteración que provoca la toxicidad, al darse tal acumulación también en mutantes resistentes.

La independencia observada en el mutante *end4^{ts}pep4Δ* entre la internalización de edelfosina al RE y su defecto en endocitosis podría deberse a que ambos procesos son independientes. La resistencia de ese mutante y otros con defectos en endocitosis (*myo5Δ*, *end3Δ*, *ldb17Δ*, *rho4Δ*) indicarían que la endocitosis participa en un proceso esencial para la toxicidad del fármaco. La internalización al RE,

por su parte, podría tener varios papeles en la toxicidad final. Podría ser completamente irrelevante, representando únicamente un fenómeno secundario a los procesos que verdaderamente llevaran a la toxicidad celular (ilustración 72 A). No se puede descartar sin embargo que participe en la toxicidad final mediante algún mecanismo posterior a la internalización, o incluso que regule al mismo mecanismo en el que está implicada la endocitosis. Esta participación podría ser prescindible, con lo que el mecanismo responsable de la toxicidad procedería incluso en ausencia de internalización al RE (ilustración 72 B), o esencial, en cuyo caso ambos procesos serían fundamentales para la toxicidad celular (ilustración 72 C). Funcionalmente semejante a este modelo, el mecanismo dependiente de la endocitosis podría actuar después de la internalización al RE (ilustración 72 D). No puede

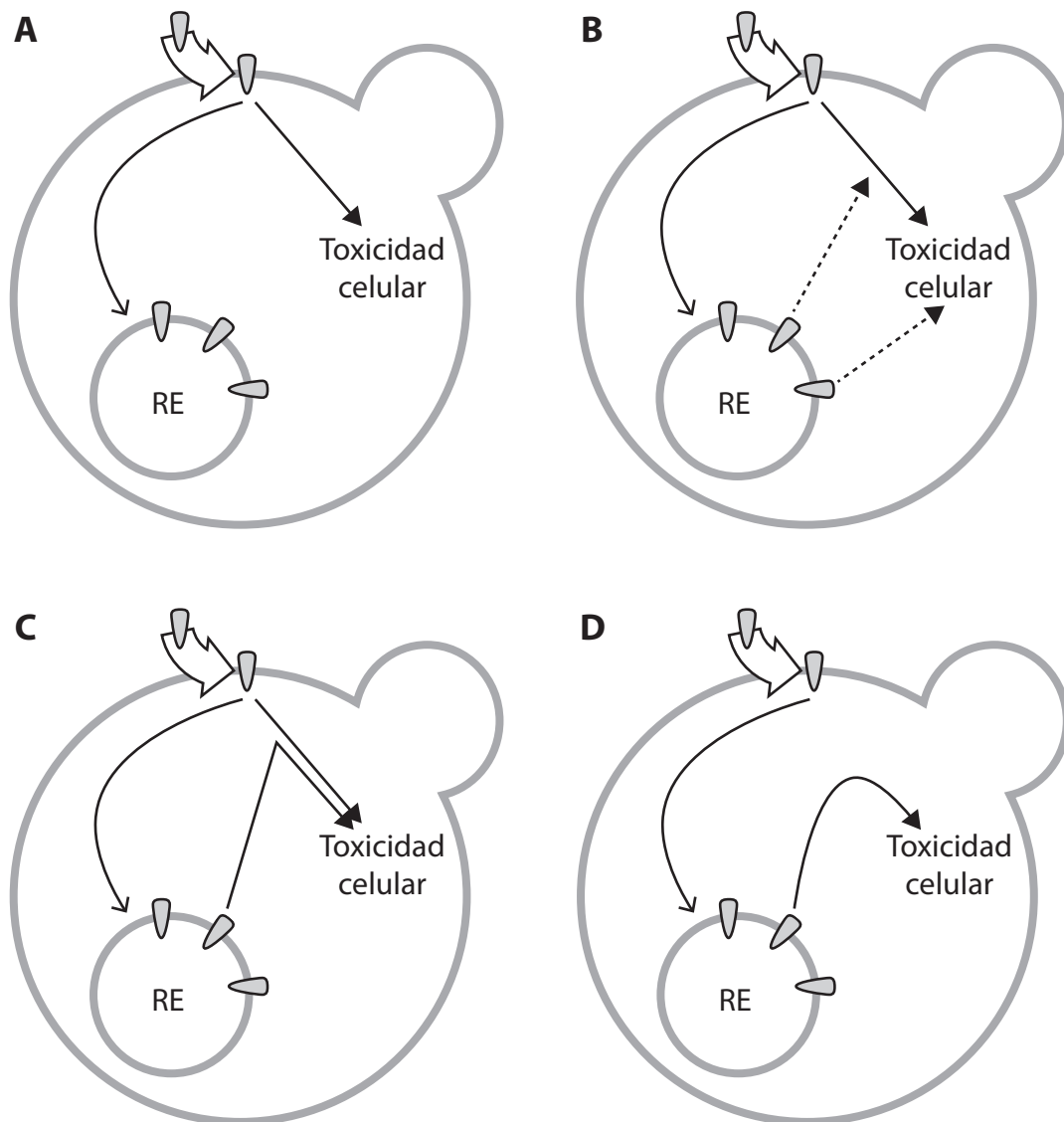


Ilustración 72: modelos de la relevancia de la internalización de la edelfosina al RE en la toxicidad final por este compuesto. Las dos flechas negras representan el proceso en el que participa la endocitosis (→) y el proceso de internalización de la edelfosina al RE (g). **A:** Modelo en el que la internalización es irrelevante para la toxicidad final. **B:** modelo en el que la internalización al RE participa en la toxicidad final –directamente o a través del proceso dependiente de la endocitosis– pero es prescindible para la misma. **C:** modelo en el que ambos procesos son paralelos y esenciales para la toxicidad. **D:** modelo en el que ambos procesos son esenciales y actúan consecutivamente.

concluirse ninguno de los modelos aquí presentados a partir de los datos de los que se dispone en estos momentos, y la relevancia de la internalización al RE de la edelfosina para la toxicidad sólo podría aseverarse si se identificara un mutante con un defecto en este proceso.

La sensibilidad al tratamiento con edelfosina aumenta ligeramente en presencia de DTT (ilustración 66), lo que podría indicar un papel para el estrés del RE en la toxicidad. Esta hipótesis sería de especial interés, ya que el estrés de RE es un determinante de la apoptosis inducida por edelfosina en varios tipos tumorales^{43,45}. Sin embargo, la relevancia de este mecanismo no ha sido suficientemente contrastada en los experimentos presentados en este trabajo. De hecho, si el estrés de RE contribuyera a la toxicidad por edelfosina, los defectos en la respuesta de proteínas mal plegada incrementarían la susceptibilidad de la célula al compuesto. Sin embargo, no se identificaron en el *screening* de sensibilidad mutantes en los genes fundamentales para dicha respuesta, *IRE1* y *HAC1*. Por tanto, las causas de la mayor sensibilidad en presencia de DTT deberán ser estudiadas con profundidad en el futuro. Con los resultados actuales es prematuro asumir que dicho estrés participa en el proceso de toxicidad por edelfosina.

Perspectivas del estudio de la incorporación de ATLS en células tumorales empleando la levadura como modelo

Se han propuesto para la incorporación de ATLS en células tumorales mecanismos endocíticos^{83,84} o independientes de endocitosis^{85,86}. Debido a la evidencia experimental a favor de cualquiera de los dos modelos se ha hipotetizado que ambos podrían participar en la incorporación, predominando uno u otro en función del tipo celular^{64,440}. Las observaciones aquí presentadas acerca de la incorporación de ATLS en levadura permiten reexaminar desde otra óptica estos resultados.

El grupo de Wim J. van Blitterswijk ha propuesto que en células S49 (derivadas de un linfoma murino) la incorporación de perifosina se produce fundamentalmente a través de una vía endocítica dependiente de *lipid rafts*⁸³. Este mecanismo fue posteriormente extendido a otros ATLS en células S49⁸⁷ y, para perifosina, a células HeLa⁹⁰ (derivadas de un carcinoma de cuello uterino). Han demostrado que la incorporación en estas células se reduce empleando los inhibidores de endocitosis monensina⁸³ o clorpromacina⁴⁴⁰, baja temperatura⁹⁰ (que bloquea la endocitosis) o un alelo dominante negativo de la dinamina⁹⁰. La incorporación era además bloqueada por depleción de colesterol o de esfingomielina, dos componentes de los *lipid rafts* en células de mamífero^{83,87}. De acuerdo con esto, se comparó la incorporación de marcadores de endocitosis en células S49 y en una línea derivada (S49^{AR}) que ha adquirido la capacidad de incorporar menos ATLS y, como consecuencia, se muestra resistente a los mismos. Se observó que los marcadores de endocitosis de fase fluida y dependiente de receptor eran idénticos en la línea resistente y en la sensible⁸³. En vista de esto se interpretó que la vía de entrada de los ATLS era la endocitosis mediada por LR, y de hecho se demostró posteriormente que la línea S49^{AR} poseía un defecto en la síntesis de esfingomielina⁴⁴¹, un componente de los LR.

Algunas cuestiones impiden interpretar estos resultados como evidencia inequívoca de internalización de los ATLS por endocitosis. En primer lugar, no se ha demostrado que la vía endocítica sea la única ruta de entrada de ATLS en las células estudiadas. Ni la depleción de colesterol o el tratamiento con inhibidores de la endocitosis en las células S49 ni la mutación presente en las células S49^{AR} logran disminuir completamente la incorporación de ATLS. En todas esas condiciones se mantiene un nivel mínimo de incorporación, que no es achacable a mecanismos endocíticos. Muñoz-Martínez y colaboradores también observaron, en una línea derivada de carcinoma humano (KB), un nivel basal de incorporación de perifosina que se mantenía incluso a baja temperatura, en presencia de inhibidores de endocitosis o depleción de colesterol⁹¹. Sin embargo, sí era posible abolir completamente la incorporación de marcadores de endocitosis con estos tratamientos⁹¹. Esto puede interpretarse como la presencia de dos mecanismos separados de incorporación en células KB (endocítico y no endocítico). Otra opción es que haya un único mecanismo, pero que su actividad pueda reducirse parcialmente mediante los inhibidores de endocitosis, la depleción de colesterol o la baja temperatura. De acuerdo con esta última explicación, los inhibidores de endocitosis y la depleción de colesterol bloquean la incorporación de manera semejante tanto a baja temperatura (en ausencia de endocitosis) como a 37 °C. Un candidato a mediar este transporte era una flipasa de MP. Analizando la actividad de esta flipasa midiendo la incorporación de un sustrato conocido de la misma (un análogo fluorescente de fosfatidiletanolamina) se demostró que la actividad de esta flipasa se reducía mediante el tratamiento con inhibidores de endocitosis o depleción de colesterol, y también mediante RNA de interferencia contra dinamina o clatrina. Posteriormente se confirmó que la incorporación de perifosina en células KB era dependiente de una flipasa de membrana⁹². Se comprobó además en otras 13 líneas celulares que no existía una correlación entre los niveles de incorporación de perifosina y de marcadores de endocitosis (de fase fluida o LRdependiente)⁹², por lo que dichas líneas podrían comportarse de manera semejante a las células KB.

Los resultados de Muñoz-Martínez y colaboradores muestran las limitaciones de estudiar el papel de la endocitosis en la incorporación de ATLS simplemente mediante la inhibición de dicho proceso. Aunque en las células S49 sí se observó una correlación entre incorporación de ATLS y endocitosis LR-dependiente, la actividad flipasa no fue examinada en esas células. Los inhibidores y condiciones empleadas para reducir la endocitosis en S49 podrían, al igual que ocurría en células KB, afectar a la flipasa de MP. Hay que tener en cuenta que los inhibidores de la endocitosis empleados no bloquean únicamente la endocitosis. La monensina es un ionóforo que permite el antiporte Na⁺/H⁺ a través de membranas biológicas, lo que altera el pH, morfología y función de endosomas y TGN⁴⁴². Como consecuencia, se inhibe el reciclaje de receptores a la MP y la endocitosis mediada por receptores. La especificidad de la clorpromazina es aún más dudosa, dado que no se ha determinado con exactitud su diana molecular. Es capaz de inhibir la endocitosis mediada por clatrina al impedir la asociación de este recubrimiento con la MP; sin embargo también parece afectar la asociación del recubrimiento

con cuerpos multivesiculares⁴⁴³. Por tanto, estos inhibidores podrían afectar además de la endocitosis a otros procesos como secreción o reciclaje de proteínas de la MP. Un caso semejante sería el alelo dominante negativo de dinamina, una proteína que actúa en la formación de vesículas recubiertas de clatrina, estrangulando las vesículas nacientes hasta separarse las mismas de la membrana de origen. El dominante negativo afectaría a todas las vesículas recubiertas de clatrina: no sólo las endocíticas formadas en la MP, sino las relacionadas con secreción y reciclaje formadas en el TGN y endosomas⁴⁴⁴. La depleción de colesterol podría afectar a la afinidad de los ATLS por las membranas, y también impedir la asociación con la MP de proteínas implicadas en el transporte de ATLS por mecanismos no endocíticos. Ambas posibilidades provocarían una incorporación reducida de ATLS con independencia de que la endocitosis LR-dependiente se viera también afectada. En resumen, las condiciones ensayadas tienen efectos muy diversos, y afectan a procesos (secreción y reciclaje) de los que depende la presencia de algunas proteínas de MP. Parece necesario evaluar al menos la función de la flipasa de la membrana plasmática en las células S49 para validar que la incorporación de ATLS sucede por endocitosis, como se ha propuesto.

En este trabajo se ha postulado también que, en levaduras, la depleción de los esteroides en la MP podría evitar la entrada de ATLS en las células, lo que reduciría su toxicidad. Uno de estos ATLS, la edelfosina, se transporta por dos vías independientes al interior celular, siendo una de ellas (la dirigida al RE) independiente de endocitosis. En el mutante *lem3Δ* de la flipasa de membrana plasmática no se produce internalización de edelfosina por ninguna de estas vías. Por tanto, tanto la asociación de los ATLS con los *lipid rafts* de la MP como su translocación a través de la flipasa de MP parecen ser pasos previos para otros procesos de transporte de los ATLS. En ese sentido la levadura podría ser un modelo alternativo en el que los *lipid rafts*, la flipasa de MP y la endocitosis no supondrían vías distintas y paralelas de incorporación. Otro aspecto relevante es la relación del mecanismo de transporte con el compartimento celular donde los ATLS ejercen su efecto citotóxico. La toxicidad de estos compuestos sobre las células S49 y HeLa depende de la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina, que tiene lugar en el RE^{83,90}, y de hecho se ha observado acumulación de un análogo fluorescente de edelfosina en el RE de células HeLa⁴⁴. El tránsito de los ATLS desde intermedios endocíticos al RE no se ha observado ni se corresponde con los procesos habituales de transporte mediados por vesículas. A ese respecto sería importante conocer si existe, en células de mamífero, un mecanismo de translocación entre la MP y el RE independiente de tráfico endosomal semejante al propuesto en levaduras. La caracterización en este último organismo de dicho mecanismo podría servir como modelo para identificar posibles componentes homólogos en mamíferos.

La internalización y degradación de Pma1 es un elemento crítico del mecanismo tóxico de edelfosina

La endocitosis es necesaria para el efecto tóxico de la edelfosina

Con independencia de su participación en el transporte de los ATLS, la endocitosis es un proceso importante para la toxicidad de, al menos, la edelfosina. El análisis bioinformático señaló esta idea, al identificar entre los mutantes del *screening* de resistencia un grupo enriquecido en genes relacionados con este proceso (*MYO5*, *END3*, *LDB17*, *RHO4* y *VPS1*, que codifica una proteína semejante a la dinamina con múltiples funciones, entre ellas la endocitosis). Aun tratándose de un número relevante, y siendo el enriquecimiento de los genes de esta categoría significativo según el algoritmo empleado, el número de genes implicados en endocitosis es mayor, habiéndose descrito cerca de 50³³³. Hay varias explicaciones para esta aparente discordancia. Múltiples componentes de la maquinaria endocítica son esenciales para la célula (complejo *ARP2/3*, *LAS17*, *ACT1* o *PAN1*), por lo que no todos los genes de endocitosis están representados en la colección de mutantes de delección. Mutantes de otros genes pueden presentar un defecto sólo parcial de la endocitosis, insuficiente para proteger frente a los ATLS. En relación con esto algunos reguladores de la endocitosis son parcial o totalmente redundantes (*ARK1/PRK1*⁴⁴⁵, *ENT1/ENT2*⁴⁴⁶, *INP51/INP52/INP53*⁴⁴⁷, *PKH1/PKH2*⁴⁴⁸, *RVS161/RVS167*⁴⁴⁹, *SAC6/SCP1*⁴⁵⁰, *YCK1/YCK2*⁴⁵¹). En tal caso no se esperaría un fenotipo fuerte de mutantes de delección de un solo gen. Finalmente, ciertos mutantes sufren tales alteraciones que impiden su crecimiento normal, por lo que no es posible su detección en el *screening*, pero puede comprobarse su resistencia mediante otros mutantes. Puede ser el caso de *END4*, no presente entre los mutantes resistentes; sin embargo, un mutante termosensible *end4^{ts}* mantiene la funcionalidad suficiente para permitir la viabilidad celular, y en combinación con otra mutación (un doble mutante *end4^{ts}pep4Δ*) sí confiere resistencia al compuesto.

Otro factor que podría explicar el reducido número de genes de endocitosis detectado en el *screening* podría ser la existencia de mecanismos alternativos de endocitosis. Los mutantes de los genes de clatrina presentan un defecto en endocitosis parcial solamente⁴⁵². Una explicación a este fenómeno sería que la clatrina interviene en pasos tempranos del proceso endocítico y aumenta la efectividad del mismo, sin ser esencial⁴⁵³. Otra interpretación sería la existencia en *S. cerevisiae* de dos mecanismos endocíticos paralelos: dependiente e independiente de clatrina. Recientemente se ha descrito una ruta endocítica con las características de este último mecanismo⁴⁵⁴. Si los mecanismos paralelos de endocitosis son funcionalmente redundantes en parte, las mutaciones en uno de los mecanismos no causarían un fenotipo de defecto de la endocitosis claro. Independientemente de la interpretación correcta, la maquinaria endocítica tiene una gran complejidad y existen redundancias funcionales

para algunos subprocesos y componentes; como consecuencia, ciertos mutantes disponibles en la colección empleada podrían carecer de un fenotípico endocítico acusado, lo que explicaría el número relativamente bajo de genes de endocitosis encontrado en el *screening*.

Los ATLS provocan la internalización de Pma1p

La primera hipótesis que se planteó acerca de la endocitosis en el mecanismo de toxicidad de edelfosina fue su papel en la incorporación del compuesto, pero los experimentos realizados a 4 °C y con el mutante *end4pep4Δ* descartaron ese papel. La resistencia observada en los mutantes de endocitosis se debería por tanto al bloqueo de la internalización de algún otro elemento distinto al ATL. La internalización de dicho elemento podría causar la toxicidad por dos mecanismos: bien por su incorporación a un compartimento nuevo (el interior celular) donde produciría un efecto no presente en las células tratadas, bien por su salida de su compartimento original (el espacio extracelular o la MP) donde cumplía una función importante para la viabilidad celular.

Uno de los candidatos que se presentó fue la ATPasa de la membrana plasmática Pma1. Un trabajo previo del laboratorio ya había demostrado anteriormente que el tratamiento con edelfosina provocaba la internalización de Pma1 a la vacuola y su degradación proteolítica³⁰⁵. En el presente trabajo se ha confirmado por microscopía de fluorescencia que el destino final de esta Pma1 internalizada es la vacuola (ilustración 31 D). Este mecanismo de edelfosina fue además extendido a miltefosina y perifosina (ilustración 31 E-G). A falta de comprobar otros ATLS, la inducción de la internalización de Pma1 a la vacuola parece una característica común de esta familia de compuestos. Esta característica no parece deberse a un estrés celular provocado por fármacos más general: tratamientos con cicloheximida, brefeldina A o higromicina B no provocaron la internalización de Pma1. Por tanto, esta internalización es consecuencia del efecto específico de los ATLS sobre las células.

La internalización de Pma1 en presencia de edelfosina es bloqueada por bajas temperaturas (ilustración 40), lo que sugiere que sucede por endocitosis. Aunque la acumulación de Pma1 en la vacuola pudo observarse por microscopía de fluorescencia, no fue posible observar directamente su acumulación en pasos intermedios de la ruta endocítica. Sin embargo sí pudo seguirse la internalización, en células WT cuya endocitosis había sido temporalmente bloqueada mediante baja temperatura, del marcador de membranas de la vía endocítica FM 4-64 (ilustración 35). En el seguimiento del FM 4-64 pudieron observarse invaginaciones y acúmulos intracelulares de pequeño tamaño, y finalmente la acumulación en la vacuola del marcador. Tal secuencia es compatible con la asociación de FM 4-64 con la MP y su transporte, a través de vesículas endocíticas y endosomas, hasta acumularse finalmente en la vacuola. Pma1 fue monitorizado simultáneamente en estos experimentos, y no se observó su colocalización con las estructuras marcadas por FM 4-64. Ya que en condiciones normales Pma1 se concentra muy mayoritariamente en la MP, la conclusión de estos experimentos es que las

células excluyen a esta proteína del progreso por la vía endocítica para evitar su internalización. El mecanismo exacto de dicha exclusión podría ser un reciclaje activo desde las vesículas endocíticas de nueva síntesis a la MP o la exclusión topológica de los sitios de formación de dichas vesículas mediante la segregación de dominios ricos en Pma1.

Una de las consecuencias del tratamiento con ATLS fue la aparición de estructuras en las que se acumulaba Pma1GFP de gran tamaño, semejantes a invaginaciones de la MP, o vesículas adyacentes a la MP. La accesibilidad de estas estructuras a FM 4-64 a bajas temperaturas confirmó que se eran invaginaciones, con una continuidad con el resto de la MP (ilustración 35). En estas células tratadas con ATLS el marcador FM 4-64 se acumuló además en una segunda clase de estructuras, semejantes a las invaginaciones y acúmulos intracelulares observadas previamente en células sin tratar y postulados como intermedios de la ruta endocítica. Al igual que en las células sin tratar, Pma1 era excluido mayoritariamente de esta segunda clase de estructuras. Por tanto, en la MP de las células tratadas parecen formarse dos estructuras: las vesículas endocíticas, a través de las cuales tiene lugar la incorporación de FM 4-64 a la vía endocítica; y unas invaginaciones de mayor tamaño, de las cuales Pma1 no es excluido. Se desconoce por el momento la identidad de las invaginaciones surgidas a raíz del tratamiento con ATLS. Dado que estos compuestos se asocian a lípidos de membrana específicos y pueden alterar microdominios de membrana, las invaginaciones podrían ser dominios generados por la modificación local de la composición lipídica de la MP de levadura. De hecho, estas invaginaciones mostraron además un marcaje con FM 4-64 más intenso que el resto de MP, mientras que en las vesículas endocíticas la fluorescencia de la membrana era homogénea, lo que sugiere una composición diferencial respecto al resto de la MP. La función de estas invaginaciones es desconocida, al igual que su naturaleza. Ya que Pma1 no es excluido de las mismas, es tentador sugerir que representan el mecanismo de entrada de esta proteína a la vía endocítica y que, en última instancia, conduce a su acumulación en la vacuola. Si dicha interpretación es la correcta, existen dos procesos de transporte desde la MP: la endocitosis, que se produce en células tratadas o no tratadas y excluye a Pma1, y en células tratadas con ATLS un segundo proceso minoritario, a través de invaginaciones de mayor tamaño y a las que se incorpora Pma1. La internalización de Pma1GFP que inducen los ATLS no sería consecuencia de cualquier proceso endocítico, sino que comenzaría con la formación de estructuras específicas (invaginaciones). Estudios más detallados son necesarios para determinar la naturaleza exacta de estas invaginaciones y si de verdad median la incorporación de Pma1 a la vía endocítica.

La degradación de Pma1 es clave para la toxicidad de edelfosina

Pma1p es una proteína esencial para la viabilidad celular, por lo que el efecto deletéreo asociado a su internalización y degradación en la vacuola podría ser responsable de la toxicidad ejercida por los ATLS. Un mutante hipomórfico de *PMA1* es hipersensible a la edelfosina (ilustración 36), y previamente se había demostrado que la sensibilidad celular a edelfosina podía aliviarse parcialmente

mediante la sobreexpresión de *PMA1*³⁰⁵. De acuerdo con eso, en el presente trabajo se ha observado que las células portadoras de una copia extra del gen en un plásmido centromérico (pRSPma1GFP) muestran, con respecto a las células portadoras del plásmido vacío, una sensibilidad ligeramente menor a edelfosina (ilustración 32). Tal efecto se observa también frente a los otros ATLS, miltefosina y perifosina. Esto concuerda con la cuantificación por microscopía de las células con internalización de Pma1p, en la que se observó que los tres ATLS provocan una internalización semejante de la proteína (ilustración 33). Dado que este proceso se ha demostrado relevante para la toxicidad en el caso de edelfosina, se esperaría que también lo fuera para los otros dos compuestos. La comparación entre las células con pRSPma1GFP y con el plásmido vacío parece confirmar que la internalización de Pma1p es relevante en la toxicidad de los tres ATLS. Es en todo caso un resultado preliminar que deberá ser validado en el futuro por un análisis de mayor sensibilidad. En la comparación de los tres compuestos deberá evaluarse hasta qué punto la degradación de Pma1p es esencial para su toxicidad, teniendo en cuenta además que la internalización que provocan es semejante pero no exactamente igual, como indicó la cuantificación realizada por microscopía (ilustración 33).

Pma1 es uno de los reguladores fundamentales del pH citosólico y evita su acidificación mediante el bombeo de protones al exterior celular. El pH determina el estado de protonación de los aminoácidos que forman las proteínas, por lo que su homeostasis es vital para la célula. El pH citosólico se puede monitorizar mediante la tinción acidotrópica quinacrina, una base diprótica permeable a las membranas que adquiere carga en los compartimentos ácidos, quedando retenida en los mismos. La quinacrina, que tiñe las vacuolas de las células en condiciones normales, pasa a teñir todo el citoplasma tras el tratamiento con edelfosina (³⁰⁵, ilustración 37 A-D). Sin embargo, tres mutantes resistentes a edelfosina analizados por la misma técnica mostraron una apariencia semejante (ilustración 37 E-J). Esto podría deberse a que la resistencia de estos mutantes tuviera su origen en un proceso no relacionado con Pma1. Sin embargo, el análisis por microscopía de la internalización de Pma1GFP sí sugirió que una mayor proporción de la proteína permanecía en la MP, respecto a la que sufría internalización (ilustración 39). Otra explicación a la tinción de estos mutantes con quinacrina podría ser una reducida sensibilidad de este método. La intensidad de la fluorescencia de quinacrina depende de la proporción de las moléculas protonadas y, por tanto, retenidas en el citosol. Sin embargo, la relación entre pH y proporción de las moléculas en su forma protonada sigue la ecuación de Henderson-Hasselbach, y no es lineal sino logarítmica. Por tanto, dada la constante de disociación de la quinacrina ($pK_{a1} = 7,7$), incluso una acidificación moderada del citosol provocaría que la mayoría de las moléculas se encontraran en su forma protonada y quedarán retenidas; en caso de haber una acidificación mucho mayor, el marcaje por quinacrina sería semejante, siendo la técnica inadecuada para distinguir tales diferencias. A la vista de estas deficiencias se empleó como sensor del pH citosólico una GFP sensible al pH⁴⁵⁵. Esto permitió confirmar que la edelfosina provoca acidificación citosólica (ilustración 38 A). Se analizó también uno de los mutantes resistentes

a edelfosina que presentaba internalización reducida de Pma1, comprobándose que sufría una menor acidificación del citosol (ilustración 38 C).

Varios mutantes identificados en los *screenings* presentan defectos en la homeostasis del pH citosólico, lo que confirma la idea de que la acidificación del citosol es un factor crítico para la toxicidad por edelfosina. Mutantes en la mayoría de subunidades de la ATPasa vacuolar provocaron hipersensibilidad a edelfosina. El pH citosólico es controlado conjuntamente por la acción de Pma1, que bombea protones al exterior celular, y la ATPasa vacuolar, que los secuestra en el lumen ácido de la vacuola²⁰⁰. Los mutantes de la ATPasa vacuolar son incapaces de acidificar correctamente la vacuola, lo que provoca un descenso del pH citosólico; además, en estos mutantes se observa la internalización de Pma1 a la vacuola y la degradación de la proteína²⁰⁰. Este fenotipo es notablemente semejante al observado en células tratadas con ATLS. Parece por tanto muy probable que estas mutaciones y el tratamiento con ATLS provocan, de manera aditiva, defectos funcionales sobre el mantenimiento del pH citosólico, a través de los dos mecanismos que la célula tiene para regular dicho pH: la ATPasa de la MP y la ATPasa vacuolar. De acuerdo con esta idea, el pH citosólico del mutante *vma2Δ* resultó menor y el tratamiento con edelfosina provocó una acidificación mayor (ilustración 38 B).

La hipersensibilidad a edelfosina observada en el mutante *trk1Δ* podría estar también relacionada con la homeostasis del pH. Pma1p consume ATP para bombear protones del citosol al medio extracelular. Esta energía se acumula como energía potencial en el gradiente electroquímico a través de la MP resultante. El gradiente electroquímico está compuesto por dos componentes: el gradiente químico de protones (más concentrado en el exterior) y una diferencia en la distribución de cargas a ambos lados de la MP (positiva en el exterior). El bombeo de protones es por tanto un proceso electrogénico, y conlleva la aparición de un potencial transmembrana. Sin embargo, la diferencia de cargas provocada por Pma1p impulsa la entrada de otras especies cargadas positivamente en sentido opuesto (del medio extracelular hacia el citosol); de hecho, el potencial que genera Pma1 es suficientemente elevado como para impulsar la incorporación de K⁺ en contra del gradiente químico del catión, que está más concentrado en el citosol que en el medio extracelular. El potencial transmembrana existente en la célula es la combinación de dos procesos opuestos: su generación, por Pma1p, y su consumo por las corrientes de retorno (mayoritariamente K⁺). Ya que el transportador principal de K⁺ es Trk1p, en un mutante *trk1Δ* existe un defecto en este transporte de cargas contrario a la acción electrogénica de Pma1p, y como resultado el potencial eléctrico transmembrana resultante es mucho mayor²⁰¹. Otra consecuencia de la falta de la principal corriente de retorno es que para mantener el potencial eléctrico transmembrana la célula necesita una corriente de protones a través de Pma1p mucho menor. Por tanto, se esperaría que las células del mutante *trk1Δ* mantuvieran un gradiente de protones menos acusado a través de la MP. En concordancia con esta idea, unas condiciones análogas (células WT incubadas en medio sin K⁺) resultan en un pH citosólico más reducido que en presencia de potasio y una acidificación del medio extracelular más lenta, indicativos

de una menor actividad de la ATPasa de MP⁴⁵⁶. Como consecuencia de la menor actividad de Pma1p en el mutante *trk1Δ*, su capacidad de tamponamiento del pH citosólico será reducida, lo que podría explicar su mayor sensibilidad a edelfosina. El caso contrario podría darse en el mutante resistente *yhc3Δ*, cuya Pma1p es constitutivamente más activa³⁵⁷. Esta mayor actividad podría contrarrestar la pérdida de proteína en la MP y ser el origen de la resistencia del mutante.

Otros mutantes que se identificaron en el screening de sensibilidad a edelfosina y que podrían relacionarse con la homeostasis del pH son *SNF1*, *SNF4* y *SIP3*. Los dos primeros son los componentes centrales del mecanismo que circunvala la represión por glucosa en *S. cerevisiae*: su activación induce la expresión de genes específicos que alteran el metabolismo celular, activan la respiración y el aprovechamiento de fuentes de carbono distintas a la glucosa. *SIP3* codifica un factor de transcripción que es activado por Snf1p⁴⁵⁷, por lo que la hipersensibilidad de los tres mutantes podría deberse a un defecto funcional semejante. Una de las funciones descritas para Snf1p es la activación de los canales de K⁺ Trk1/2p⁴⁵⁸. La sensibilidad de los tres mutantes podría deberse a la inactivación de este transporte, del mismo modo descrito para el mutante *trk1Δ*. En relación a esta hipótesis, se ha descrito un *screening* de mutantes de delección auxótrofos para inositol, además de genes de la ruta biosintética de este compuesto, varios mutantes que coincidieron con los resistentes a edelfosina⁴⁵⁹. Entre estos mutantes coincidentes en ambos *screenings* se encontraban varios relacionados con la homeostasis del pH: *TRK1*, 13 de los genes *VMA* (11 coincidentes con los del *screening* de edelfosina) y un alelo hipomórfico de *PMA1*. Esto llevó a postular y demostrar que un bajo pH citosólico provocaba dicha inactivación de la biosíntesis de inositol. Curiosamente, los mutantes en los genes *SNF1* y *SNF4* también presentaron la auxotrofia, pero sólo cuando el medio de cultivo era más ácido de lo normal. Los resultados de este estudio parecen por tanto confirmar un papel en la homeostasis del pH celular para *SNF1* y *SNF4*, al igual que para genes (*TRK1*, *PMA1*, *VMA*) con papel ya conocido. La alteración de esa función en los mutantes *snf1Δ* y *snf4Δ* podría ser la causa de su hipersensibilidad a edelfosina.

Un factor externo que puede influir en el pH citosólico es el pH del medio de cultivo. Los estudios de la relación entre ambas magnitudes han demostrado que incrementos en el pH del medio provocan aumentos moderados en el pH citosólico^{200,456,460}. Un estudio ha postulado, por el contrario, que la levadura puede mantener estable su pH citosólico con independencia del pH externo, dentro de un amplio rango de esta última magnitud⁴⁵⁵. En todo caso, la capacidad de la célula de mantener un pH citosólico estable depende de la función de Pma1. Estudios con mutantes de Pma1 mostraron una correlación entre la actividad de la ATPasa y la sensibilidad a un pH extracelular bajo⁴⁶¹, así como entre actividad de la ATPasa y pH citosólico⁴⁶⁰. Parece lógico que en un medio ácido el gradiente de pH entre el medio y el citosol sea más acusado, aumentando la entrada de protones al citosol y acidificándose este como resultado (aunque la acidificación sea contrarrestada en gran medida por los mecanismos celulares de homeostasis de pH). Es por ello de esperar que la toxicidad de edelfosina, dependiente de la internalización de Pma1, aumente en un medio ácido. De acuerdo a eso, se observó

que la sensibilidad a edelfosina era mayor en un medio con pH 3 que en uno con pH 5.320. Otro factor externo con capacidad de afectar el pH citosólico es la fuente de carbono presente en el medio, al ser la glucosa un activador de la ATPasa⁴⁶². El tratamiento con ATLS es más tóxico en medio con glicerol como única fuente de carbono que en medio con glucosa (ilustración 48). Una función ATPasa más reducida en medio con glicerol podría hipersensibilizar a las células frente a la internalización de Pma1 promovida por los ATLS. Sin embargo, la influencia de la fuente de carbono sobre la toxicidad de los ATLS es seguramente pleiotrópica al afectar, además del pH citosólico, a otros determinantes de la toxicidad como la mitocondria.

Los resultados expuestos en este trabajo confirman que para la toxicidad por edelfosina es esencial la internalización y degradación de Pma1, como habían sugerido resultados anteriores³⁰⁵. Se ha demostrado además que esta degradación provoca una caída del pH citosólico, y que esta acidificación provoca toxicidad celular: en condiciones que exacerban dicha acidificación aumenta la sensibilidad a edelfosina. Solamente una parte de los experimentos se realizó con miltefosina y perifosina. Aunque los tres compuestos provocan internalización de Pma1 en un número comparable de células, la cuantificación por microscopía no permite saber si la pérdida de función ATPasa resultante es también comparable en los tres casos. Una de las observaciones que sugiere que los tres ATLS provocan acidificación citosólica, y que esta interviene en la toxicidad, es la mayor sensibilidad de los tres compuestos con glicerol como fuente de carbono que en presencia de glucosa. Esto no es sin embargo concluyente, ya que la fuente de carbono puede tener múltiples efectos en el metabolismo que podrían influir en la sensibilidad a los compuestos. Por lo tanto, para confirmar si la internalización de Pma1 juega un papel en la toxicidad de miltefosina y perifosina sería necesario realizar con estos compuestos los experimentos llevados a cabo con edelfosina.

La internalización de Pma1 tiene lugar mediante tráfico vesicular a través del endosoma

El mecanismo de toxicidad por edelfosina presentado en este trabajo postula que Pma1 se internaliza por endocitosis y, a través de la ruta endocítica, alcanza la vacuola, donde es degradada. El tráfico vesicular mediado por endosomas participaría, en el mecanismo propuesto, en el transporte de Pma1. Mutaciones que evitaran la progresión de Pma1 hacia el compartimento degradativo final (la vacuola) prevendrían, por tanto, la toxicidad por edelfosina. En este trabajo se plantea la hipótesis de que las alteraciones en el tráfico vesicular que muestran los mutantes de distintos genes endosomales evitan esta progresión y consecuentemente reducen la degradación de Pma1, lo que explicaría la resistencia a edelfosina de estos mutantes. De acuerdo con este modelo, se observó en uno de los mutantes endosomales (*vps35Δ*) una menor acidificación del citosol tras el tratamiento con edelfosina (ilustración 38 C). Esta sección evalúa como podrían estar implicados los distintos

genes endosomales en el tráfico de Pma1, presentando finalmente un modelo de este tráfico que englobe los distintos componentes propuestos.

Transporte retrógrado

Un amplio grupo de los genes endosomales identificados en el *screening* de resistencia a edelfosina participan en el transporte retrógrado endosoma-TGN. La resistencia a edelfosina es resultado de alteraciones de dicho transporte a distintos niveles: incorporación de sustratos a las vesículas de reciclaje (*SNX4*, retrómero, *RCY1*), aproximación de vesículas (complejo GARP) o fusión de vesículas (complejo *TLG1*). Un caso particular es el de *GYP6*, la GAP (proteína activadora de la GTPasa) de *YPT6*. Ypt6p codifica una proteína Rab cuya actividad es modulada por GAPs y GEFs (ilustración 9), y actúa en transporte retrógrado del endosoma al TGN o dentro del AG⁴⁶³. Gyp6p es un regulador negativo, ya que activa la función GTPasa intrínseca de Ypt6p y por tanto promueve la forma Ypt6-GDP, inactiva⁴⁶⁴. Se esperaría por tanto que en un mutante *gyp6Δ* predominara la forma Ypt6-GTP y, como consecuencia, un transporte retrógrado más activo, justo lo contrario que el resto de mutantes del transporte retrógrado identificados. Sin embargo, se ha postulado que la célula posee mecanismos para compensar desregulaciones permanentes en la función de *YPT6*⁴⁶³. Las funciones de Gyp6p no parecen tampoco limitarse a la regulación de Ypt6p, habiéndose descrito al menos una función efectora⁴⁶⁴. Por tanto, la mera aparición del mutante *gyp6Δ* en el *screening* no parece indicar una contradicción evidente en la identificación del transporte retrógrado como un factor esencial para la toxicidad por edelfosina.

Un estudio preciso de cada mutante del transporte retrógrado sería necesario para determinar los defectos concretos que presentan en el transporte vesicular; sin embargo, algunas observaciones generales permiten planear una posible relación con la degradación de Pma1p. Una de las consecuencias del transporte anterógrado es el desplazamiento al endosoma de ciertos componentes propios del TGN. El transporte retrógrado, al recuperar dichos componentes, mantiene la identidad bioquímica del TGN, lo que permite que el transporte anterógrado se mantenga funcional. Las mutaciones del transporte retrógrado provocan la pérdida de esos componentes (que se desplazan a la vacuola o la MP). Ciertas mutaciones bloquearían la recuperación por transporte retrógrado, con independencia de la naturaleza de los componentes a reciclar. Este podría ser el caso con los genes *TLG2* y *VPS52*, que intervienen en la fusión de las vesículas de reciclaje con el TGN.

Los resultados del *screening* no indicaron un único componente cuya pérdida pudiera alterar el transporte vesicular a través de los endosomas. Un sustrato del retrómero es el receptor de hidrolasas vacuolares Vps10p, y la pérdida del receptor o de subunidades del retrómero evita la llegada de las hidrolasas a los endosomas—y posteriormente a la vacuola— y altera la función degradativa del orgánulo. Esta capacidad degradativa reducida podría conllevar una menor degradación de Pma1p.

Una correlación entre degradación proteolítica en los endosomas y sensibilidad a edelfosina se había observado previamente: la mutación *end4^{ts}*, que reduce la endocitosis, no era suficiente para generar resistencia a edelfosina, mientras que esta mutación combinada con la mutación *pep4Δ* (proteínasa A, que activa una cascada de zimógenos de varias hidrolasas vacuolares⁴⁶⁵) generaba resistencia al ATL³⁰⁵. Por tanto, el retrómero participaría en la toxicidad de edelfosina manteniendo la capacidad degradativa del endosoma, al transportar hidrolasas vacuolares al orgánulo. Sin embargo, el propio gen *VPS10* no se detectó en el *screening* de mutantes resistentes. Aunque Vps10p es el sustrato clásico del retrómero, el retrómero es también necesario para la retención en el TGN de otras proteasas, como Kex2p y Ste13p (y posiblemente Kex1p). Estas proteasas podrían participar en la capacidad degradativa del endosoma. De ser así, los mutantes del retrómero podrían tener una capacidad degradativa combinada menor que el mutante *vps10Δ*, lo que explicaría la ausencia de este último en el screening de resistencia. Esto explicaría también que los mutantes *kex1Δ* y *kex2Δ* mostraran resistencia a edelfosina. La única ruta conocida en la que participan Kex1p y Kex2p es en la maduración de proteínas secretadas, como el factor²⁶¹. Por tanto, es necesario un estudio más detallado para determinar si en estos mutantes la degradación endosomal de Pma1 es menor, y si este efecto también se produce en los mutantes del retrómero.

Los genes *SNX4/41/42* participan en una vía de transporte retrógrado distinta del retrómero³⁵⁰, y los mutantes *snx4Δ* y *snx42Δ* presentaron resistencia a edelfosina. El sustrato mejor caracterizado de esta vía es Snc1p, una proteína esencial para la fusión de las vesículas secretoras con la MP³⁵⁰. Snc1p es internalizada por endocitosis y reciclada desde el EE al TGN⁴⁶⁶. En el reciclaje de Snc1p intervienen también *DRS2* y *RCY1*^{147,196}, cuyos mutantes son resistentes a edelfosina, y el complejo TLG1⁴⁶⁶, cuyo componente *TLG2* también apareció en el *screening* de resistencia. El reciclaje mediante esta vía parece esencial para la toxicidad por edelfosina. Un posible origen de la resistencia de estos mutantes sería la pérdida de un componente, presente en la MP y esencial para la toxicidad por edelfosina. Su presencia allí dependería de una vía secretora funcional y, por tanto, de *SNC1*. Dos candidatos para estos componentes de la MP serían la maquinaria de endocitosis y la maquinaria de incorporación de ATLS, puesto que ambos procesos se han mostrado críticos para la toxicidad por ATLS.

La progresión por la vía endosomal degradativa, con el endosoma tardío como punto de no retorno, determina la toxicidad por edelfosina

Otro de los grupos de genes endosomales más abundantes en el *screening* de resistencia a edelfosina fue el de los componentes del ESCRT. Durante la maduración endosomal los complejos ESCRT intervienen en la formación del cuerpo multivesicular (MVB) y transportan las proteínas de la membrana endosomal que deben degradarse a las vesículas intraluminales del MVB. Aunque la formación del MVB comienza en el EE, se acelera en el LE y se considera una característica diagnóstica de este último orgánulo la presencia de numerosas vesículas intraluminales. De acuerdo

con esto, los mutantes del ESCRT presentan LEs aberrantes^{363,467} y un bloqueo en la progresión de sustratos proteicos desde el LE a la vacuola^{216-218,363}. La resistencia de los mutantes del ESCRT podría por tanto deberse a un defecto en la incorporación de Pma1 a las vesículas del MVB. De acuerdo con esta idea, fue posible observar una ubiquitinación de Pma1 en respuesta al tratamiento con edelfosina (ilustración 42). La presencia de una ubiquitina o un oligómero corto de estas proteínas en proteínas de membrana actúa como señal de degradación, y permiten el reconocimiento de la proteína por el complejo ESCRT, que la incorpora a las vesículas intraluminales donde se degradará²²⁴. La internalización por vía endocítica de Pma1 y su ubiquitinación sugieren la participación del complejo ESCRT en este proceso, lo que es coherente con la resistencia mostrada por los mutantes del complejo y con la importancia que la degradación de Pma1 tiene en la toxicidad por edelfosina.

Los LEs surgen de los dominios globulares de los EE y sufren un conjunto de cambios denominados maduración endosomal. Uno de estos cambios, la conversión de Rab, es una secuencia compleja de interacciones proteicas mediante las cuales se intercambia la proteína Rab mayoritaria en la membrana endosomal, de Vps21 en el EE a Ypt7 en el LE. La delección de varios genes implicados en esta conversión produce resistencia a edelfosina: *VPS9*, *VPS3*, *VPS8*, *YPT7* y *CCZ1*. La maduración endosomal parece por tanto un proceso crítico para la toxicidad por edelfosina. Interpretaciones más específicas del papel de cada gen en la maduración endosomal y en la toxicidad por edelfosina deben ser tomadas con cautela, dada la complejidad del proceso endosomal y la interrelación funcional entre muchos de sus componentes. La función de *VPS21* parece clave, identificándose en el *screening* su activador *VPS9* y dos subunidades (*VPS3* y *VPS8*) de su efector, el complejo CORVET. Aunque el mismo *VPS21* no apareció en el *screening*, existen otros genes homólogos y posiblemente redundantes, por lo que el fenotipo de su mutante podría ser menos acusado.

El complejo CORVET está formado por un núcleo central y las dos subunidades mencionadas. No es de extrañar que ninguna de las subunidades del núcleo central aparezca en el *screening* de resistencia: la delección de cualquiera de ellas provoca la casi completa desaparición de la vacuola y defectos en la asociación de la ATPasa vacuolar³⁶³, lo que podría desembocar en alteraciones del pH citosólico. El núcleo central es compartido por el complejo CORVET (actuando junto con *VPS3* y *VPS8*) y el complejo HOPS (con *VPS39* y *VPS41*). Las dos subunidades específicas del HOPS, al contrario que las del CORVET, no aparecieron en el *screening*. Ambos complejos son efectores de proteínas Rab que facilitan la aproximación y fusión de vesículas. Sin embargo, CORVET es un efector de *VPS21* que actúa fundamentalmente en el EE y durante la maduración del LE²⁴¹, mientras que HOPS es un efector de *YPT7* que actúa sobre el LE y la vacuola²⁴². Sí se identificaron en el *screening* la misma *YPT7* y su activador *CCZ1*, que además participa en la progresión de *VPS21* a *YPT7*. Esto sugiere que la maduración endosomal es un proceso esencial para la toxicidad por edelfosina, y la alteración de sus componentes puede generar resistencia al compuesto. Alteraciones en cualquier paso hasta la fusión de los LE con la vacuola resultan en resistencia a edelfosina. El LE es además el

compartimento en el que tiene lugar el reciclaje mediado por el retrómero de levadura²⁵⁵. Por tanto, el LE actúa como punto de no retorno en la vía endosomal degradativa: la progresión más allá de este compartimento compromete a la célula en el proceso tóxico provocado por edelfosina.

De acuerdo con el modelo anteriormente planteado, Pma1 se internalizaría en respuesta al tratamiento con edelfosina y progresaría a través de los endosomas hasta llegar a la vacuola. La alteración de la maduración endosomal (incluida la formación del MVB), que evitaría la degradación de Pma1, representaría un posible mecanismo de la resistencia a edelfosina observada en los mutantes de dicho proceso. Estudios futuros del tráfico de la proteína en estos mutantes serán necesarios para validar la vía propuesta para la degradación de Pma1.

Mutantes en genes de la vía endocítica presentan un mayor reciclaje a la membrana plasmática

El bloqueo de la progresión de Pma1 hacia la vacuola evitaría la degradación de la proteína, pero no evitaría su retirada de la MP, el compartimento donde ejerce su función. Si los mutantes de genes endosomales deben su resistencia a edelfosina a una menor degradación de Pma1 (como indicó el estudio del pH citosólico en el mutante *vps35Δ*), ese bloqueo debería acompañarse de una mayor persistencia de Pma1 en la MP. Los endosomas actúan como centros de distribución del tráfico vesicular, y en ellos confluyen la vía degradativa (EE, LE y finalmente vacuola) y vías de reciclaje (a la MP y al TGN). Una posibilidad sería que el bloqueo en determinados mutantes de la vía degradativa actuara como “cortocircuito” del transporte endosomal, provocando que la Pma1 presente en el endosoma se incorporara a las vías de reciclaje en vez de progresar hacia la vacuola por la vía degradativa. El reciclaje permitiría la recuperación de la Pma1, incrementando la persistencia de la ATPasa en la MP y reduciéndose los efectos tóxicos de la edelfosina.

Un doble efecto de las mutaciones en genes endosomales, bloqueando la progresión por la vía degradativa y facilitando el reciclaje, ha sido observado por Proszynski y coautores, que emplearon la colección de mutantes de delección para identificar genes implicados en la vía secretora⁴⁶⁸. Emplearon como marcador una proteína transmembrana fluorescente que se incorporaba desde el TGN a la vía secretora, acumulándose como resultado en la MP mayoritariamente, pero también incorporándose minoritariamente a los endosomas (vía degradativa), lo que resultaba en una débil acumulación en la vacuola. Ciertos mutantes mostraron una tinción exclusivamente en la MP, indicando que su vía secretora era normal pero que presentaban un defecto en la progresión del marcador desde el TGN a la vacuola. De los 67 mutantes así identificados, 17 aparecieron también en el *screening* de resistentes a edelfosina del presente trabajo: *VPS20*, *VPS9*, *CCZ1*, *VPS3*, *PEP8*, *VPS24*, *VPS1*, *SRN2*, *YPT7*, *VPS27*, *VPS4*, *BRO1*, *RPL9B*, *MRPL35*, *YMR269W*, *VAM10*, *YPL080C*. Sorprendentemente, varios de estos genes actúan en complejos posteriores al transporte TGN-endosoma: CORVET (*VPS3*,

VPS9), retrómero (*VPS26*), ESCRT (*VPS27*, *SRN2*, *VPS20*, *VPS24*, *VPS4*, *BRO1*) y HOPS (*YPT7*, *CCZ1*, *VAM10*). Las mutaciones que alteran la vía endocítica en pasos muy tardíos de la misma no resultaron en la acumulación del sustrato en compartimentos endocíticos intermedios de la vía, sino en su completa acumulación en la membrana plasmática. Esto sugiere que las proteínas presentes en los endosomas que normalmente seguirían la vía degradativa hasta la vacuola pueden, en ausencia de ésta, seguir otras vías de reciclaje.

Un modelo que explica este suceso ha sido propuesto por Frederick Maxfield, tras observar que la mayoría de los lípidos de membrana internalizados al EE siguen vías de reciclaje y no la vía degradativa⁴⁶⁹. En los EEs, que son centros de organización del tráfico vesicular, coexisten dos tipos de dominios: tubulares, con una proporción superficie/volumen (membrana/lumen) elevada y en los que se concentran los procesos de reciclaje; y globulares, con una baja proporción superficie/volumen y a partir de los cuales continúa la vía degradativa, al sufrir maduración endosomal para transformarse en LE. Los lípidos se encuentran mayoritariamente en los dominios tubulares, al concentrar éstos la mayor parte de la membrana endosomal⁴⁷⁰. Por tanto, la vía por defecto que siguen los lípidos del EE es la del reciclaje, y la recuperación de los mismos permite mantener más o menos constante la cantidad de membrana de los compartimentos originales. El caso opuesto se aplica a las proteínas solubles: se encuentran mayoritariamente en los dominios globulares, al concentrar éstos la mayor parte del lumen endosomal, y por tanto se dirigen por defecto a la vía degradativa. Las proteínas de membrana se distribuyen al igual que los lípidos, por lo que la mayoría se encuentra en dominios tubulares y por tanto son recicladas por defecto; sólo la presencia de señales moleculares reconocidas por proteínas del recubrimiento (como ubiquitinación, por el ESCRT) permite que se incorporen a las membranas de los dominios globulares y a la vía degradativa. Parece factible que mutaciones que bloquean la maduración endosomal (*CORVET*, *CCZ1*, *YPT7*), al evitar la incorporación de las proteínas a la vía degradativa, prolonguen su estancia en el EE. Esto facilitaría su incorporación a vías de reciclaje.

En los LEs se podría dar un caso análogo. El reciclaje mediado por el retrómero actúa a través de dominios tubulares formados a partir de la membrana endosomal²⁴⁷, y de esta membrana surgen también las vesículas intraluminales. Para que las proteínas de membrana se incorporen a la vía degradativa deben desplazarse desde la membrana endosomal a estas vesículas. De acuerdo con la función fundamentalmente degradativa del orgánulo, en las vesículas se concentra la mayor parte de la membrana presente en el LE. Mutaciones en el ESCRT que bloquean la formación del MVB no sólo impiden la incorporación de proteínas de membrana a las vesículas, sino que también alteran la distribución de la membrana misma. Como resultado del exceso de membrana, los LEs forman en estos mutantes un compartimento endosomal aberrante y de gran tamaño^{363,467}. Proteínas cuyo destino final es la vacuola quedan retenidas en este compartimento³⁶³, incluidas proteínas transmembrana²¹⁶. Sin embargo, también se ha detectado en mutantes del ESCRT que proteínas normalmente degradadas

en el MVB sufren reciclaje a la membrana plasmática⁴⁷¹. Ese es el caso del transportador de uracilo Fur4. En respuesta a la falta de nutrientes, sufre un proceso semejante al aquí propuesto para Pma1: es internalizado por endocitosis, ubiquitinado e incorporado a través del MVB a la vacuola, donde se degrada. En mutantes del ESCRT, una vez alcanza este compartimento el receptor es reciclado, y como resultado los niveles de Fur4 en la MP se mantienen⁴⁷². En resumen, las proteínas de membrana que se incorporan por vía endosomal y se degradan en la vacuola pueden sufrir procesos de reciclaje cuando su progresión por esta vía se bloquea en diversos puntos.

Amy Chang y colaboradores han demostrado que Pma1p específicamente puede ser sustrato de los procesos de reciclaje descritos anteriormente. Observaron que una mutación termosensible provocaba que la ATPasa resultante (Pma1-7p) fuera degradada a la temperatura restrictiva, lo que provocaba un defecto en el crecimiento⁴⁷³. El proceso por el que esta Pma1-7p se degrada presenta múltiples características comunes la degradación de Pma1p inducida por edelfosina, y el tráfico vesicular que sufre Pma1-7p es semejante al modelo planteado en este trabajo. La idea que aquí se plantea es que el tratamiento con edelfosina y la mutación *pma1-7* (en presencia de la temperatura restrictiva) provocan, a través del mismo proceso, la degradación de la ATPasa.

La degradación de Pma1-7p es debida a su transporte a la vacuola y a la subsiguiente acción de enzimas hidrolíticos vacuolares⁴⁷³. La degradación es precedida de ubiquitinación de la proteína⁴⁷⁴. La ubiquitinación es esencial para la internalización de Pma1-7p y su bloqueo evita la degradación de la ATPasa y restaura el crecimiento celular⁴⁷⁴. Este bloqueo se observó en un mutante de la ubiquitin-ligasa *rsp5*, o en un doble mutante de sus proteínas adaptadoras *bul1 bul2*⁴⁷⁵. *RSP5* es esencial para la viabilidad celular, al contrario que las proteínas adaptadoras, y el mutante de delección *bul2Δ* mostró resistencia a edelfosina. Otra proteína adaptadora de Rsp5p es codificada por *BSD2*, y media la incorporación de diversas proteínas a los MVB⁴⁷⁶. Un mutante *bsd2* fue detectado en un *screening* de mutantes capaces de suprimir la sensibilidad de la cepa *pma1-7*⁴⁷⁷, y el mutante de delección *bsd2Δ* también mostró resistencia a edelfosina. Esto sugiere que ambos mecanismos podrían participar en la ubiquitinación de Pma1 inducida por edelfosina, en un mecanismo también presente en la cepa *pma1-7*. Pma1-7p es ubiquitinada antes de alcanzar el compartimento endosomal, y la ubiquitinación ocurre con posterioridad, o a consecuencia, de la pérdida de la asociación de la ATPasa con su microambiente lipídico⁴⁷⁴ (ver siguiente sección).

Pma1-7 se incorpora a la vacuola desde el TGN, sin pasar antes por la membrana plasmática⁴⁷³. El *screening* de supresores de la sensibilidad de *pma1-7* identificó nueve genes endosomales cuya mutación reducía la degradación de la ATPasa, confirmando que su incorporación a la vacuola es mediada por endosomas⁴⁷⁷. Cinco de estos genes aparecieron también en el *screening* de resistencia a edelfosina: *VPS8*, *VPS27*, *VPS35*, *PEP11/VPS29* y *BSD2*, a las que habría que añadir un supresor no endosomal, *ALG8*. Por tanto, Pma1-7p y Pma1p tratada con edelfosina parecen atravesar

compartimentos comunes. Los supresores identificados provocan defectos tanto en el transporte del TGN al endosoma como en la maduración endosomal, indicando que Pma1-7p sigue la ruta TGN → EE → LE → Vacuola. Posteriormente se siguió por microscopía el tránsito de una Pma1-7p fusionada a GFP e inducible, confirmándose esta ruta⁴⁷⁸. En presencia de dos de los supresores de sensibilidad que se corresponden a genes del ESCRT (*vps27*, *vps36*), Pma1-7 se acumula en el compartimento aberrante correspondiente al LE en estos mutantes. Desde este LE Pma1-7p puede reciclarse a la MP⁴⁷⁸. Este reciclaje fue mucho más eficaz en el mutante *vps1*, que tiene un defecto en formación de vesículas en el TGN dirigidas al endosoma. Esto probablemente refleja la existencia de un mecanismo que reconoce los defectos de Pma1-7p y la incorpora, en el TGN, a vesículas dirigidas a los endosomas, pero en caso de alteración de ese transporte al endosoma, Pma1-7p es capaz de seguir la vía secretora y alcanzar la MP. El reciclaje a la MP fue algo menos eficaz en el mutante *vps8*, un componente del complejo CORVET⁴⁷⁸.

En el tráfico vesicular de la ATPasa mutante Pma1-7p, mutaciones de diversos componentes de los endosomas bloquean su tránsito a través de los endosomas a la vacuola y promueven su reciclaje a la MP. Estas mismas mutaciones provocan resistencia a edelfosina y parece muy probable que lo hagan promoviendo el reciclaje de la Pma1p internalizada, de una manera semejante a Pma1-7p. Por el contrario, se esperaría que promover el reciclaje desde estos compartimentos protegería a la célula ante la edelfosina. Se ha demostrado en este trabajo que es posible aliviar la toxicidad del compuesto mediante la sobreexpresión de la ArfGAP *AGE1* (tabla 5), que favorece la formación de vesículas intracelulares. Del mismo modo, la suplementación del medio de cultivo con ácido fosfatídico reduce la toxicidad por edelfosina, mientras que la mutación en la fosfolipasa D que genera este lípido (*spo14Δ*) incrementa la sensibilidad al compuesto (ilustración 71). Se ha observado que este lípido favorece la curvatura de las membranas y facilita la vesiculación a partir de las mismas. Una posible explicación de la resistencia a edelfosina observada en ambos casos sería que promovieran la recuperación de Pma1p en la MP mediante la estimulación del tráfico vesicular intracelular, bien la vía secretora, bien los procesos de reciclaje. Para dilucidar el origen de la resistencia incrementada a edelfosina en estas circunstancias, será necesario estudiar con detalle la degradación de Pma1p en cada uno de los casos.

Los ATLS se incorporan a los *lipid rafts* y alteran sus propiedades

Los ATLS tienen afinidad por los esteroides, uno de los lípidos constitutivos de los *lipid rafts*. La suplementación del medio de cultivo con ergosterol, el esteroide más abundante en levadura, evita la toxicidad por ATLS (ilustración 30 D). En las condiciones en que se realizó el experimento (presencia de oxígeno, una cepa WT y sin limitaciones de nutrientes) la levadura es protótrofa para estos lípidos y no expresa los transportadores de la MP esenciales para la incorporación de esteroides exógenos. Tal exclusión aeróbica del ergosterol implica que la presencia del lípido en el medio de cultivo no

puede modificar ninguna característica de la célula. El ergosterol sin embargo podría afectar a los ATLS presentes en el medio. Ambas moléculas tienen una alta afinidad basada en sus geometrías moleculares complementarias, y tienden a formar micelas mixtas³⁴¹. Esta asociación podría disminuir la disponibilidad de los ATLS para las células. Un efecto análogo se ha observado en líneas celulares, en las que la presencia en el medio de proteínas del suero, a las cuales los ATLS tienden a unirse, reduce la efectividad de los mismos⁷³. De acuerdo con esa misma idea, la presencia de esteroides en la MP podría determinar la asociación de los ATLS con esa estructura. Como se muestra en este trabajo, bloqueando la síntesis de ergosterol (tratamiento con lovastatina) o retirando este lípido de la membrana plasmática (tratamiento con metil- β -ciclodextrina) se reduce la toxicidad de los ATLS (ilustración 30 B, C). Ambos tratamientos podrían afectar la función o localización de algún componente de la MP necesario para la toxicidad por edelfosina. Otra opción es que se produzca una interacción directa entre el ergosterol y los ATLS, tras la cual se producirían el resto de procesos de transporte ya descritos (translocación por la flipasa de MP y transporte a orgánulos celulares). Aunque estos experimentos no permiten descartar ninguna de las posibilidades, se ha observado previamente que la edelfosina provoca la movilización de los esteroides de la MP y su posterior internalización^{305,320}, lo que sugiere que se produce una interacción directa entre los ATLS y los esteroides. Los esteroides son uno de los lípidos enriquecidos en las membranas resistentes a detergentes (DRM)¹⁵³, y en las células tratadas con edelfosina el ATL se acumula progresivamente en esos dominios (ilustración 41 C). El mecanismo de incorporación de edelfosina, según sugieren estos resultados, comenzaría con la interacción del compuesto con los esteroides de la MP. Esta asociación provocaría además cambios significativos en la composición local de la MP, lo que podría jugar un papel en la internalización posterior de Pma1.

La [³H]-edelfosina se incorpora progresivamente a los DRM a lo largo del tratamiento, aunque la mayoría del compuesto permanece en fracciones no-DRM. Por fraccionamiento celular y centrifugación se concentran en las fracciones DRM aquellas membranas que son insolubles en frío y en presencia de un detergente, separándose del resto de componentes solubles. La composición de los *lipid rafts* causa su insolubilidad en estas condiciones y su partición en los DRM¹⁵³. Sin embargo, la naturaleza misma del método de separación implica que en los DRM se pueden reunir membranas con una composición semejante pero procedentes de distintos orgánulos subcelulares. Se han descrito LR ya en el retículo endoplásmico¹⁵³ (y el aparato de Golgi), además de en la membrana plasmática; por otro lado, en este compartimento existen al menos dos dominios distintos distinguibles por microscopía de fluorescencia pero que se fraccionan en los DRM¹⁵⁶. Del mismo modo, en las fracciones no-DRM se encuentra una mezcla de los compartimentos acuosos (como indica el marcador citosólico Pgk1 en la ilustración 41 A) y las membranas no resistentes a detergentes, solubilizadas. Parece posible que las membranas vacuolares no resulten resistentes a detergentes, al ser sus niveles de ergosterol mucho menores que en la MP o el RE³⁶⁷. Por tanto, la naturaleza misma de la técnica de separación de los

DRMs impide interpretar con seguridad a qué compartimento celular se corresponden las fracciones aisladas.

La distribución de [³H]-edelfosina tras 6 horas de tratamiento (ilustración 41 C) podría reflejar la paulatina asociación del ATL con los LR de la MP, postulados como vía de entrada de los ATLs; no obstante, la observación de varios análogos fluorescentes de edelfosina determinó que este compuesto no se retiene en la MP, localizándose en estructuras intracelulares. El transporte de edelfosina es muy rápido, observándose una acumulación intracelular incluso tras tiempos muy cortos de tratamiento (30 minutos). Las moléculas de edelfosina serían transportadas con posterioridad a su incorporación a través de la MP, por lo que su interacción con los LR de ese compartimento sería forzosamente transitoria y poco duradera. Esta interpretación concuerda con la cinética observada anteriormente de la perturbación del ergosterol, que en presencia de edelfosina se internaliza de la MP a estructuras intracelulares. Es de suponer que la interacción en la MP de la edelfosina con el ergosterol es anterior tanto a la perturbación del lípido como a la incorporación del compuesto a la célula. La acumulación del ergosterol en estructuras intracelulares era visible en células vivas ya a los 30 minutos de tratamiento³⁰⁵.

La incorporación de edelfosina a los DRM observada podría indicar la asociación del ATL con *lipid rafts* de la MP o de otro orgánulo, pues ambos procesos serían indistinguibles. Los análogos fluorescentes de edelfosina se acumularon mayoritariamente en el RE y la vacuola. Dada la existencia de LR en el primer orgánulo, parece probable que la asociación observada de [³H]edelfosina con los DRM indique que se incorpora, en el RE, precisamente a los LR del mismo. Un mutante en el que el transporte al RE estuviera bloqueado permitiría comprobar este extremo: presumiblemente, los análogos de edelfosina, en su paso por la MP, provocarían las mismas alteraciones (por ejemplo, la internalización del ergosterol) pero no se produciría posteriormente la asociación con los microdominios del RE. Desafortunadamente el proceso implicado en el transporte de edelfosina al RE es todavía desconocido y no se ha identificado por tanto un mutante con estas características. Otra posibilidad a considerar es que el análogo de miltefosina PTE-MT no sufre este transporte al RE, aunque el ATL sí es capaz de provocar la internalización de Pma1 a la vacuola. Un análisis del efecto de la miltefosina sobre los LR semejante al realizado con edelfosina podría ayudar a esclarecer la asociación de los ATLs con estos microdominios de la MP.

Incluso tras 6 h de tratamiento, sólo un porcentaje reducido de la [³H]-edelfosina se acumuló en los DRM. Además del RE, el otro compartimento en el que se acumulan los análogos fluorescentes de edelfosina es la vacuola. Las membranas vacuolares probablemente se concentran en las fracciones no-DRM, y aportarían la mayor parte de la [³H]-edelfosina que se encuentra en esta fracción. Esta hipótesis encaja con lo observado en el mutante *end4pep4Δ*, que presentó una mayor acumulación de [³H]edelfosina en los DRM. La incorporación de edelfosina en este mutante es semejante al WT³⁰⁵,

y mantiene activo el transporte al RE (ilustración 27 B); sin embargo, los defectos en endocitosis disminuirían el transporte de edelfosina a la vacuola, y como resultado la fracción presente en el RE (asociada a los LR y por tanto presente en la fracción DRM) podría ser mayor.

La presencia de los ATLs en los *lipid rafts* desestabiliza la asociación de Pma1 con los microdominios

Pma1 se asocia a LR ya durante la vía secretora, y su presencia en estos microdominios es esencial para la estabilidad de la proteína^{159,198,206,474,479}. Es por tanto verosímil que haya una relación entre la incorporación de los ATLs a estos microdominios y la internalización de Pma1 que provocan. Aunque la interacción ATL-LR sea transitoria en la membrana plasmática, los efectos pueden ser más duraderos. Los esteroides, localizados principalmente en la MP, sufren una internalización significativa tras 30 minutos de tratamiento con edelfosina, y tras 60 minutos han abandonado casi completamente la MP^{305,320}. Esta internalización de esteroides requiere de una endocitosis activa y no se observa en el mutante *end4pep4Δ*³⁰⁵. Los esteroides se acumulan en estructuras intracelulares cuya naturaleza no ha sido posible determinar hasta el momento; no muestran, sin embargo, colocalización con la Pma1 internalizada, y de hecho preceden la internalización de cantidades significativas de la ATPasa³²⁰. Estos resultados sugieren que la incorporación de edelfosina a la MP provoca la pérdida de esteroides en la misma, fenómeno que posteriormente lleva a la internalización de Pma1.

Como se planteó en la anterior sección, el mutante *end4pep4Δ* incorpora la edelfosina al RE al igual que las células WT. La mutación *end4* causa una reducción en la endocitosis, mientras que la mutación *pep4Δ* impide el correcto funcionamiento de los enzimas degradativos de la vacuola y los endosomas. Por tanto, no parece probable que la interacción entre los ATLs y la membrana plasmática se vea alterada en este mutante. Sin embargo, en experimentos de fraccionamiento celular se observó que Pma1 pierde su asociación con los DRM tras tratamiento con edelfosina (ilustración 41 B), proceso que también provocan miltefosina y perifosina (ilustración 41 A). En el mutante *end4pep4Δ* Pma1 se mantiene en las fracciones DRM. El defecto de endocitosis del mutante podría evitar la internalización de esteroides, la internalización de Pma1 o ambos procesos; en cualquier caso, la internalización de Pma1 resultante se vería impedida, lo que tendría como consecuencia la resistencia de este mutante a edelfosina.

Esta internalización de proteínas de la MP promovida por edelfosina no se limita a Pma1. Mediante microscopía de fluorescencia fue posible monitorizar las proteínas de membrana Fur4 (transportador de uracilo) y Can1 (transportador de arginina). Aunque la localización en la MP de estas proteínas se corresponde a un compartimento de membrana (MMC) distinto del que ocupa Pma1 (MMP)¹⁵⁶, ambas se localizan en las fracciones DRM^{156,480}. En células tratadas con edelfosina ambas proteínas sufrieron internalización³²⁰. Es interesante señalar que transportadores como Fur4 y Can1 están regulados por la disponibilidad de nutrientes, en ausencia de los cuales se degradan²²⁴. Esta

degradación tiene lugar mediante un mecanismo semejante al propuesto para Pma1: internalización a los endosomas, incorporación a los MVB dependiente de ubiquitinación y degradación en la vacuola. Existe por tanto en la célula un mecanismo por el que proteínas de la MP sufren esta internalización y degradación. El tratamiento con ATLS podría facilitar la entrada no fisiológica de Pma1 en dicho mecanismo.

Existe evidencia experimental de que la modificación de las propiedades de los LR puede afectar a la asociación de Pma1p y resultar en la pérdida de estabilidad de la ATPasa. En los esfingolípidos de levadura se encuentran ácidos grasos de cadena larga, que son fundamentales para la asociación de Pma1p a los LR^{159,206,207}. La ausencia de cualquiera de las elongasas que sintetizan estos ácidos grasos, *ELO2/FEN1* y *ELO3/SUR4*, conlleva un defecto parcial en esta asociación y la internalización y degradación en la vacuola de Pma1p¹⁵⁹. Los mutantes *fen1Δ* y *sur4Δ* también son hipersensibles a la edelfosina (tabla supl. 2, ³⁰⁵). Un mutante termosensible *lcb1-100*, con un defecto global en la síntesis de esfingolípidos, también evita la asociación de Pma1p con los LR y sufre su internalización a la vacuola¹⁹⁸. El mutante *lcb1100* es hipersensible a edelfosina, lo que sugiere que este compuesto también altera la asociación de Pma1p con los LR³⁰⁵. La ATPasa mutante Pma17p también debe su inestabilidad a un defecto en la asociación con los LR. De acuerdo con esto, la sobreexpresión del gen *AST1* reduce la sensibilidad del mutante *pma1-7* al evitar la degradación de la ATPasa⁴⁷³. Se ha demostrado que *AST1* restaura la asociación de Pma17p con los LR¹⁹⁸, y *AST1* también reduce la sensibilidad a edelfosina³⁰⁵. La asociación Pma17p con los LR se ve alterada en el aparato de Golgi. Sin embargo, se ha observado un proceso semejante en la membrana plasmática, tanto con la Pma1p WT en un mutante *lcb1-100* crecido a 30 °C⁴⁷⁹ como en el caso de otro mutante de la ATPasa (*pma1-10*) que alcanza la MP antes de sufrir la desestabilización y la internalización a la vacuola^{481,482}. En ambos casos se produce ubiquitinación de la ATPasa y degradación vacuolar como resultado de la pérdida de estabilidad. Por tanto, estos mutantes parecen ser modelos de cómo se comporta la Pma1 WT en los LR en tratamientos con edelfosina.

Se desconocen, con la excepción de la internalización de ergosterol, los efectos precisos que los ATLS tienen sobre la composición de la MP o su compartimentalización, así como hasta que punto mimetizan la depleción de esfingolípidos observada en el mutante *lcb1-100*. La hipersensibilidad a edelfosina de dicho mutante sugiere que el efecto de ambos procesos es al menos comparable. El efecto de la depleción del ergosterol sobre Pma1 podría ser indirecto, afectando a otros componentes (lipídicos o proteicos) que, a su vez, alterarían la estabilidad de Pma1. En ese sentido, se ha observado que el ergosterol se concentra en el compartimento MCC¹⁵⁷, mientras que Pma1 se localiza en el compartimento complementario MCP. Se ha propuesto también que existen microdominios fundamentalmente formados por esfingolípidos¹⁵⁵. Dado que la asociación de Pma1 con los DRM depende fundamentalmente de la síntesis de esfingolípidos¹⁹⁸, Pma1 podría residir en dichos microdominios dentro del compartimento MCP; no obstante, no existe por el momento un modelo

de la compartimentalización de la MP suficientemente completo, por lo que la asociación de los ATLS y de Pma1 con cada compartimento, y las alteraciones que en los mismos se produzcan, deberán ser estudiadas con mayor detalle en el futuro.

Otra cuestión a tener en cuenta es la relación de los compartimentos de la MP con la endocitosis. El compartimento MCC se corresponde con complejos proteicos permanentes denominados eisomas¹⁶⁰, que se han implicado en la regulación de endocitosis. Se han propuesto modelos muy distintos para la acción de los eisomas: desde sitios permanentes de endocitosis¹⁶¹ hasta sitios de exclusión de endocitosis, que regularían este proceso fuera del compartimento MCC¹⁵⁸. Una explicación completa del microambiente que rodea a Pma1, la naturaleza y función de los compartimentos MCC/MCP y la participación de los mismos en la endocitosis es necesaria para plantear un modelo satisfactorio que explique las alteraciones que los ATLS provocan sobre la membrana plasmática y como estas alteraciones pueden inducir la endocitosis de Pma1.

Un modelo hipotético de la internalización y degradación de Pma1 por edelfosina

En base a todas las observaciones realizadas se ha elaborado un modelo del tráfico de Pma1, recogido en la ilustración 73. Pma1 reside en microdominios *lipid raft* en la membrana plasmática (ilustración 73 A). La edelfosina se incorpora a estos microdominios (ilustración 73 B), provocando alteraciones en los mismos aún no dilucidadas completamente. La edelfosina se transporta rápidamente a los compartimentos intracelulares de la vacuola y el retículo endoplásmico, mientras que el ergosterol, uno de los componentes de los *lipid rafts*, también abandona la membrana plasmática y se internaliza a un compartimento de identidad desconocida (ilustración 73 D). Pma1 abandona su localización como resultado de estas alteraciones, siendo internalizada. La naturaleza precisa de estas alteraciones y cómo afecta en la membrana plasmática a Pma1 se desconocen por el momento. Pma1 podría desplazarse fuera de su dominio lipídico (mostrado en la ilustración 73 B, flechas verdes). La edelfosina podría también alterar la asociación de Pma1 con los microdominios, exponiendo esta proteína a un mecanismo –del que previamente estaba protegida– que promoviera su internalización. La edelfosina podría también incorporarse y alterar un compartimento de la membrana plasmática distinto al que contiene Pma1 pero compuesto igualmente por *lipid rafts*. Dicho compartimento regularía la estabilidad de Pma1, y su alteración llevaría a la internalización de la proteína.

Pma1 se internaliza por endocitosis a compartimentos endosomales y se ubiquitina (ilustración 73 C-2 y C-1). El tráfico posterior de la proteína depende de los distintos componentes del tráfico endosomal. El tráfico retrógrado del endosoma al *trans*-Golgi es necesario para mantener la identidad de ambos compartimentos y la función que realizan. El retrómero podría ser fundamental para mantener el tráfico de hidrolasas necesarias para la degradación endosomal (ilustración 73 C6). La ubiquitinación de Pma1 permite su reconocimiento por subunidades del complejo ESCRT (ilustración 73 C3), y el

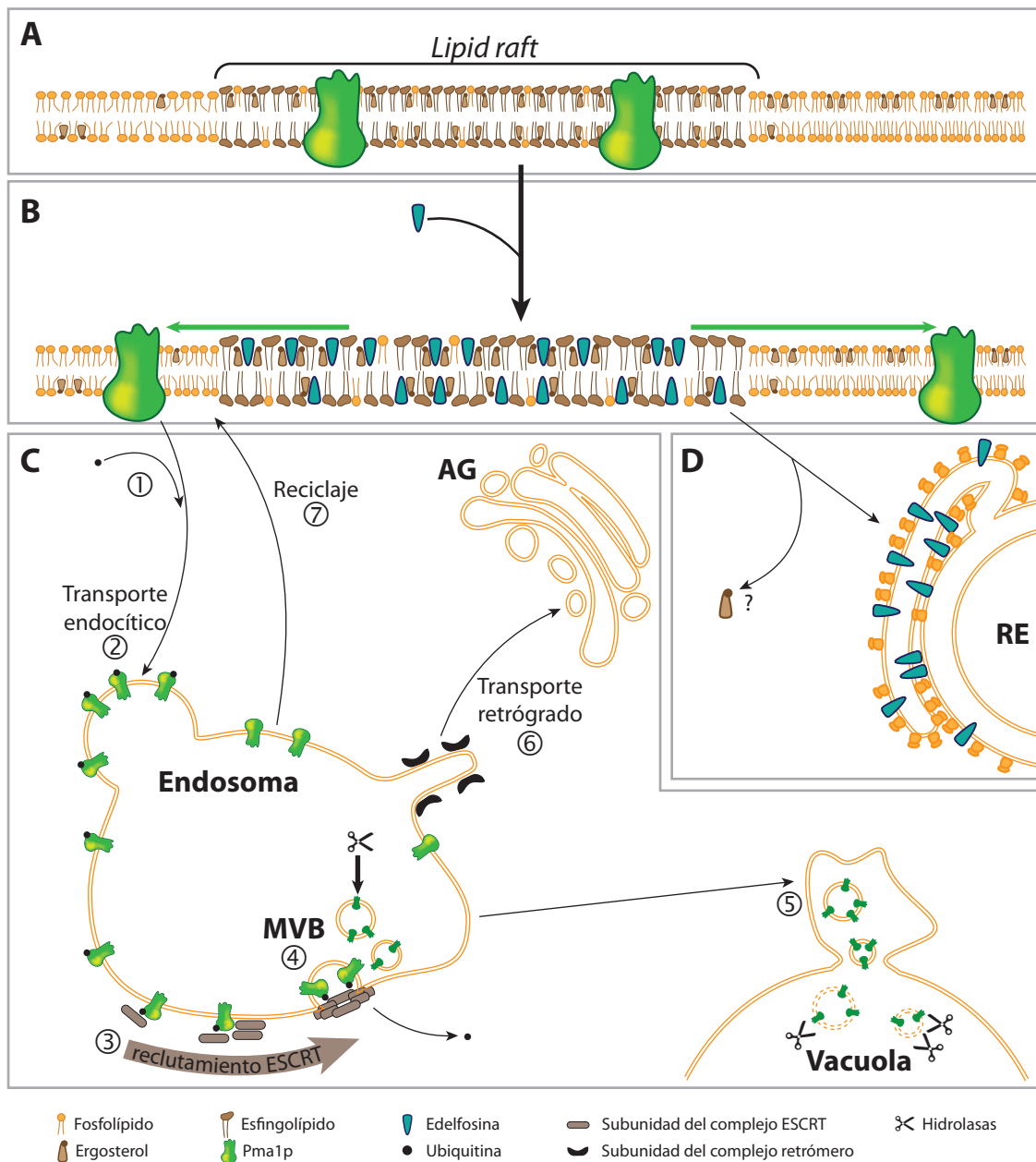


Ilustración 73: modelo de la internalización y degradación de Pma1 por edelfosina. **A:** Pma1 se localiza en los *lipid rafts* de la MP. **B:** la edelfosina se incorpora a los *lipid rafts* y provoca alteraciones en los mismos. **C:** Pma1 abandona la membrana plasmática y se internaliza por vía endosomal, sufriendo ubiquitinación (1) y endocitosis (2), reconocimiento por el ESCRT (3), reciclaje de la ubiquitina e incorporación de Pma1 a los cuerpos multivesiculares (4) y transporte a la vacuola, donde se degrada (5). La función de los endosomas requiere de un transporte retrógrado funcional al *trans*-Golgi (6). El transporte retrógrado desde el endosoma contrarresta la acción de esta vía degradativa y, en presencia de mutaciones en esta última, permite la recuperación de Pma1 (7). **D:** una de las alteraciones provocadas por la edelfosina es la internalización del ergosterol. La edelfosina se incorpora rápidamente a la vacuola y el retículo endoplásmico. AG: aparato de Golgi. MVB: cuerpo multivesicular. RE: retículo endoplásmico.

reclutamiento de este complejo lleva a la formación de un cuerpo multivesicular y la incorporación de Pma1 a las vesículas intraluminales del mismo (ilustración 73 C4). Estas vesículas (y las proteínas a ellas incorporadas) son objeto de degradación por parte de hidrolasas en el endosoma tardío y en la vacuola (ilustración 73 C5). Esta vía degradativa a través de los endosomas lleva a la pérdida de la

Pma1 funcional en la membrana plasmática y, como consecuencia, a la acidificación del citosol. En los endosomas también tienen lugar procesos de reciclaje a través del *trans*-Golgi y la vía secretora o directamente a la membrana plasmática (ilustración 73 C7). Las mutaciones que alteran los pasos de la vía degradativa retrasan o impiden la progresión de Pma1 por la misma, facilitan el reciclaje de la proteína a la membrana plasmática y evitan la pérdida de su función.

Origen de la Pma1 internalizada

La interpretación del tráfico vesicular de Pma1 realizada hasta el momento se ha basado en el supuesto de que su internalización sucede desde la membrana plasmática. Sin embargo, los tratamientos con ATIs en presencia de cicloheximida (un inhibidor de la síntesis proteica) y brefeldina A (un inhibidor del transporte del RE al AG) provocaron una menor internalización de la ATPasa a la vacuola (ilustración 43). Esto parece indicar que la Pma1 internalizada a la vacuola es, de hecho, aquella sintetizada *de novo* y no la que ya se encuentra presente en la membrana plasmática. Por el contrario, en una publicación previa del laboratorio se había determinado que la Pma1 internalizada era mayoritariamente la preexistente³⁰⁵. Esta interpretación se basa en el seguimiento de la síntesis proteica mediante pulso y caza con [³⁵S]-metionina/cisteína. Tras un pulso de 5 minutos las células se trataron con edelfosina. Una caza de 30 minutos no reveló la salida de Pma1 de los DRM. Bagnat y colaboradores han observado que la asociación de Pma1 con los DRM es prácticamente completa tras 15 minutos y alcanza un nivel estable tras 30 minutos¹⁹⁸. Estos autores habían determinado que esta asociación se producía en el AG, por lo que esos tiempos indicarían la llegada de la mayoría de la proteína al orgánulo. Dado que la incorporación de edelfosina al interior celular ocurre en esa misma escala temporal, la disociación de Pma1 de los DRM no parece afectar a la ATPasa antes de alcanzar la superficie celular.

Una objeción que se puede realizar a ese experimento es que la acumulación de edelfosina se produce en el RE y no en el AG, un hecho no conocido durante la elaboración del primer artículo. La proteína, marcada durante la síntesis en el RE, comienza a abandonar este orgánulo inmediatamente, y una fracción muy importante ya ha alcanzado el AG tras 15 minutos. La edelfosina se añadió a las células inmediatamente después de finalizar el pulso de marcaje. Por tanto es posible que la edelfosina sólo se encontrara en el RE cuando la mayoría de la Pma1 ya había abandonado este orgánulo. Se ha postulado aquí además que el transporte al RE ocurre por una vía de transporte no vesicular. Por tanto cabría suponer que la proteína abandonaría el RE antes de entrar en contacto con la edelfosina, y hasta alcanzar la membrana plasmática atravesaría únicamente compartimentos (el AG y las vesículas de secreción) en los que no estaría presente el compuesto, con lo que lógicamente no se esperarían ni alteraciones en su asociación con los LR ni su salida hacia la vacuola.

Otro experimento realizado con 1 hora de caza sin edelfosina (tiempo suficiente para que la proteína sintetizada *de novo* alcance la MP) y 1 hora de incubación con edelfosina sí mostró la

salida de la proteína marcada de las fracciones DRM³⁰⁵. Esto indica que al menos parte de la Pma1 internalizada se corresponde a la ya preexistente en la MP, lo que explicaría la resistencia mostrada por algunos mutantes de endocitosis. También sería posible que la edelfosina sea capaz de afectar tanto a Pma1 de nueva síntesis como a la preexistente. No se ha hallado una explicación satisfactoria hasta el momento a la discrepancia de estos resultados con los obtenidos en presencia de cicloheximida. Entre las cuestiones que habrá que resolver está comprobar si la preincubación con cicloheximida altera la incorporación y el transporte de los ATLS. Una estrategia alternativa al uso de cicloheximida sería emplear un mutante termosensible defectuoso en el transporte entre el RE y el AG, y observar si el bloqueo de este transporte influye en la localización vacuolar de Pma1.

Futuros experimentos adicionales tendrán que confirmar si la Pma1 que se internaliza a la vacuola es la preexistente en la MP, la sintetizada *de novo* o una mezcla de ambas. En los últimos dos casos, sin embargo, el modelo de translocación planteado anteriormente en base a diversas observaciones (ilustración 73) sería en gran medida aplicable a la Pma1 de nueva síntesis. La entrada de Pma1 a la vía endosomal se produciría desde el TGN, un proceso que ya es utilizado por otras proteínas destinadas a la incorporación posterior a los MVB²¹⁶. De acuerdo con esto, la ATPasa del mutante *pma1-7* se incorpora desde este orgánulo y sigue mecanismos semejantes a los propuestos para Pma1 en presencia de edelfosina, incluyendo ubiquitinación y transporte a través de compartimentos endosomales, desde los cuales puede ser reciclada a la MP^{473,477}. Sí sería una diferencia clave el modo en que la interacción de la edelfosina con los *lipid rafts* puede promover la ubiquitinación de Pma1, lo que conduce a su translocación a la vacuola. La acumulación de edelfosina en el RE podría alterar la asociación de Pma1 con los microdominios, o incluso la formación de estos y su exportación al AG.

Mitocondria

El estrés oxidativo generado y su relevancia en la toxicidad es una diferencia fundamental entre los ATLS

Una de las consecuencias de la toxicidad por ATLS en células de mamífero es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁷⁸. La sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 evita la aparición de estas moléculas, indicando que la mitocondria es el origen o juega un papel crucial en la producción de las mismas⁷⁸. La alta prevalencia de genes mitocondriales en el *screening* de mutantes resistentes a edelfosina sugirió que las ROS podrían jugar un papel semejante en la toxicidad por ATLS en levadura. Se comprobó que el tratamiento con edelfosina inducía la producción de ROS

(ilustración 49). Los perfiles del estrés oxidativo provocado por los tres ATLs son muy diferentes (ilustración 50). Mientras que las células con niveles elevados de ROS aumentan progresivamente durante el tratamiento con edelfosina, la miltefosina provoca un estrés oxidativo moderado. La perifosina provoca, ya a tiempos cortos de tratamiento, niveles elevados de ROS en casi la totalidad de las células. Estos perfiles tan distintos sugirieron una diferencia fundamental en el mecanismo de acción de los compuestos, con posible relevancia para la toxicidad de los mismos.

La causa de esta diferencia entre los tres compuestos podría ser la activación de distintas rutas y fuentes celulares de ROS, pero también la activación diferencial de las mismas rutas, por las cuales los tres compuestos tendrían distinta afinidad. Otro aspecto a tener en cuenta es la alta reactividad de las ROS, cuya interacción con moléculas biológicas puede a su vez generar nuevas y distintas ROS. El estrés oxidativo observado en las células es posiblemente resultado de la acumulación de una cadena compleja de reacciones químicas. Las comparaciones entre el estrés oxidativo producido por los distintos compuestos se basan únicamente en la medición de ese estado final; son por tanto una simplificación, y no recogen necesariamente las diferencias en el proceso de producción de las ROS ni en la composición final de las especies presentes en la célula. Como consecuencia de esta limitación, las propiedades de los mecanismos de producción de ROS que se pueden inferir son limitadas y deben considerarse con cautela. La confirmación experimental de los mecanismos aquí planteados para los distintos compuestos requerirá diseccionar cuidadosamente los posibles componentes implicados.

El empleo de antioxidantes y de inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ilustraciones 51-53) permitió observar diferencias fundamentales en la naturaleza de las ROS y en su relevancia para la toxicidad celular. La reducción del estrés oxidativo mediante antioxidantes hidrosolubles fue muy reducida en el caso de edelfosina, mientras que los antioxidantes liposolubles fueron mucho más eficaces (ilustración 51 A). Se consiguió una reducción total con atocoferyl (αTF), de acuerdo con lo mostrado anteriormente en levadura³¹⁶. Los antioxidantes lipofílicos podrían impedir la incorporación de los ATLs; sin embargo, en presencia de αTF los análogos fluorescentes PTE-ET y Et-BDP-ET se acumularon con normalidad en la célula (ilustración 51 B, C). La geometría de la molécula de edelfosina permite su asociación con esteroides, y en medio suplementado con ergosterol la edelfosina pierde toxicidad (ilustración 30 D). El ergosterol también reduce la toxicidad de la miltefosina, indicando que su geometría molecular es semejante. Sin embargo el αTF evita la toxicidad por edelfosina pero es incapaz de impedir la provocada por miltefosina (ilustración 52), lo que indica que el mecanismo por el que el αTF reduce la toxicidad seguramente no se debe a un secuestro del ATL presente en el medio.

Bitew y colaboradores han estudiado qué partes de la molécula de αTF son esenciales para la inhibición de la toxicidad por edelfosina. Empleando especies derivadas del αTF que carecían de una u otra propiedad, identificaron como determinantes críticos dos aspectos: la liposolubilidad

y la capacidad de transferir electrones y, por tanto, actuar como antioxidante³¹⁶. Los antioxidantes lipofílicos que demostraron eficacia frente a edelfosina, el ácido retinoico y el resveratrol, presentan estas dos características pero son moléculas químicamente muy distintas del α TF, lo que refuerza esa idea. La reducida eficacia de los antioxidantes hidrosolubles sugiere que las especies reactivas de oxígeno son inaccesibles a estos antioxidantes, bien por tener naturaleza lipofílica, bien por encontrarse aisladas de los antioxidantes mediante una barrera lipídica. La eficacia del α TF indica que está neutralizando todas las ROS producidas por edelfosina, o neutralizando un subconjunto específico de las mismas que posteriormente origina el resto de ROS mediante reacciones químicas.

La capacidad de los antioxidantes para disminuir el estrés oxidativo por edelfosina correlaciona bien con su capacidad para evitar la toxicidad del compuesto (ilustraciones 51-52). En el tratamiento con perifosina, la reducción del estrés oxidativo mediante antioxidantes lipofílicos es más moderada, y de acuerdo con ello la inhibición de la toxicidad por este ATL es más reducida. Esta distinta respuesta podría deberse a que las ROS tuvieran una naturaleza distinta respecto a las generadas por edelfosina; sin embargo, los antioxidantes podrían también ser menos eficaces ante los niveles de ROS presentes en los tratamientos con perifosina, que son más elevados y se alcanzan antes. El panorama en el tratamiento con miltefosina sí es radicalmente distinto. Las reducciones obtenidas con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos son similares, lo que indica una naturaleza de las ROS muy distinta a la de los tratamientos con edelfosina. Sin embargo, las células que presentan niveles elevados de ROS son ya de por sí poco abundantes en los tratamientos con miltefosina, lo que sugeriría que el estrés oxidativo no juega un papel en la toxicidad de este ATL. Esto se confirma al no ser los antioxidantes de ninguna clase capaces de revertir la toxicidad de miltefosina, ni siquiera en los casos en los que los ROS se reducen a los niveles de los controles sin tratar (glutatión, α TF).

Mediante el uso de inhibidores de la cadena de transporte de electrones fue posible también modular el estrés oxidativo (ilustración 53), confirmando las observaciones realizadas con los antioxidantes. Se observó, en los tratamientos con edelfosina, la correlación entre inhibición del estrés oxidativo y reversión de la toxicidad, confirmando que las ROS median la toxicidad de este ATL. Por su parte, la inhibición de las ROS provocadas por miltefosina, fuera parcial o completa, no afectó a la toxicidad del compuesto, confirmando que ésta no depende del estrés oxidativo. En los tratamientos con edelfosina y perifosina en presencia de algunos inhibidores (antimicina A, oligomicina) hubo un número comparable de células con ROS elevadas; sin embargo, los inhibidores sólo lograron revertir la toxicidad de edelfosina. Esto parece indicar que, de hecho, el estrés oxidativo no es esencial para la toxicidad por perifosina. Sin embargo, la reducción de dicho estrés lograda con los antioxidantes, aunque menor que la obtenida con los inhibidores, tuvo como consecuencia una reducida recuperación de la viabilidad celular. Estos resultados parecen contradictorios, y no permiten manejar una imagen clara de la importancia del estrés oxidativo provocado por perifosina en la toxicidad de ese compuesto.

Los ROS generados por edelfosina, pero no miltefosina, requieren de la mitocondria

La comparación entre la cepa WT y la cepa ρ^- , carente de respiración, permitió estudiar el origen de las ROS generados por los tres ATLs. La cepa ρ^- produjo una cantidad significativamente menor de ROS que el WT durante el tratamiento con edelfosina (ilustración 50). De acuerdo al papel central propuesto para las ROS en la toxicidad por edelfosina, la cepa ρ^- fue resistente a dicho ATL. Por el contrario, la miltefosina provocó una producción de ROS semejante en células WT y ρ^- indicativo de un origen extramitocondrial. De acuerdo con esto, la cepa ρ^- no mostró resistencia al ATL. Esta diferencia entre los dos compuestos tiene un paralelismo en los respectivos *screenings* de resistencia: mientras que el de edelfosina mostró una gran prevalencia de mutantes en genes mitocondriales, la distribución de los mismos en el de miltefosina fue significativamente menor. Un fenotipo de crecimiento respiratorio ausente (comparable al presentado por la cepa mutante mitocondrial ρ^-) fue además muy prevalente entre los mutantes del *screening* de edelfosina pero no en los de miltefosina.

Todo ello llevó a pensar que la mitocondria, como generador de ROS, era un componente fundamental del mecanismo de toxicidad de edelfosina, pero no de miltefosina. Esta es una diferencia fundamental entre dos compuestos de la misma familia y que comparten en levadura mecanismos de entrada (la flipasa de membrana) y que tienen algunos efectos comunes (la internalización de Pma1 y, posiblemente, el papel de la acidificación citosólica resultante en la toxicidad final). Ambos ATLs inducen apoptosis en células tumorales y pueden emplear mecanismos comunes, como la inhibición del metabolismo lipídico, la inactivación de Akt o la activación de JNK. La diferencia respecto al papel de la mitocondria en la toxicidad de ambos compuestos en levadura indica sin embargo que no puede asumirse *a priori* que las distintas moléculas de la familia de los ATLs vayan a tener un mismo comportamiento en todos los casos. Parece claro que las características que edelfosina y miltefosina comparten son significativas, dados los numerosos mecanismos con los que ambos compuestos interactúan. Sin embargo, las diferencias entre ambas moléculas pueden resultar en algunos casos significativas para su toxicidad, un aspecto que debe tenerse en cuenta en estudios comparativos especialmente.

De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, el origen de los ROS producidos por edelfosina sería fundamentalmente mitocondrial (ilustración 50 A). La reducción del estrés oxidativo observada en la cepa ρ^- fue mayoritaria pero no completa. Posiblemente existen varias fuentes de ROS, aunque la mayoría proceden de este orgánulo. Otra opción no excluyente es la existencia de una cascada de producción de ROS en la que la mitocondria tendría un papel central. Las ROS producidas por la perifosina, por el contrario, no se originan en la mitocondria (ilustración 50 B). En este caso la cepa ρ^- sufre semejantes niveles de estrés oxidativo a la cepa WT, y ambas son igualmente sensibles al compuesto. La cepa WT adquiere resistencia a los dos ATLs en presencia de antioxidantes y estos compuestos son capaces de disminuir la acumulación de ROS, indicando que participan en

la toxicidad. Los antioxidantes liposolubles, eficaces en los tratamientos con edelfosina, lo fueron parcialmente con perifosina (ilustración 51 A), lo que indica una naturaleza semejante de al menos parte de las ROS producidas por ambos compuestos. Las ROS difieren sin embargo en varios puntos: el ya mencionado origen, la reducción del estrés oxidativo por antioxidantes hidrofílicos (mayor en los tratamientos con perifosina), la magnitud de la reducción del estrés provocada por los antioxidantes lipofílicos. Así mismo, los inhibidores que reducen el estrés oxidativo completamente restauran la viabilidad de las células tratadas con edelfosina pero no las tratadas con perifosina. Por todo ello la producción de estrés oxidativo por estos dos compuestos parece tener notables diferencias. Por último, la miltefosina es muy diferente a la edelfosina con respecto a las ROS producidas y su papel en la toxicidad. El origen de las mismas no es mitocondrial (ilustración 50 C), y la cepa ρ^- tampoco es resistente al compuesto. El estrés oxidativo producido por la miltefosina es sin embargo mucho menor, y ninguno de los antioxidantes o inhibidores que logran reducirlo (incluso cuando alcanzan los niveles de los controles sin tratar) provoca un aumento de la viabilidad. Esto parece indicar que la producción de ROS es secundaria para la toxicidad por miltefosina. Respecto a la naturaleza de las ROS, se observa reducción con antioxidantes tanto hidrosolubles como liposolubles.

Un modelo hipotético que conjuga todas estas observaciones se encuentra resumido en la ilustración 74. Los mecanismos de acción de los 3 ATLs estudiados inducen diversos efectos, entre ellos la producción de ROS; no obstante, este proceso es sólo crítico para edelfosina y perifosina (ilustración 74 A, B). Las ROS producidas por los dos compuestos no han sido cuantificadas ni se conoce su naturaleza exacta. La inhibición de la toxicidad debida a los antioxidantes fue menor para perifosina, aunque también fue menor el descenso del estrés oxidativo. Todo ello imposibilita una comparación directa entre ambos ATLs del peso del estrés oxidativo en la toxicidad final. En miltefosina las ROS juegan un papel secundario, siendo otros mecanismos los fundamentales para la toxicidad (ilustración 74 C).

En edelfosina y perifosina el estrés oxidativo no se debe probablemente a un único proceso, y probablemente ciertas moléculas (ROS iniciales) generan a su vez nuevas moléculas cuya naturaleza o localización podría ser distinta (ROS secundarias). En los tratamientos con edelfosina (ilustración 74 A) la cepa ρ^- sufrió una reducción notable de las ROS, indicativo de un papel fundamental de la mitocondria en el estrés oxidativo. Un origen mitocondrial de ROS iniciales provocaría un descenso de especies posteriores. Otra posibilidad es la activación por edelfosina de múltiples mecanismos independientes que aportaran ROS, siendo uno de ellos la mitocondria. En este caso la importancia del mecanismo mitocondrial podría ser cuantitativa (aportaría la mayoría de ROS, permitiendo alcanzar el umbral que llevaría a la toxicidad) o cualitativa (sólo en presencia de las ROS específicamente mitocondriales el estrés oxidativo se traduciría en daño). La reducción de ROS mediante antioxidantes liposolubles fue mayor, y sólo estos antioxidantes inhibieron la toxicidad por ATLs. Esto indica la naturaleza lipídica, o su localización en un compartimento lipídico, de al menos parte de las ROS.

Como pasaba con la mitocondria, la mayor importancia de las ROS lipofílicas en el estrés oxidativo puede ser cuantitativa (las ROS son mayoritariamente lipofílicas, sólo los antioxidantes de esa misma naturaleza logran reducir el estrés lo suficiente y evitar la toxicidad) o cualitativa (de entre todas las ROS producidas, las lipofílicas son esenciales para la acción o producción del resto).

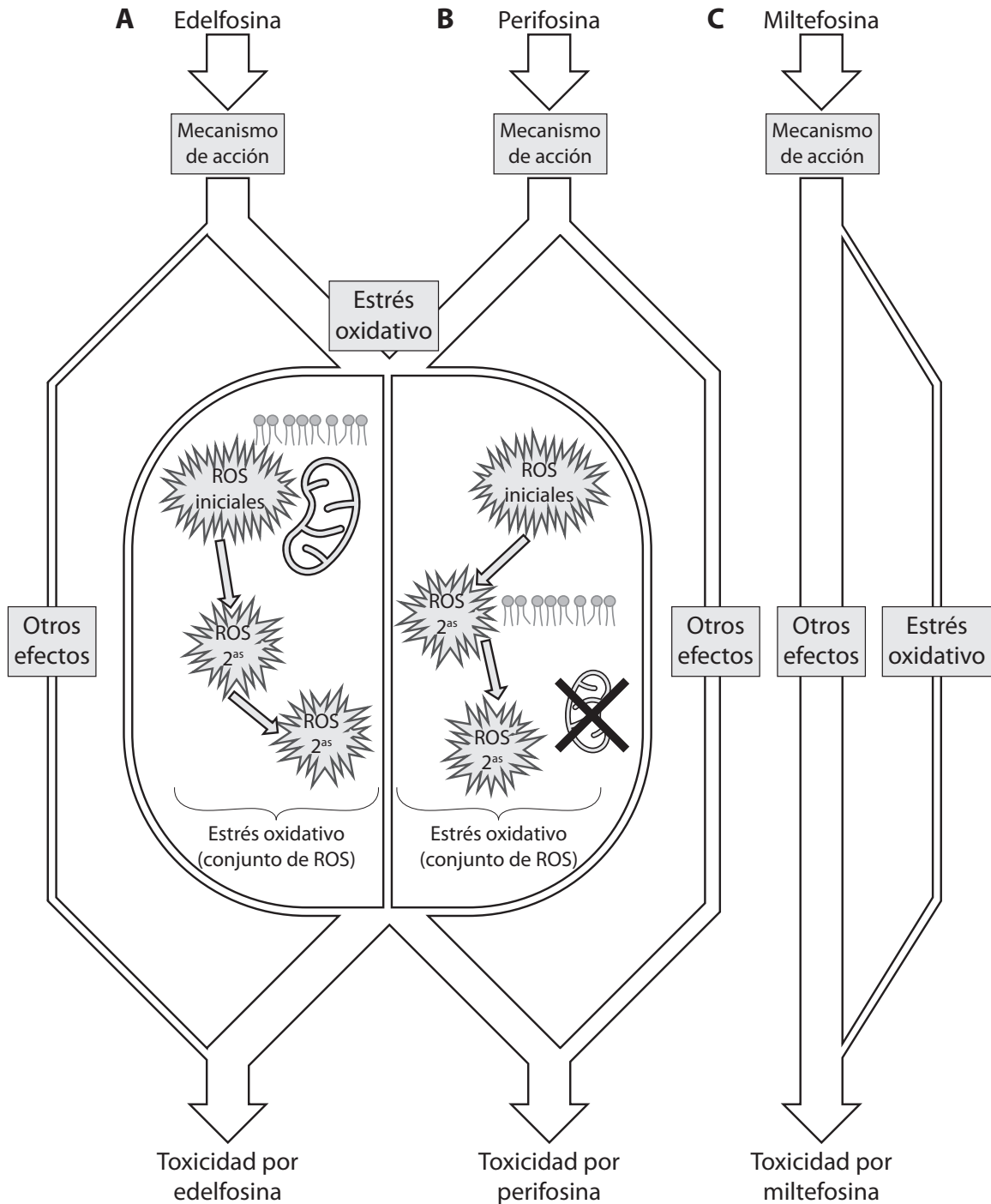


Ilustración 74: Modelo del papel de las ROS en la toxicidad por ATLs. **A:** edelfosina. **B:** perifosina. **C:** miltefosina. El grosor de las flechas blancas indica la relevancia del proceso indicado en la toxicidad final. Se representan los posibles pasos en los que se implica la mitocondria y un ambiente lipídico, representado por una membrana.

En los tratamientos con perifosina (ilustración 74 B) las ROS fueron idénticas en la cepa WT y la cepa ρ^- , por lo que la mitocondria no interviene activamente en la generación del estrés oxidativo. Los antioxidantes liposolubles fueron menos eficaces, tanto en la reducción de ROS como en la inhibición de la toxicidad. Esto indicaría diferencias, con respecto a la edelfosina, en la generación de ROS y aparición de subsiguientes moléculas. La distinta naturaleza de las moléculas que componen el estrés oxidativo resultante podría explicar la mayor eficacia de los antioxidantes hidrosolubles y la menor de los liposolubles: bien las ROS liposolubles son menos abundantes, bien no inician la formación de otras ROS. A pesar de esta diferencia, las ROS liposolubles siguen siendo más críticas para la toxicidad final de perifosina, al igual que sucede con la edelfosina.

El papel del estrés oxidativo en la toxicidad por edelfosina se soporta en tres evidencias: la inhibición de la toxicidad por edelfosina en la cepa ρ^- , tratamiento con antioxidantes e inhibidores de la cadena de transporte de electrones, condiciones todas ellas capaces de reducir los niveles de ROS. La producción por miltefosina y perifosina de ROS en la cepa ρ^- , sin embargo, no es totalmente congruente con la bajada observada empleando inhibidores de la cadena de transporte de electrones. Las diferencias entre el estrés oxidativo causado por perifosina en la cepa ρ^- y en células WT tratada con antimicina A u oligomicina fueron especialmente chocantes, y apuntan a que uno de los dos escenarios es más complejo: bien los inhibidores afectan a otros componentes celulares distintos de la mitocondria, bien las diferencias de la cepa ρ^- con la cepa WT van más allá de un mero defecto en la respiración celular.

Las dos estrategias experimentales empleadas para comprobar la importancia de la mitocondria en la generación de ROS tienen contrapartidas. La cepa ρ^- se generó por tratamiento con bromuro de etidio, un agente mutagénico que provoca, preferentemente, daños en el ADN_{mit}²⁹⁰. Una colonia *petite*, o de crecimiento reducido, se aisló, y se comprobó su incapacidad de crecer en medio con glicerol como única fuente de carbono (que evidenciaba un defecto en la respiración) y la falta de tinción con Mitotracker Red CMXRos (congruente con una incapacidad de generar un Ψ_m funcional). La naturaleza del daño provocado por el bromuro de etidio no es fija, y de hecho se denominan a estas cepas ρ^- por tener defectos en el ADN_{mit}, pero no ρ^0 , que implicaría la ausencia total de mismo. Se desconoce en la cepa ρ^- la extensión tanto del daño en el ADN_{mit} como de la pérdida consiguiente de función en la cadena de transporte de electrones. Los componentes presentes en la mitocondria de la cepa ρ^- podrían ser insuficientes para permitir la respiración pero permitir la generación de ROS.

Por su parte, los inhibidores de la cadena de transporte de electrones podrían alterar otros componentes celulares. Este parece ser el caso de la rotenona, un inhibidor del complejo I de células de mamífero pero no en levadura, que no posee un complejo I canónico. Sin embargo se observó durante los experimentos con inhibidores que la rotenona sí es capaz de reducir la producción de ROS y la toxicidad de edelfosina, mediante un efecto independiente de la mitocondria. No se

puede descartar que los inhibidores empleados tengan del mismo modo otros efectos, aunque la especificidad tanto de la oligomicina como de la antimicina A como inhibidores mitocondriales está bien establecida. Además la producción de ROS se logró inhibir mediante el uso de cuatro moléculas (dos casi completamente, dos parcialmente) químicamente distintas. Parece por tanto poco probable que las cuatro moléculas interactuaran con otro mecanismo independiente de la mitocondria que, a su vez, pudiera ser el origen de las ROS.

En todo caso será necesario realizar nuevos estudios para resolver la contradicción entre estos resultados y determinar el papel real de la mitocondria en la generación de ROS por los distintos ATLS. Una alternativa sería repetir los ensayos descritos en este trabajo, empleando mutantes de genes nucleares específicos de los complejos de la cadena de transporte de electrones. Este enfoque podría dar una idea mejor del origen de las ROS producidas por cada ATL. El empleo de estos mutantes en conjunto con los inhibidores permitiría además una interpretación inequívoca del efecto real que estos compuestos tendrían sobre las células. Finalmente, dado que se han descrito procesos de interdependencia y regulación entre los componentes de la maquinaria de la respiración, podrían abordarse estos experimentos con mutantes sensibles a la temperatura, que pueden cultivarse a una temperatura en la que son funcionalmente normales y, en el momento del experimento, cambiarse a la temperatura restrictiva para inducir la pérdida de función asociada al gen mutante.

Un factor que deberá ser analizado en futuros experimentos es la posible activación de la respuesta retrógrada de la mitocondria en el mutante ρ^- . Las células de *S. cerevisiae* pueden emplear la fermentación como única fuente de energía y por tanto sobrevivir a la pérdida de la respiración mitocondrial. En estas condiciones se activa una vía de señalización denominada respuesta retrógrada (RTG) de la mitocondria que, mediante la expresión de ciertos genes, permite la adaptación del metabolismo celular a la pérdida de este orgánulo⁴⁸³. Los efectores fundamentales de dicha vía de señalización son los factores de transcripción *RTG1/3*, que son mantenidos inactivos (excepto cuando se activa la respuesta RTG) por *MKS1*, que los excluye del núcleo⁴⁸³. El mutante *mks1Δ* es resistente a edelfosina (tabla supl. 1), lo que sugiere que la activación de la respuesta RTG promueve la resistencia al compuesto. Entre los genes activados por la respuesta RTG hay reguladores de la respuesta pleiotrópica a drogas⁴⁸⁴, y se ha demostrado previamente que componentes de esta respuesta median la expulsión de edelfosina al medio extracelular¹⁰¹. De acuerdo con eso, se ha demostrado en este trabajo que un plásmido que porta el factor de transcripción *PDR3* (tabla 5), un regulador de esta respuesta, es un supresor de la sensibilidad a ATLS. Una posible explicación de la resistencia a edelfosina mostrada por la cepa ρ^- sería la activación de la respuesta RTG y, a través de ella, de la respuesta pleiotrópica a drogas, que llevaría a la expulsión del compuesto de la célula. No se explicaría sin embargo la resistencia de la cepa ρ^- a edelfosina pero no a miltefosina y perifosina, que presumiblemente serían también expulsadas de la célula por el mismo mecanismo. Esta hipótesis debería contemplarse en futuros experimentos que busquen caracterizar la resistencia a edelfosina de la cepa ρ^- . Dado que

el mecanismo aquí propuesto implicaría la expulsión de la célula de la edelfosina, experimentos de incorporación del compuesto podrían indicar si la respuesta RTG y la respuesta pleiotrópica a drogas juegan un papel en la resistencia de la cepa ρ^- .

Se desconoce la relevancia de la fragmentación mitocondrial inducida por ATLS para la toxicidad celular

Una característica común a los tres ATLS ensayados en este trabajo es que inducen fragmentación mitocondrial (ilustraciones 55 y 56). El antioxidante α -tocoferol redujo la fragmentación mitocondrial en los tratamientos con edelfosina y perifosina, lo que sugiere que existe una relación entre fragmentación mitocondrial y toxicidad de los compuestos. De acuerdo con esto, un experimento preliminar con el mutante resistente a edelfosina *vps35 Δ* mostró una fragmentación más reducida que las células WT en el tratamiento con edelfosina, mientras que en el mutante *lem3 Δ* prácticamente ninguna célula mostró fragmentación mitocondrial (datos no mostrados). La mitocondria es un orgánulo dinámico, sujeto a constantes procesos de fisión y fusión²⁷⁸. La morfología mitocondrial es afectada por cambios ambientales, incluida la disponibilidad de nutrientes. Notablemente, la fragmentación mitocondrial es un marcador típico de apoptosis en células de mamífero, y se ha asociado en *S. cerevisiae* la fragmentación mitocondrial a la respuesta a distintos tipos de estrés y tóxicos⁴⁸⁵. De acuerdo con todo ello es tentador plantear un modelo sencillo que relacionara fragmentación mitocondrial y el efecto citotóxico de los ATLS, en el que el primer proceso sería un paso inicial e imprescindible para la toxicidad. Sin embargo, no hay suficiente evidencia experimental en los resultados de este trabajo que apoye o desmienta tal hipótesis.

El principal argumento a favor de un papel en la toxicidad por ATLS de la fragmentación mitocondrial es que la delección de varios genes que regulan la morfología del orgánulo provocó resistencia a edelfosina: *mdm38 Δ* , *ptc6 Δ* , *uth1 Δ* y *dnm1 Δ* . Sólo los dos últimos mutantes fueron además resistentes a miltefosina, a pesar de que ambos ATLS provocan fragmentación mitocondrial. Es por tanto cuestionable que la resistencia observada, al menos en los dos primeros mutantes, se deba a un impedimento en la fragmentación mitocondrial. Tampoco se ha estudiado aún la morfología mitocondrial de estos mutantes en los tratamientos a ATLS. El papel de la morfología mitocondrial en el proceso de toxicidad por ATLS es por el momento dudoso. Una alternativa verosímil sería que la fragmentación mitocondrial sea una respuesta celular a condiciones de estrés, independiente de los mecanismos empleados por los ATLS para matar las células o, al menos, no crítica para la activación de estos mecanismos. Sería esclarecedor, para comprobar este punto, comprobar individualmente en cepas con un defecto conocido en fisión mitocondrial (*fis1 Δ* , *mdv1 Δ*) tanto la morfología del orgánulo como la fragmentación del mismo y la sensibilidad frente a ATLS. Otra estrategia consistiría en favorecer la morfología mitocondrial opuesta (mediante la sobreexpresión de genes que favorezcan la fusión mitocondrial, como *FZO1*) y comprobar el efecto sobre la respuesta celular a ATLS. Hay que

tener en cuenta en todo caso que la morfología y la función de, al menos, la ATP sintasa mitocondrial están relacionadas⁴⁸⁶, y que un mutante con alteraciones en la morfología mitocondrial podría presentar además otras alteraciones funcionales. Este es el caso de los mutantes *uth1Δ* y *mdm38Δ*, con un crecimiento respiratorio reducido. La resistencia a ATLs del mutante *dnm1Δ* no puede, por tanto, interpretarse únicamente a la luz de los defectos en fisión mitocondrial, al menos hasta comprobar otros defectos en funciones mitocondriales.

Una causa de la fragmentación mitocondrial observada podría ser la hiperpolarización de las mitocondrias tras el tratamiento con ATLs. Las mitocondrias forman un retículo ramificado más o menos continuo en *S. cerevisiae*²⁷⁵. En anaerobiosis o represión por glucosa las mitocondrias ocupan un menor volumen celular y presentan una menor ramificación que las condiciones que promueven la respiración^{273,274}. El cambio diáxico, que separa el crecimiento fermentativo y el respiratorio, se asocia a cambios morfológicos en las mitocondrias²⁷⁴. Visser *et al* observaron una morfología mitocondrial de cordones largos y ramificados en células crecidas en medio con glucosa al 0,4%²⁷⁷ (ilustración 75 B). Esta morfología reticular ha sido observada por diversos autores en reconstrucciones tridimensionales de las células, y sufre un desarrollo de su volumen y complejidad cuando se induce la respiración^{275,276}. Cuando las células se cultivaban en un quimiostato –con una composición estable del medio– de manera prolongada y la fuente de carbono era etanol o una baja concentración de glucosa, la morfología cambiaba, observándose un elevado (>20) número de mitocondrias disgregadas y de pequeño tamaño²⁷⁷ (ilustración 75 A). Esta morfología había sido observada por Yotsuyanagi en medio con glucosa cuando se superaba el cambio diáxico, tras una fase estacionaria prolongada²⁷⁴, y parece por tanto darse en condiciones prolongadas de estimulación de la respiración o de consumo de etanol.

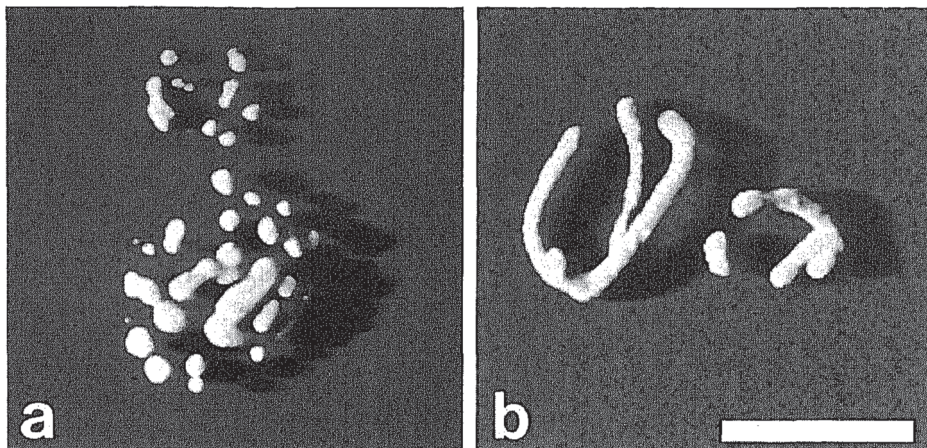


Ilustración 75: morfología de mitocondrias teñidas con DASPMI y observadas por microscopía confocal. **a:** células crecidas con etanol como única fuente de carbono. **b:** células crecidas con glucosa 0,4%. De Visser *et al*, 1995²⁷⁷.

Las reconstrucciones tridimensionales de las mitocondrias con morfología reticular o disgregada (ilustración 75, paneles B y A) tienen una apariencia muy semejante a la mostrada en este trabajo en

células control y tratadas con ATL respectivamente. Esta correlación entre actividad mitocondrial y fragmentación podría explicar la fragmentación mitocondrial observada en los tratamientos con ATLs. Los compuestos inducen una hiperpolarización mitocondrial (ilustraciones 60-65) que, a su vez, provocaría los cambios observados en la morfología. Las células sin tratar crecidas en medio con glicerol presentan un Ψ_m más elevado de por sí, que predispondría a las células a sufrir una fragmentación más rápida y completa. Este modelo encaja con el propuesto por Pozniakovsky y colaboradores para la fragmentación mitocondrial inducida por amiodarona o feromona³⁸⁹. Ese trabajo señaló la hiperpolarización como causa de la producción de estrés oxidativo. La hiperpolarización provocada por ATLs es anterior a la elevación de las ROS en las células, y en presencia de glucosa coinciden los compuestos que más hiperpolarizan las células y los que producen una mayor cantidad de ROS: perifosina > edelfosina > miltefosina (ilustraciones 60, 62, 64 y 50). Una diferencia fundamental entre ese trabajo y el aquí presentado es que eran capaces de inhibir la producción de ROS por igual con NAC y α TF. El tratamiento con NAC también redujo la fragmentación mitocondrial inducida por amiodarona, mientras que la fragmentación por ATLs fue reducida sólo parcialmente por tratamiento con α TF (ilustración 57). Aunque la fragmentación mitocondrial causada por los dos tratamientos presenta diferencias, hay similitudes suficientes para plantearse comprobar en células tratadas con ATLs el modelo de fragmentación propuesto por Pozniakovsky y colaboradores. Un elemento de especial interés sería comprobar la fragmentación en un mutante *ysp1* Δ , que codifica una proteína mitocondrial esencial para la fragmentación mitocondrial inducida por amiodarona³⁸⁹.

Conclusiones

1. La edelfosina induce la ubiquitinación de Pma1p, la protón ATPasa de la membrana plasmática. Pma1p se transloca a la vacuola, donde se degrada, en los tratamientos con edelfosina, miltefosina y perifosina.
2. La degradación de Pma1p promovida por edelfosina causa acidificación citosólica, que se correlaciona con la toxicidad celular del compuesto.
3. La toxicidad por edelfosina depende de la presencia de mecanismos de transporte vesicular a través de los endosomas, incluidos el retrómero y el complejo ESCRT.
4. Análogos fluorescentes de edelfosina se acumulan en el retículo endoplásmico y en la vacuola, mientras que un análogo fluorescente de miltefosina se acumula en la membrana plasmática o, tras una incubación prolongada, en la vacuola.
5. Edelfosina y perifosina provocan un estrés oxidativo mucho más intenso que la miltefosina.
6. La edelfosina requiere genes de la respiración mitocondrial para su toxicidad y actúa a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. Ni la respiración mitocondrial ni las especies reactivas de oxígeno juegan un papel relevante en la toxicidad por miltefosina.
7. Edelfosina, miltefosina y perifosina provocan hiperpolarización y fragmentación mitocondrial.
8. Una fracción del daño oxidativo provocado por edelfosina, crítica para toxicidad del compuesto, es sólo accesible a compuestos liposolubles.

Materiales y métodos

Condiciones generales

Cepas

Se empleó como tipo silvestre (WT) la cepa BY4741 (MAT **a** *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)⁴⁸⁷ excepto en los casos en que se indica lo contrario. Los mutantes de delección de la colección empleada para los *screenings*, isogénicos con BY4741^{297,299}, provienen de Euroscarf (Frankfurt, Alemania). En los experimentos de fraccionamiento celular para la detección de [³H]-edelfosina se empleó un mutante *end4^{ts}pep4Δ* (cepa RH2763: MAT **a** *his4 leu2 ura3 bar1 pep4::URA3 sla2-1 [end4^{ts}]*) y para su control la cepa isogénica (RH1800: MAT **a** *his4 leu2 ura3-52 bar1*), ambas cortesía de Howard Riezman (Universidad de Ginebra, Suiza). La cepa RH2763 también se empleó durante la localización de PTEET. Para la localización de Et-BDP-ET se empleó una cepa Sik1-RFP⁴⁸⁸ (MAT **α** *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SIK1::RFPkanMX4*), cortesía de Peter Arvidson (Universidad de Harvard, EEUU). En el experimento inicial de localización de Pma1 por microscopía se empleó una cepa Pma1RFP¹⁵⁶ (SEY6210-PMA1-dsRFP: MAT **a** *ura3-52 leu2-3,112 his3-100 trp1-901 lys2-801 suc2-9 PMA1::tdimer2(12)::kanMX4*), cortesía de Widmar Tanner (Universidad de Regensburg, Alemania). Para el análisis de la cepa hipomórfica para *PMA1* se empleó como control la cepa YMS084 (MAT **α** *can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFα1pr-LEU2 his3Δ 1leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lyp1Δ0*) en conjunción con la cepa hipomórfica DAmP (YMS084 *YGL008C::3NATB*) en sí misma³⁵⁸. Para la observación de la fragmentación mitocondrial se empleó una cepa GFP_{mit} (MAT **a/α** *can1Δ1::MFA1prHIS3 lyp1Δ leu2Δ0*

his3Δ1 ura3Δ0 met15Δ0 YDL242WΔ::TPIprmtGFP), cortesía de Vanina Zaremborg (Universidad de Calgary, Canadá).

Plásmidos

Para la expresión del marcador del RE *ELO3* unido a una proteína fluorescente se empleó el plásmido centromérico pUG35, que codifica una GFP optimizada para levadura en el extremo 3' del sitio múltiple de clonación⁴⁸⁹. Se insertó la región codificante de *ELO3* entre los sitios de restricción EcoRI y SalI del plásmido. En la observación por microscopía del marcador del RE *SEC63* se empleó el plásmido centromérico YCplac111-*SEC63*-GFP⁴⁹⁰, cortesía de Symeon Siniosoglou (Universidad de Cambridge, Reino Unido). En la observación por microscopía de *PMA1* se empleó un plásmido centromérico derivado de pRS416 con una fusión C-terminal de GFP⁴⁹¹, cortesía de Annick Breton (Instituto de Bioquímica y Genética Celular, Burdeos, Francia). Para la medición del pH se empleó el plásmido pYES-ACT-pHluorin⁴⁵⁵ (cortesía de Gertien Smits, Universidad de Ámsterdam, Países Bajos) o el vector vacío pYES (Invitrogen). El *screening* de sobreexpresión hizo uso de la genoteca 2J351⁴²⁰ basada en el plásmido multicopia YEp351⁴¹⁹, ambos cortesía de Scott E. Erdman (Universidad de Syracuse, EEUU). El estrés de RE se midió empleando el plásmido centromérico reportero UPR-RFP⁴¹⁰, proveniente de AddGene (Cambridge, Reino Unido).

La transformación de los plásmidos se realizó mediante el método de acetato de litio/PEG⁴⁹². Las células a transformar se cultivaron toda la noche, se diluyeron hasta una DO de 0,1 en medio fresco y se incubaron hasta alcanzar una DO de 1. Se recogieron las células por centrifugación (5 mL por transformación), lavándose 2 veces con agua estéril y otras dos con acetato de litio 100 mM. Al pellet celular de cada transformación se le añadió, secuencialmente, 240 μL de PEG 3500 (50% en agua), 18 μL de acetato de litio 2 mM, 50 μL de ADN de cadena sencilla (ADN de testículo de salmón al 2% en agua, hervido y enfriado) y 43 μL de plásmido (1-5 μL de plásmido disuelto en agua). Se homogeneizó la mezcla en un agitador vortex durante dos minutos y se incubó a 30 °C durante 25 minutos. Posteriormente se incubaron las células a 42 °C durante 30 minutos. Las células se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 400 μL de medio selectivo según el plásmido empleado y se sembraron dos placas de agar con el mismo medio selectivo (40 y 200 μL respectivamente). Tras 72 h de incubación a 30 °C se aislaron clones a partir de colonias aisladas.

Medios y condiciones de cultivo

En la mayoría de los experimentos se empleó el medio de cultivo complejo YPAD: 1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 2% glucosa, 40 mg/L adenina. La glucosa se sustituyó en ciertos experimentos por glicerol al 3% (YPAGI). Las cepas transformadas con plásmidos se cultivaron en medio sintético: 0,67% base de nitrógeno para levaduras (sin aminoácidos y con sulfato de amonio), 2% glucosa, 800 mg/L mezcla de suplementos (ForMedium, Reino Unido). Las mezclas

de suplementos específicas para cada plásmido fueron completas (medio SC) o carecían de uracilo, leucina o ambos compuestos (medio SC -*aa*, selectivo para el aminoácido *aa*). Los medios sólidos, en todo caso, llevaban agar al 2%. Las células se cultivaron a 30 °C y con agitación en caso de cultivos líquidos, salvo en los experimentos donde se indique lo contrario.

Compuestos químicos empleados

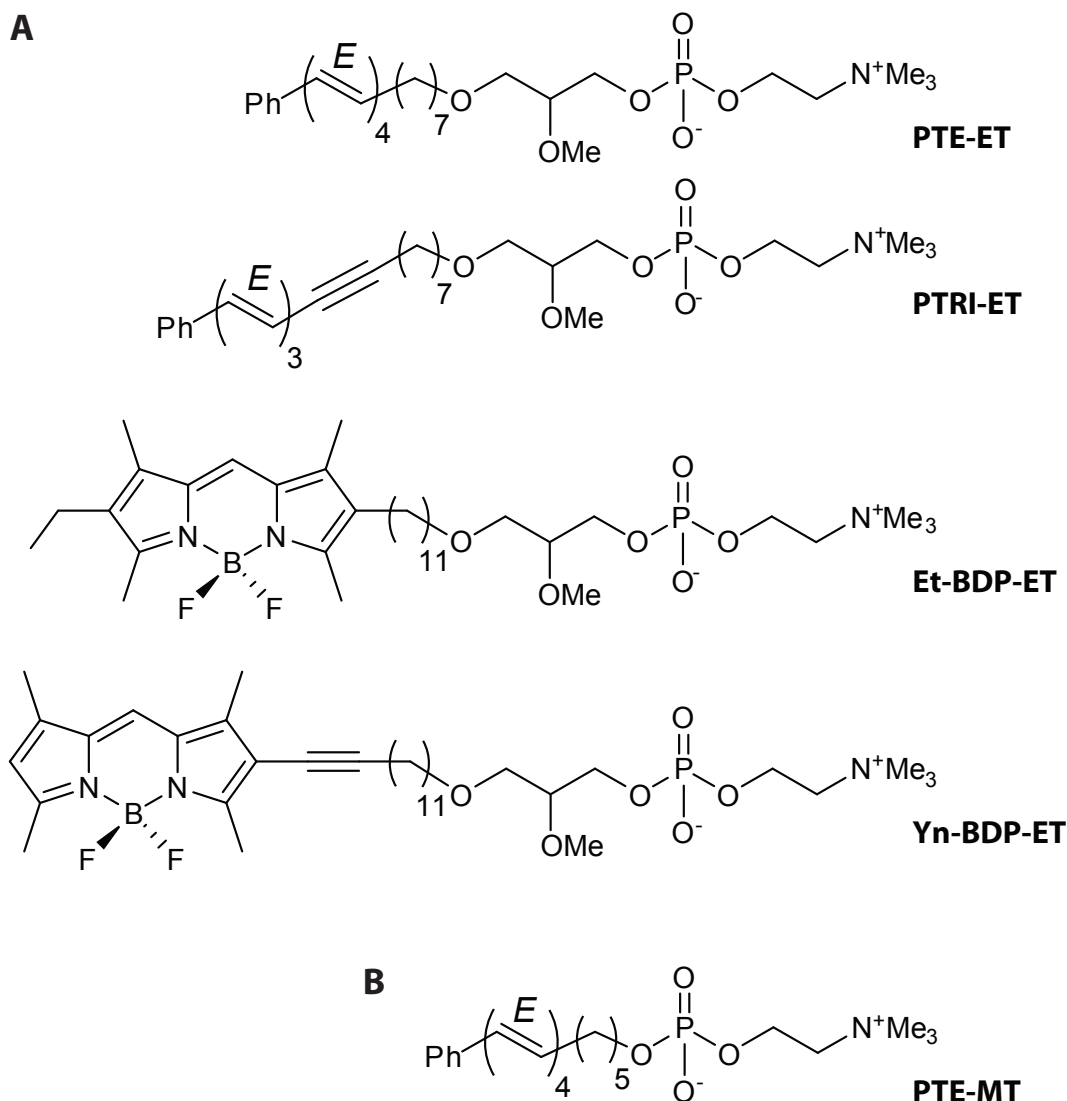


Ilustración 76: análogos fluorescentes de ATLS empleados en el presente trabajo. **A:** análogos de la edelfosina. **PTE-ET:** 1-*O*-(15'-fenilpentadeca-*E*-8',10',12',14'-tetraenil)-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina. **PTRI-ET:** 1-*O*-(15'-fenilpentadeca-*E*-10',12',14'-trien-8'-inil)-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina. **Et-BDP-ET:** 1-*O*-(11'-(6''-etil-1'',3'',5'',7''-tetrametil-4'',4''-difluoro-4''-bora-3a'',4a''-diazas-indacen-2''-il)undecil)-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina. **Yn-BDP-ET:** 1-*O*-(13'-(1'',3'',5'',7''-tetrametil-4'',4''-difluoro-4''-bora-3a'',4a''-diazas-indacen-2''-il)tridec-12'-inil)-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina. **B:** análogo de la miltefosina. **PTE-MT:** 13-feniltrideca-*E*-6,8,10,12-tetraenilfosfocolina.

La Edelfosina fue sintetizada por Inkeysa (Barcelona), la miltefosina provino de Calbiochem (EEUU) y la perifosina de Zentaris (Frankfurt, Alemania). [³H]-edelfosina (42 Ci/mmol) proviene

de Amersham Buchler (Alemania). Los ATLS se disolvieron en agua y se esterilizaron por filtración. Se conservaron a 4 °C en alícuotas que se calentaron periódicamente para evitar la precipitación de los compuestos. Los ATLS se añadieron directamente al medio líquido y, en el caso del medio sólido, una vez este se hubiera atemperado a unos 50 °C, justo antes de verterlo en las placas. Los análogos fluorescentes de edelfosina y miltefosina (ilustración 76) fueron sintetizados por Francisco Amatu-Guerri y A. Ulises Acuña^{76,325,326} (CSIC, Madrid), quienes nos los suministraron amablemente. Los análogos se conservaron congelados en soluciones 1-10 mM en DMSO y protegidos de la luz. Los tratamientos se realizaron con una concentración final de 10 µM de los distintos ATLS, a menos que se indique lo contrario.

Salvo explícitamente indicado, el resto de compuestos fueron obtenidos de Sigma.

Instrumentos

Salvo mención expresa, los espectrofotómetros empleados fueron un U-2001 (Hitachi) o un Smartspec 3000 (BioRad). Las imágenes de microscopía de fluorescencia se tomaron en un microscopio Axioplan 2 (Carl Zeiss), empleando el programa Openlab (PerkinElmer), o en un microscopio DM 6000 B (Leica), empleando el programa Metamorph (Molecular Devices). Ambos microscopios emplean cámaras Hamamatsu (ORCA-Er-C4742-95). Los filtros empleados fueron: en el Carl Zeiss, Rojo (BP 365, FT 395, LP397), Verde (41017 HQ 470/40X Q495LP HQ525/50) y Azul (BP 546, FT 580, LP 590); y en el Leica, GFP (BP 470/40, FT 500, BP 525/50) y N3 (BP 546/12, FT 565, BP 600/40). Los experimentos de citometría se realizaron en un citómetro FacsCalibur (BD Biosciences). La adquisición de datos se realizó con el programa CellQuest (BD Biosciences) y el análisis posterior con el programa FCS Express (DeNovo Software).

Experimentos

Análisis de la toxicidad celular

Curvas de crecimiento

El crecimiento celular se monitorizó a través de la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm (DO). Las células, en fase logarítmica, se diluyeron hasta la DO inicial y se dividieron entre controles y tratamientos, según el experimento. Muestras de los cultivos se tomaron a los tiempos indicados, se diluyeron 10-20 veces y se midieron en un espectrofotómetro. Alternativamente, los

cultivos se realizaron directamente en una placa multipocillo (96 pocillos fondo U, Nirco) y, a los tiempos indicados, se midieron en un espectrofotómetro de placas Ultra Evolution (Tecan).

Réplica en medio sólido de diluciones seriadas

Se cultivaron toda la noche las cepas a monitorizar y, una vez alcanzada la saturación, se recolectaron por centrifugación las células de 1 mL del cultivo, se resuspendieron en agua y se guardaron a 4 °C. Una vez recolectadas todas las cepas, se midió su DO y se ajustaron las suspensiones celulares a una DO final de 1. En una placa multipocillo se organizaron las distintas cepas por filas y las sucesivas diluciones por columnas. Se añadieron 200 µL de la suspensión celular a la primera columna y 180 µL de agua a las tres columnas adyacentes. Se transfirieron con una pipeta, dentro de cada fila (simultáneamente para varias filas, con una pipeta multicanal), 20 µL de la primera columna a la adyacente; se mezcló por pipeteo diez veces y se transfirieron otros 20 µL a la siguiente columna; y se repitió con la última columna, resultando así en diluciones seriadas 1:10 de una columna a la siguiente. Una vez realizadas todas las diluciones seriadas en la placa, fue agitada (Elmi Tech Skyline ST-3 shaker, 10 min, 900 rpm) para homogeneizar las diluciones. Seguidamente, se introdujeron en los pocillos las clavijas de un replicador compatible con una placa de 96 pocillos, esterilizado por llama. Al sacar el replicador, las gotas adheridas a la punta de cada clavija –todas de volumen semejante– se transfirieron a la superficie de agar de la placa de Petri posando con suavidad el replicador. Se repitió la operación transfiriendo la misma placa multipocillos a tantas placas de Petri como fuera necesario, esterilizando el replicador posteriormente.

Ensayo clonogénico

Se diluyó un cultivo en fase logarítmica hasta una DO de 0,1 y se dividió en los distintos tratamientos. A los tiempos indicados una alícuota de cada tratamiento se diluyó 1000 veces en agua y 100 µL de esta dilución se sembraron en una placa de Petri con el mismo medio pero carente del tratamiento. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada punto temporal de cada tratamiento. Las placas se incubaron 48-72 h y se contaron las colonias, identificando cada célula viable con una unidad formadora de colonias (UFC). Cuando los tratamientos mostraban crecimiento se aumentó el factor de dilución de la alícuota a 2000-8000 para reducir el número de UFC en la placa y permitir distinguir las colonias resultantes.

Integridad de la membrana plasmática

A partir de un cultivo mantenido en fase logarítmica se realizó, a los tiempos indicados, una dilución a DO de 0,4, que se dividió entre los distintos tratamientos. Todos los tratamientos fueron procesados al mismo tiempo. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en

200 μ L de PBS (KCl 0,02%, NaCl 0,8%, KH_2PO_4 0,02%, Na_2HPO_4 0,11%) con 6 μ g/mL de yoduro de propidio y se tiñeron 15 min a 30 °C protegidas de la luz. Seguidamente se añadió 800 μ L de PBS a cada muestra y se midió la fluorescencia celular en un citómetro FacsCalibur (BD Biosciences).

Ciclo celular

Los tratamientos se realizaron a partir de un cultivo en fase logarítmica, diluido hasta una DO de 1. 1 mL de cada tratamiento se sonicó, las células fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas en 1 mL de 70% etanol. Se homogeneizaron las muestras en un agitador vortex y se fijaron durante 4 horas en una noria a 4 °C. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 500 μ L Tris-Cl 10 mM pH 7,5 y se les añadió 5 μ L de RNAsa A (20 mg/mL). Se incubaron las células 1 h a 37 °C y se añadieron posteriormente 2 μ L de proteinasa K (20 mg/mL, Invitrogen), incubándose otra hora a 37 °C. Las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron con PBS, se resuspendieron en PBS con 6 μ g/mL de yoduro de propidio y se tiñeron 15 min a 30 °C protegidas de la luz. Seguidamente se añadió 800 μ L de PBS a cada muestra y se midió la fluorescencia celular por citometría.

Screenings genómicos

Screenings empleando la colección de mutantes de delección

Para los *screenings* de resistencia a edelfosina y miltefosina se cultivaron las cepas en medio YPAD suplementado con una concentración final de 150 μ g/mL de G418. Las células se transfirieron con un replicador de clavijas desde las placas multipocillo en las que se hallan congeladas a placas con 150 μ L de medio, y se cultivaron 3 días hasta saturación. Para el cribado de las cepas se transfirieron estos cultivos con el replicador a nuevas placas con medio SC \pm ATL, y se monitorizó su DO diariamente durante 7 días usando un espectrofotómetro de placas (modelo 550, Bio-Rad). El cociente entre el crecimiento en medio con y sin ATL indicó la sensibilidad al compuesto de cada cepa examinada. Las células se consideraron resistentes cuando superaron las condiciones indicadas como punto de corte para el *screening* de cada compuesto –según se indica en *Resultados*– en cinco experimentos independientes. El *screening* de sensibilidad a edelfosina se realizó en placas OmniTray (Nalgene Nunc) con medio SC sólido, a las que se transfirieron 384 cepas por placa con un manipulador robótico (Virtek Colony Arrayer, Bio-Rad). Las placas se incubaron durante 2 días y se fotografiaron con un sistema de adquisición de imágenes Versa Doc (Bio-Rad). La relación entre el crecimiento en las placas con y sin edelfosina indicó la sensibilidad al compuesto de cada cepa. Las células se consideraron sensibles cuando su crecimiento fue comparativamente menor al WT BY4741 –según se indica en *Resultados*– en al menos tres experimentos independientes.

Análisis bioinformático

La función de los genes identificados en los *screenings* se examinó en base a la clasificación funcional de Gene Ontology³²² y MIPS³²³, las anotaciones de cada gen presentes en *Saccharomyces Genome Database* y mediante consulta bibliográfica. El análisis bioinformático de las listas de genes se realizó con la interfaz web Funspec³²¹. Para las categorías funcionales con un enriquecimiento significativo según Funspec se calculó, a partir del número de genes asociado a la misma, el factor de enriquecimiento (FE) como el cociente entre la frecuencia relativa de dicha categoría en la lista de genes y la frecuencia relativa de dicha categoría en el genoma del organismo.

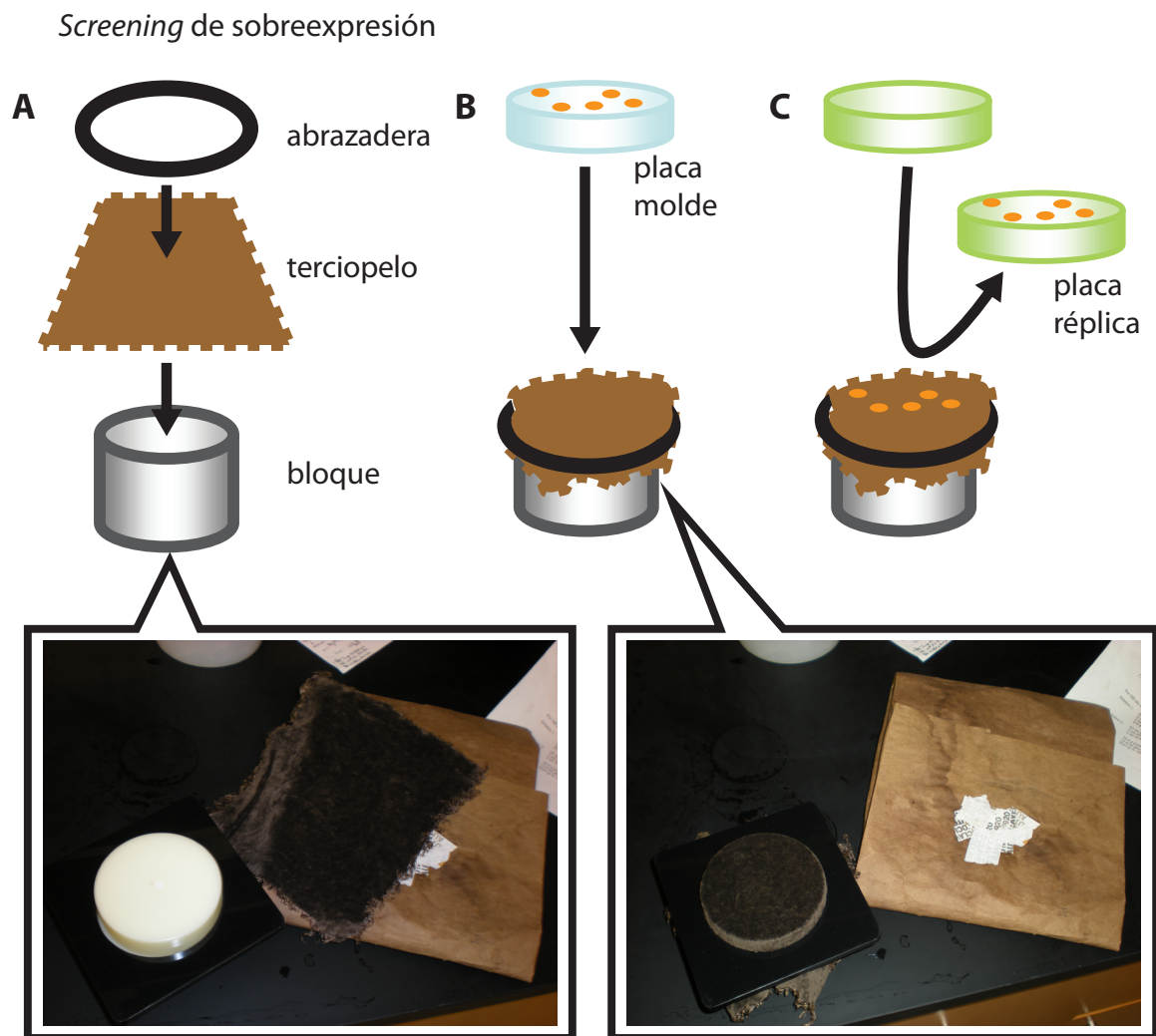


Ilustración 77: esquema del procedimiento de réplica en placa. **A:** montaje del tampón de réplica (recuadro: instrumentos reales). **B:** tampón de réplica (recuadro: tampón real) al que se transfieren los parches (puntos naranjas) de la placa molde (azul). **C:** impresión en la placa réplica (verde) de los parches desde el terciopelo.

Células BY4741 fueron transformadas por el procedimiento del acetato de litio con la genoteca 2J351, empleando 2 μ L (completados con agua) por cada 10 transformaciones, y los transformantes se seleccionaron en placas de Petri con medio SC -Leu. La selección de clones resistentes a partir de las

dos primeras series de transformantes (tabla 4, series E y A) se realizó por réplica de parches. Colonias individuales fueron transferidas a placas de SC –Leu (placa molde, ilustración 78 A) y extendidas con palillos estériles formando parches. La transferencia de estos parches se realizó mediante un tampón de réplica, sobre el que se montó un terciopelo estéril (ilustración 77 A). La placa molde se presionó contra el terciopelo, transfiriendo al mismo parte de las células de los parches (ilustración 77 B). Seguidamente se presionó sobre el terciopelo una placa réplica de medio con ATL, transfiriéndose desde el terciopelo a la placa las células (ilustración 77 C; ilustración 78 B). Entre los parches se incluyó además un control resistente (YEp351/*lem3Δ*) y un control sensible (YEp351/BY4741), empleados como baremos de la sensibilidad al ATL de los distintos clones. Los clones aparentemente resistentes (candidatos primarios) se concentraron y sembraron en nuevas placas moldes y se les sometió a una nueva comprobación, confirmándose varios clones como resistentes (tabla 4, candidatos; ilustración 78 C).

Mediante la técnica de la réplica por parches fue sin embargo difícil transferir los parches de manera homogénea, especialmente aquellos situados en los bordes de las placas. Esto impedía distinguir claramente si su crecimiento en las placas réplica era mayor o no que el control sensible, y en caso de serlo, si esto era debido a la resistencia de ese clon al ATL o a que la cantidad de células presente en el parche fuera excesiva. Compárese, por ejemplo, los clones marcados “§” en la ilustración 78 C, que posteriormente resultaron no resistentes. Ante esta dificultad, con una segunda serie de transformantes (tabla 4, series B y H) se transfirió en primer lugar a 150 µL de medio líquido en placas de 96 pocillos (placa molde). Se emplearon sólo las columnas impares de cada placa, dejando los otros 48 pocillos vacíos, y se cultivaron los clones 48 horas a 30 °C hasta saturarse los cultivos. En otra placa se rellenaron los 96 pocillos con 150 µL de agua estéril (placa de dilución). Con un replicador de clavijas se transfirieron gotas de aproximadamente el mismo volumen desde los pocillos de la placa molde a los correspondientes de la placa de dilución. En la placa de dilución se crean así, en las columnas impares, una primera dilución celular, mientras que en las pares sólo queda agua. Seguidamente se esterilizó por flameado el replicador. Se transfirieron, dentro de la placa de dilución, gotas desde cada columna impar a la columna par adyacente, creándose así en las columnas pares una segunda dilución mayor. Finalmente se homogeneizó la placa de dilución en un agitador de placas y se transfirió el contenido de la misma a las placas réplica con medio sólido. Cada dos pocillos de columnas adyacentes representan el mismo clon, en dos diluciones, y su crecimiento puede compararse con los controles, también presentes en la placa (ilustración 79 A). Mediante esta técnica fue posible seleccionar clones tanto resistentes como hipersensibles (series B y H respectivamente). Esta técnica permitió mejores resultados e hizo innecesaria la comprobación adicional, siendo los clones seleccionados candidatos directamente (tabla 4).

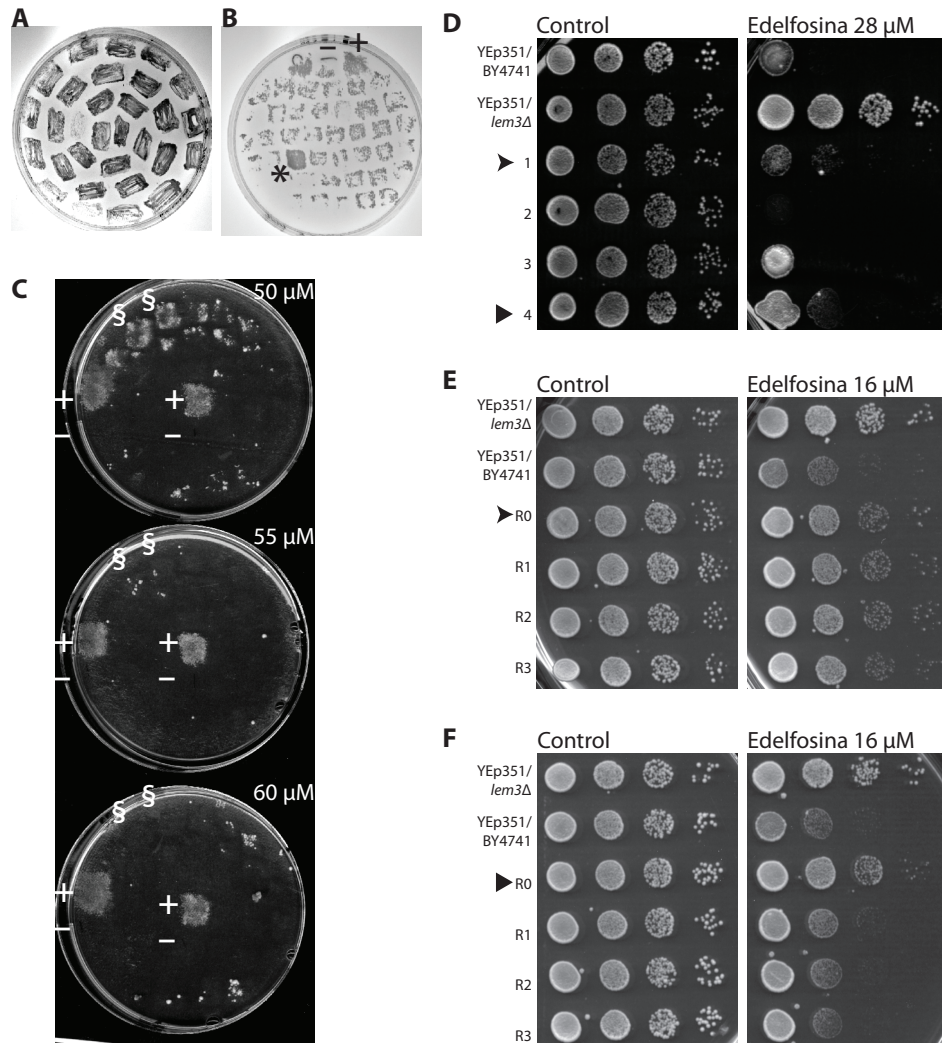


Ilustración 78: cribado de candidatos por réplica en placa. **A:** placa molde con parches de clones individuales. **B:** placa réplica (edelfosina 30 μM). -: control negativo de resistencia (YEp351/BY4741). +: control positivo de resistencia (YEp351/*lem3* Δ). *: clon resistente (candidato primario). **C:** réplicas de los mismos clones en placas con edelfosina 50, 55 y 60 μM . §: clones situados en el borde de la placa, aparentemente tan resistentes a 50 μM de edelfosina como el control positivo, pero no realmente resistentes. **D:** cribado de candidatos. Cuatro candidatos (1-4) se comprueban por dilución seriada, seleccionándose dos de ellos (\blacktriangleright , \blacktriangleright). **E, F:** confirmación de candidatos (del panel D) por dilución seriada. Los plásmidos aislados de cada candidato (R0) se retransformaron y se comprobó la resistencia de 3 clones independientes (R1-R3). La resistencia de algunos candidatos se reprodujo (\blacktriangleright , supresor A1), confirmándose que está causada por el plásmido. En otros casos la resistencia del candidato no se reprodujo en los correspondientes retransformantes (\blacktriangleright , candidato A4), indicando que la resistencia no está ligada a la presencia del plásmido.

Los candidatos se sometieron a dos rondas de cribado. En primer lugar se comprobó nuevamente la resistencia de cada candidato por réplica en medio sólido de diluciones seriadas (ilustración 78 D; ilustración 79 B y D). Los candidatos que confirmaron su fenotipo de resistencia o sensibilidad fueron sometidos a un segundo cribado para confirmar que tal fenotipo estaba asociado al plásmido que portaban y no a otra mutación. Para aislar los plásmidos se empleó un método rápido de extracción de ADN⁴⁹³. Los clones fueron cultivados en 5 mL de medio líquido durante la noche, las células fueron recolectadas por centrifugación y rotas por agitación en un vortex en

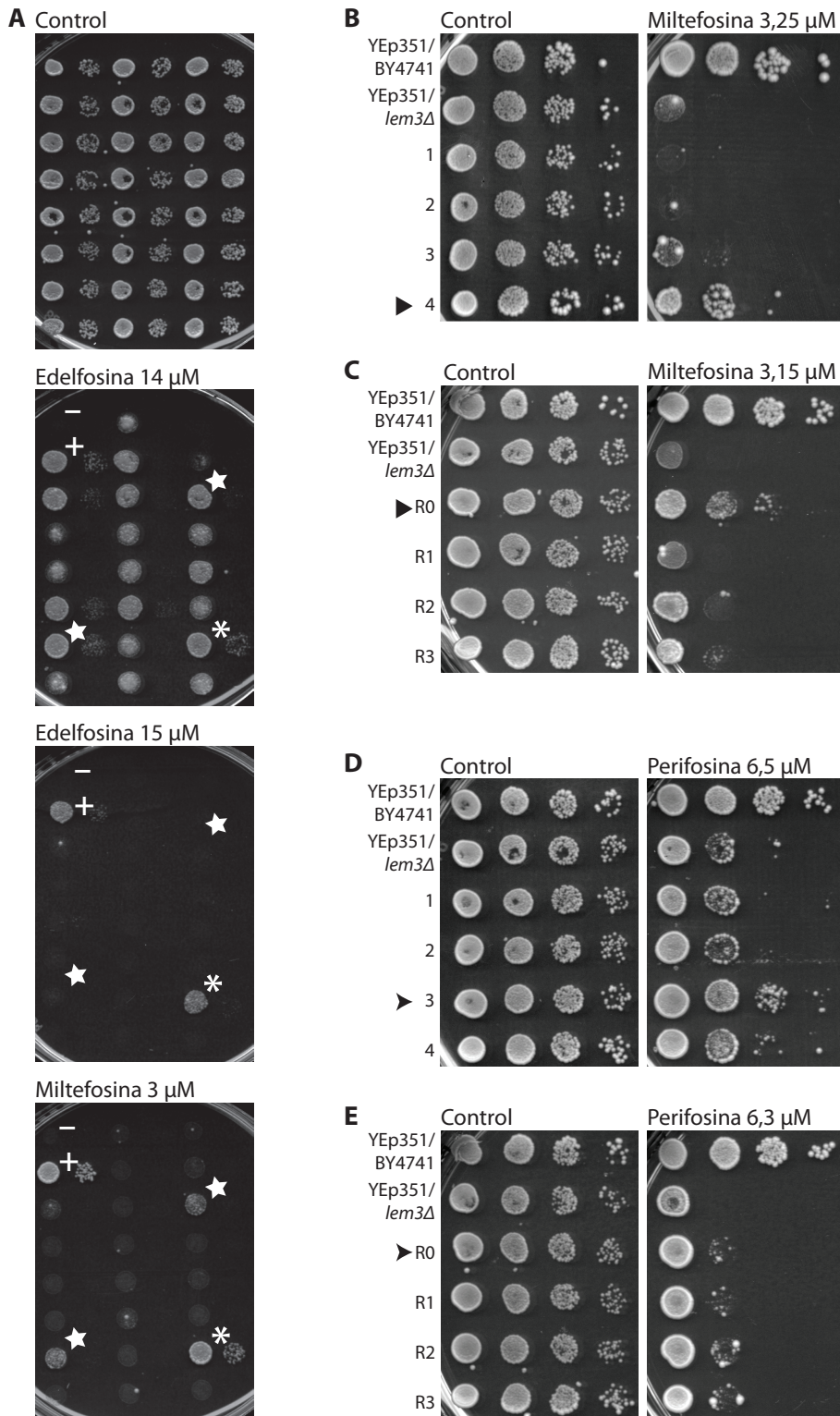


Ilustración 79: cribado de candidatos por réplica desde medio líquido. **A:** cribado de los clones iniciales. - : control negativo de resistencia (YEp351/BY4741). + : control positivo de resistencia (YEp351/*lem3* Δ). *, « : cepas con distinta resistencia a ATLS. **B, D:** cribado de candidatos. En cada caso, cuatro candidatos (1-4) se comprueban por dilución seriada, seleccionándose uno de ellos (▶, ▶). **C, E:** confirmación de candidatos (de los paneles B, D) por dilución seriada. Los plásmidos aislados de cada candidato (R0) se retransformaron en levadura y se comprobó la resistencia de 3 clones independientes (R1-R3). La resistencia de algunos candidatos se reprodujo (▶, supresor B12), confirmando que está causada por el plásmido. En otros casos la resistencia del candidato no se reprodujo en los correspondientes retransformantes (▶, candidato B8), indicando que la resistencia no está ligada a la presencia del plásmido.

presencia de esferas de cristal, seguida de incubación de 3 minutos en un baño hirviendo. El ADN se precipitó con etanol, se transformó por choque térmico en *Escherichia coli* DH5 α competentes y se seleccionaron los transformantes en placas de Petri de medio LB (1% triptona, 1% NaCl, 0,5% extracto de levadura) con 100 μ g/mL de ampicilina. Se inocularon 5 mL de medio LB líquido con una colonia de *E. coli* para cada candidato, de los que se realizó una miniprep por el método de la lisis alcalina. El plásmido aislado se transformó de nuevo en levadura por el método del acetato de litio/PEG. Estas levaduras retransformantes deberían de tener el mismo fenotipo de resistencia o sensibilidad al ATL que el clon original candidato, del que se extrajo el plásmido. Se compararon por tanto tres colonias retransformantes (R1-R3) con el clon original (R0) por réplica en medio sólido de diluciones seriadas. Algunos de los plásmidos no confieren a los retransformantes el fenotipo del clon original (ilustración 78 D, F ►; ilustración 79 B, C ►). Otros plásmidos sí transmitieron el fenotipo del clon original (ilustración 78 D, E ►; ilustración 79 D, E ►), confirmándose en ese caso los plásmidos candidatos como supresores (tabla 4). Los supresores confirmados se secuenciaron empleando los oligonucleótidos universales del fago M13, que flanquean el sitio múltiple de clonación del plásmido YEp351. La región secuenciada se comparó con la secuencia del ADN genómico de *S. cerevisiae* para identificar qué inserto se hallaba clonado en cada plásmido y los genes presentes en el mismo (tabla 5).

Microscopía de fluorescencia

Las muestras de microscopía de fluorescencia se prepararon en fresco. Las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en el mínimo volumen posible del mismo medio en el que se encontraran. La suspensión se homogeneizó por pipeteo y se dispuso sobre un portaobjetos. Tras colocar el cubreobjetos se rodó un tubo de plástico sobre el mismo para expulsar las burbujas de aire y el exceso de líquido, y se observó inmediatamente al microscopio.

Observación de proteínas y marcadores fluorescentes

Para la observación de GFP se emplearon los filtros Verde y GFP de los microscopios de fluorescencia. Para la observación de RFP se emplearon los filtros Rojo y N3. En la observación de análogos fluorescentes de ATLs, la imagen del análogo se tomó siempre en primer lugar y antes de observar otros marcadores. PTE-ET, PTRI-ET y PTE-MT se añadieron a las células una concentración de 15 μ M, y debido a su poca fotoestabilidad las imágenes se tomaron en cuanto se abrió el obturador de fluorescencia, no siendo posible enfocarlas. El filtro empleado fue el Azul. EtBDP-ET e Yn-BDP-ET, debido a su fluorescencia más intensa y duradera, se añadieron a una concentración final de 5 μ M, y se observaron con el filtro Verde. El FM 4-64 se empleó a una concentración final de 10 μ M, con una carga de al menos 30 minutos, seguida de al menos 45 minutos en ausencia del mismo si se pretendía lograr una tinción únicamente vacuolar. Se empleó el filtro Rojo o N3. La sal soluble *Lucifer*

yellow (LY) se usó a una concentración final de 2,5 mg/mL, incubando las células simultáneamente con FM 4-64 y LY durante 1 h a 4 ó 30 °C. Seguidamente se lavaron las células y se resuspendieron en medio fresco a la misma temperatura, incubando las células 15 minutos a 30 °C ó 1 h a 4 °C. En este último periodo se añadió el análogo PTE-ET. El filtro empleado para el LY fue el GFP. El Mitotracker Red CMXRos se añadió a una concentración final de 100 nM y se incubaron las células 30 minutos a 30 °C. Se observó con los filtros Rojo y N3. El DiOC₆(3) se añadió a una concentración final de 50 nM y se incubó 30 minutos antes de ser observado con el filtro GFP. Para la tinción con DAPI las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 4% formaldehído/PBS pH 7,1. Tras 1 hora de incubación a 4 °C en una noria para fijar y permeabilizar las células se lavaron y resuspendieron en PBS, se añadió el DAPI a una concentración final de 25 µg/mL y se tiñeron 10 min a temperatura ambiente antes de observarse con el filtro Azul.

Tinción con quinacrina

Cultivos celulares en YPAD se inocularon en YPAD-H (YPAD tamponado con 100 mM HEPES pH 7,6, filtrado y protegido de la luz) y se cultivaron 2 horas a 30 °C. Las células se trataron con ATLS el tiempo indicado, se centrifugaron y resuspendieron en YPAD-H fresco. Se añadió quinacrina a una concentración final de 400 µM (a partir de una solución de 4 mM en YPAD-H) y se incubaron 10 minutos a 30 °C y 5 minutos a 4 °C. Se recolectaron las células por centrifugación, lavándolas dos veces con HG (10 mM Hepes pH 7,6, 2% glucosa) y se observaron inmediatamente con el filtro GFP del microscopio de fluorescencia.

Fraccionamiento celular y *western blot*

Para los fraccionamientos celulares en los que se midió Pma1 y [³H]-edelfosina (ilustración 41 B y C) se recolectaron por centrifugación 50 unidades de DO de un cultivo en fase logarítmica tratado los tiempos indicados con edelfosina y se lavaron 3 veces con PBS. En el estudio de la distribución de [³H]-edelfosina se incluyó esta molécula marcada en el tratamiento (5,3 x 10⁵ cuentas por minuto/mol). Las células se lavaron con 1 M sorbitol, al que se había añadido 10 mM NaN₃ y 10 mM NaF, y se congelaron los pellets. Las células se resuspendieron en 350 µl de tampón TNE (50 mM Tris-Cl, pH 7,4, 150 mM NaCl y 5 mM EDTA, al que se añade 20 µg/ml leupeptina, 20 µg/ml aprotinina, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y mezcla de inhibidores de proteasas de Roche) y se les añadió un volumen equivalente de esferas de cristal. Las células se rompieron en un Fastprep (4 pulsos de 15 s, velocidad 5,5), se precipitaron las células enteras por centrifugación y se transfirió el sobrenadante con el extracto celular total a un tubo de ultracentrífuga. Se precipitaron las membranas totales por centrifugación de los extractos 3 h a 4 °C en un rotor SW40 (Beckman) a 218000 g. El pellet se resuspendió en frío en tampón MBS-sacarosa (25 mM Mes, pH 6,5, 150 mM NaCl, sacarosa 60%) al que se añadió Triton X-100 a una concentración final del 1%. Las membranas se incubaron 1 h a 4 °C y

se homogeneizaron completamente mediante varios pasos por un homogeneizador de tejidos Potter-Elvehjem. 350 μ L del extracto se mezclaron con 2,27 mL de MBS-sacarosa al 60% y se transfirieron a un tubo de ultracentrífuga, y sobre ellos se construyó un gradiente zonal de sacarosa/MBS (3,54 mL al 50%, 1,78 mL al 45%, 1,78 mL al 40%, 0,89 mL al 30% y 0,89 mL al 5%). Los gradientes se centrifugaron en un rotor SW40 a 256000 g durante 18 h a 4 °C y fracciones de 1 mL se recolectaron desde la parte superior del gradiente. Alícuotas de cada fracción se emplearon posteriormente para electroforesis en gel discontinuo de acrilamida y *western blot*, o se mezclaron con líquido de centelleo para medir la incorporación de [³H]-edelfosina. El procedimiento de los fraccionamientos mostrados en la ilustración 41 A fue semejante, pero se empleó un gradiente de Optiprep (Nycomed). 300 μ g del extracto celular total se incubaron 30 min a 4 °C en 500 μ L de tampón TNE con una concentración final de 1% de Triton X-100. Se le añadió 1 mL de 60% Optiprep y se transfirió a un tubo de ultracentrífuga, encima se incorporaron 2,4 mL de 30% Optiprep/TNE con una concentración final de 0,1% de Triton X-100 y finalmente 400 μ L de TNE-0,1% Triton X-100. Los gradientes se centrifugaron en un rotor TLS55 (Beckman) a 166000 g durante 2 h a 4 °C y se recogieron las fracciones.

Las inmunoprecipitaciones se realizaron a partir de cultivos de 200 μ L en fase logarítmica, a los que se añadió 19 μ M edelfosina en los tiempos indicados. Las células se recolectaron por centrifugación y los pelets se congelaron hasta su procesamiento. Se lisaron las células en 400 μ L de tampón RIPA (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio, suplementado con 10 μ g/mL aprotinina, 10 μ g/mL leupeptina, 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 250 nM bortezomib, 10 mM yodoacetamida) y un volumen semejante de esferas de cristal, mediante tres pulsos de 15 s en una Fastprep. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos, se precipitaron por centrifugación las células enteras y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante por un ensayo Bradford. Se inmunoprecipitó Pma1p (ilustración 42 A) a partir de 160 μ g de proteína total mediante incubación toda la noche a 4 °C en una noria con un anticuerpo de conejo policlonal anti-Pma1p y 25 μ L de bolas CL-4B recubiertas con proteína A en 2 mL de PBS. Se inmunoprecipitaron las proteínas ubiquitinadas (ilustración 42 C) a partir de 500 μ g de proteína en presencia de 20 μ L de bolas unidas covalentemente a un dominio de interacción con ubiquitina (ubiquitinated protein enrichment kit, Calbiochem). En ambos casos las bolas se lavaron 3 veces con PBS, se resuspendieron en 30 μ L de tampón de carga y se calentaron a 50 °C 10 min para evitar la agregación de Pma1p justo antes de su electroforesis en geles discontinuos de poli(acrilamida).

Se emplearon en los *western blots* anticuerpos frente a Pma1 y Gas1 (cortesía de Ramón Serrano, Universidad Politécnica de Valencia, y Howard Riezman, Universidad de Ginebra, Suiza) y anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano, para detección por quimioluminiscencia, o al fluoróforo Alexa680 (Invitrogen) para detección en un escáner Odyssey (LiCor).

Incorporación de [³H]-edelfosina

Para medir la incorporación de [³H]-edelfosina, las células se cultivaron hasta fase exponencial tardía en medio YPAD en una placa de 96 pocillos, determinándose la DO de cada pocillo. Las células fueron tratadas con 60 μ M edelfosina –a la que se añadió, en cada pocillo, $2 \cdot 10^4$ cuentas por minuto de [³H]-edelfosina– e incubadas durante 1 hora. La [³H]-edelfosina no incorporada se retiró mediante 5 lavados consecutivos de las células con 1 mL de 3% seroalbúmina bovina/PBS. Las células restantes se resuspendieron en 500 μ L PBS, se mezclaron con 1,5 mL de líquido de centelleo y se midió la radiactividad restante en un contador de centelleo Beckman.

Función mitocondrial

Citometría de flujo – ROS y Ψ_m

A partir de un cultivo en fase exponencial se diluyeron 0,2 unidades de DO en 2 mL de medio fresco en un tubo de citómetro y se añadió el ATL correspondiente, incubándose a 30 °C las células. 30 minutos antes de finalizar el tiempo de tratamiento se añadió a cada tubo el compuesto fluorescente (DiOC₆(3) a una concentración final de 50 nM para la medición del Ψ_m , dihidroetidio a una concentración final de 2,5 μ M para la medición de ROS) y se protegieron de la luz los tubos el tiempo restante de incubación. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 1,5 mL de PBS y se procesaron en el citómetro inmediatamente.

Tratamiento con antioxidantes e inhibidores

Los antioxidantes se añadieron a las células una hora antes del comienzo del tratamiento con los ATLs. La eficacia de los inhibidores mitocondriales se comprobó a las concentraciones indicadas por la bibliografía y se ajustó posteriormente a concentraciones eficaces que por sí solas no resultaran tóxicas para la célula. Todos los inhibidores se añadieron una hora antes del tratamiento con ATLs excepto la oligomicina. Este último fármaco se añadió 4 horas antes del tratamiento con ATLs, momento en el que las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio fresco con oligomicina a la misma concentración.

Bibliografía

1. Munder, P. G., Ferber, E., Modolell, M. & Fischer, H. The influence of various adjuvants on the metabolism of phospholipids in macrophages. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **36**, 117–128 (1969).
2. Tarnowski, G. S. *et al.* Effect of Lysolecithin and Analogs on Mouse Ascites Tumors. *Cancer Res* **38**, 339–344 (1978).
3. Andreesen, R. *et al.* Selective Destruction of Human Leukemic Cells by Alkyl-lysophospholipids. *Cancer Res* **38**, 3894–3899 (1978).
4. Andreesen, R., Modolell, M. & Munder, P. Selective sensitivity of chronic myelogenous leukemia cell populations to alkyl-lysophospholipids. *Blood* **54**, 519–523 (1979).
5. Modolell, M., Andreesen, R., Pahlke, W., Brugger, U. & Munder, P. G. Disturbance of Phospholipid Metabolism during the Selective Destruction of Tumor Cells Induced by Alkyl-lysophospholipids. *Cancer Res* **39**, 4681–4686 (1979).
6. Runge, M. H., Andreesen, R., Pfleiderer, A. & Munder, P. G. Destruction of Human Solid Tumors by Alkyl Lysophospholipids. *J Natl Cancer Inst* **64**, 1301–1306 (1980).
7. We, B. *et al.* Inhibition by alkyl-lysophospholipids of tritiated thymidine uptake in cells of human malignant urologic tumors. *J Natl Cancer Inst* **66**, 813–817 (1981).
8. Berdel, W. E. *et al.* Alkyl-lysophospholipids inhibit the growth of hypernephroid carcinomas in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* **101**, 325–330 (1981).
9. Eibl, H. & Unger, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer Treat Rev* **17**, 233–242 (1990).
10. Hilgard, P. *et al.* D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur J Cancer* **33**, 442–446 (1997).
11. Herrmann, H. O. & Gercken, G. Metabolism of 1-O-[1'-14C] octadecyl-sn-glycerol in *Leishmania donovani* promastigotes. Ether lipid synthesis and degradation of the ether bond. *Mol Biochem Parasitol* **5**, 65–76 (1982).
12. Achterberg, V. & Gercken, G. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **23**, 117–122 (1987).
13. Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W. & Chan, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* **36**, 2633–2636 (1987).
14. Berdel, W. E., Fink, U. & Rastetter, J. Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH₃. *Lipids* **22**, 967–969 (1987).
15. Drings, P. *et al.* Final Evaluation of a Phase II Study on the Effect of Edelfosine (an Ether Lipid) in Advanced Non-Small-Cell Bronchogenic Carcinoma. *Onkologie* **15**, 375–382 (1992).
16. Berdel, W. E. *et al.* Cytotoxicity of Thioether-Lysophospholipids in Leukemias and Tumors of Human Origin. *Cancer Res* **43**, 5538–5543 (1983).
17. Mollinedo, F. *et al.* Selective Induction of Apoptosis in Cancer Cells by the Ether Lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): Molecular Structure Requirements, Cellular Uptake, and Protection by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* **57**, 1320–1328 (1997).
18. Snyder, F. Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J* **305**, 689–705 (1995).
19. Hoffman, D. R., Hoffman, L. H. & Snyder, F. Cytotoxicity and Metabolism of Alkyl Phospholipid Analogues in Neoplastic Cells. *Cancer Res* **46**, 5803–5809 (1986).
20. Salari, H., Howard, S. & Bittman, R. Synthesis and antineoplastic properties of an ether glycerophosphocholine, an analog of ET-18-OCH₃-GPC. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 603–608 (1992).
21. Vallari, D. S., Smith, Z. L. & Snyder, F. HL-60 cells become resistant towards antitumor ether-linked phospholipids following differentiation into a granulocytic form. *Biochem Biophys Res Commun* **156**, 1–8 (1988).
22. Busto, J. V., Sot, J., Goñi, F. M., Mollinedo, F. & Alonso, A. Surface-active properties of the antitumour ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (edelfosine). *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1855–1860 (2007).
23. Torrecillas, A. *et al.* Effects of the anti-neoplastic agent ET-18-OCH₃ and some analogs on the biophysical properties of model membranes. *Int J Pharm* **318**, 28–40 (2006).
24. Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M. & Loiseau, P. M. Alteration of Fatty Acid and Sterol Metabolism in Miltefosine-Resistant *Leishmania donovani* Promastigotes and Consequences for Drug-Membrane Interactions. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2677–2686 (2005).
25. Hannun, Y. A. Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood* **89**, 1845–1853 (1997).
26. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
27. Diomedea, L. *et al.* Induction of apoptosis in human leukemic cells by the ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-RAC-glycero-3-phosphocholine. A possible basis for its selective action. *Int J Cancer* **53**, 124–130 (1993).

28. Mollinedo, F., Martinez-Dalmau, R. & Modolell, M. Early and Selective Induction of Apoptosis in Human Leukemic Cells by the Alkyl-Lysophospholipid ET-18-OCH₃. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 603–609 (1993).
29. Verdonck, L. F. & van Heugten, H. G. Ether lipids are effective cytotoxic drugs against multidrug-resistant acute leukemia cells and can act by the induction of apoptosis. *Leuk Res* **21**, 37–43 (1997).
30. Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J. & Verheij, M. Alkyl-Lysophospholipids Activate the SAPK/JNK Pathway and Enhance Radiation-induced Apoptosis. *Cancer Res* **59**, 2457–2463 (1999).
31. Gibellini, F. & Smith, T. K. The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **62**, 414–428 (2010).
32. Vogler, W. R., Whigham, E., Bennett, W. D. & Olson, A. C. Effect of alkyl-lysophospholipids on phosphatidylcholine biosynthesis in leukemic cell lines. *Exp Hematol* **13**, 629–633 (1985).
33. Boggs, K. P., Rock, C. O. & Jackowski, S. Lysophosphatidylcholine and 1-O-Octadecyl-2-O-Methyl-rac- Glycero-3-Phosphocholine Inhibit the CDP-Choline Pathway of Phosphatidylcholine Synthesis at the CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase Step. *J Biol Chem* **270**, 7757–7764 (1995).
34. Geilen, C. C., Wieder, T. & Reutter, W. Hexadecylphosphocholine inhibits translocation of CTP:choline-phosphate cytidylyltransferase in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **267**, 6719–6724 (1992).
35. Geilen, C. C. *et al.* Phospholipid analogues: side chain- and polar head group-dependent effects on phosphatidylcholine biosynthesis. *J Lipid Res* **35**, 625–632 (1994).
36. Boggs, K., Rock, C. O. & Jackowski, S. The antiproliferative effect of hexadecylphosphocholine toward HL60 cells is prevented by exogenous lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* **1389**, 1–12 (1998).
37. Baburina, I. & Jackowski, S. Apoptosis Triggered by 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine Is Prevented by Increased Expression of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase. *J Biol Chem* **273**, 2169–2173 (1998).
38. Zhou, X. & Arthur, G. Effect of 1-O -Octadecyl-2-O -Methyl-Glycerophosphocholine on Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Synthesis in MCF-7 and A549 Cells and its Relationship to Inhibition of Cell Proliferation. *Eur J Biochem* **232**, 881–888 (1995).
39. Van der Sanden, M. H. ., Houweling, M., Duijsings, D., Vaandrager, A. B. & van Golde, L. M. . Inhibition of phosphatidylcholine synthesis is not the primary pathway in hexadecylphosphocholine-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1636**, 99–107 (2004).
40. Rutkowski, D. T. & Kaufman, R. J. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* **14**, 20–28 (2004).
41. Gorman, A. M., Healy, S. J. M., Jäger, R. & Samali, A. Stress management at the ER: Regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* **134**, 306–316 (2012).
42. Van der Sanden, M. H. M., Houweling, M., van Golde, L. M. G. & Vaandrager, A. B. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem J* **369**, 643 (2003).
43. Nieto-Miguel, T. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress in the Proapoptotic Action of Edelfosine in Solid Tumor Cells. *Cancer Res* **67**, 10368–10378 (2007).
44. Nieto-Miguel, T., Gajate, C. & Mollinedo, F. Differential Targets and Subcellular Localization of Antitumor Alkyl-lysophospholipid in Leukemic Versus Solid Tumor Cells. *J Biol Chem* **281**, 14833–14840 (2006).
45. Gajate, C. *et al.* Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* **31**, 2627–2639 (2012).
46. Gajate, C., Santos-Beneit, A., Modolell, M. & Mollinedo, F. Involvement of c-Jun NH₂-Terminal Kinase Activation and c-Jun in the Induction of Apoptosis by the Ether Phospholipid 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *Mol Pharmacol* **53**, 602–612 (1998).
47. Griner, E. M. & Kazanietz, M. G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 281–294 (2007).
48. Teicher, B. A. Protein Kinase C as a Therapeutic Target. *Clin Cancer Res* **12**, 5336–5345 (2006).
49. Helfman, D. M. *et al.* Phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent Protein Phosphorylation System in Various Types of Leukemic Cells from Human Patients and in Human Leukemic Cell Lines HL60 and K562, and Its Inhibition by Alkyl-lysophospholipid. *Cancer Res* **43**, 2955–2961 (1983).
50. Heesbeen, E. C. *et al.* Alkyllysophospholipid ET-18-OCH₃ acts as an activator of protein kinase C in HL-60 cells. *FEBS Lett* **290**, 231–234 (1991).
51. Heesbeen, E. C., Verdonck, L. F., Staal, G. E. J. & Rijksen, G. Protein kinase C is not involved in the cytotoxic action of 1-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycerol-3-phosphocholine in HL-60 and K562 cells. *Biochem Pharmacol* **47**, 1481–1488 (1994).
52. Gajate C. & Mollinedo F. Biological Activities, Mechanisms of Action and Biomedical Prospect of the Antitumor Ether Phospholipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine), A Proapoptotic Agent in Tumor Cells. *Curr Drug Metab* **3**, 491–525 (2002).
53. Powis, G. *et al.* Selective Inhibition of Phosphatidylinositol Phospholipase C by Cytotoxic Ether Lipid Analogues. *Cancer Res* **52**, 2835–2840 (1992).
54. Strassheim, D., Shafer, S. H., Phelps, S. H. & Williams, C. L. Small Cell Lung Carcinoma Exhibits Greater Phospholipase C-β1 Expression and Edelfosine Resistance Compared with Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* **60**, 2730–2736 (2000).
55. Berkovic, D., Goeckenjan, M., Lüders, S., Hiddemann, W. & Fleer, E. A. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylinositol and phosphatidylcholine phospholipase C in human leukemia cells. *J Exp Ther Oncol* **1**, 302–311 (1996).
56. Seewald, M. J. *et al.* Inhibition of Growth Factor-dependent Inositol Phosphate Ca²⁺ Signaling by Antitumor Ether Lipid Analogues. *Cancer Res* **50**, 4458–4463 (1990).
57. Kiss, Z. & Crilly, K. S. Alkyl lysophospholipids inhibit phorbol ester-stimulated phospholipase D activity and DNA synthesis in fibroblasts. *FEBS Lett* **412**, 313–317 (1997).
58. Lucas, L., Hernández-Alcoceba, R., Penalva, V. & Lacal, J. C. Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity. *Oncogene* **20**, (2001).
59. Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291–3310 (2007).
60. Zhou, X. *et al.* 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells. *J Clin Invest* **98**, 937–944 (1996).
61. Samadder, P., Richards, C., Bittman, R., Bhullar, R. P. & Arthur, G. The antitumor ether lipid 1-Q-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphocholine (ET-18-OCH₃) inhibits the association between Ras and Raf-1. *Anticancer Res* **23**, 2291–2295 (2003).
62. Mollinedo, F., Gajate, C. & Modolell, M. The ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine induces expression of fos and jun proto-oncogenes and activates AP-1

- transcription factor in human leukaemic cells. *Biochem J* **302**, 325–329 (1994).
63. Davis, R. J. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* **103**, 239–252 (2000).
64. Van Blitterswijk, W. & Verheij, M. Anticancer Alkylphospholipids: Mechanisms of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical Prospects. *Curr Pharm Des* **14**, 2061–2074 (2008).
65. Nieto-Miguel, T., Gajate, C., González-Camacho, F. & Mollinedo, F. Proapoptotic role of Hsp90 by its interaction with c-Jun N-terminal kinase in lipid rafts in edelfosine-mediated antileukemic therapy. *Oncogene* **27**, 1779–1787 (2007).
66. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. & Greenberg, M. E. Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science* **270**, 1326–1331 (1995).
67. Kondapaka, S. B., Singh, S. S., Dasmahapatra, G. P., Sausville, E. A. & Roy, K. K. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* **2**, 1093–1103 (2003).
68. Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J. & Verheij, M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* **14**, 167–173 (2003).
69. Alam, M. M. *et al.* Synthesis, characterization and Akt phosphorylation inhibitory activity of cyclopentanecarboxylate-substituted alkylphosphocholines. *Bioorg Med Chem* **21**, 2018–2024 (2013).
70. Lucas, A. *et al.* Targeting the PI3K/Akt Cell Survival Pathway to Induce Cell Death of HIV-1 Infected Macrophages with Alkylphospholipid Compounds. *PLoS ONE* **5**, e13121 (2010).
71. Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 988–1004 (2005).
72. Hennessy, B. T. *et al.* Pharmacodynamic Markers of Perifosine Efficacy. *Clin Cancer Res* **13**, 7421–7431 (2007).
73. Mollinedo, F., Gajate, C., Martin-Santamaria, S. & Gago, F. ET-18-OCH₃ (edelfosine): a selective antitumor lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr Med Chem* **11**, 3163–3184 (2004).
74. Gajate, C. *et al.* Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer* **85**, 674–682 (2000).
75. Gajate, C. & Mollinedo, F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* **98**, 3860–3863 (2001).
76. Gajate, C. *et al.* Intracellular Triggering of Fas Aggregation and Recruitment of Apoptotic Molecules into Fas-enriched Rafts in Selective Tumor Cell Apoptosis. *J Exp Med* **200**, 353–365 (2004).
77. Gajate, C., Gonzalez-Camacho, F. & Mollinedo, F. Involvement of Raft Aggregates Enriched in Fas/CD95 Death-Inducing Signaling Complex in the Antileukemic Action of Edelfosine in Jurkat Cells. *PLoS ONE* **4**, e5044 (2009).
78. Gajate, C. *et al.* Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH₃-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* **86**, 208–218 (2000).
79. Gajate, C. & Mollinedo, F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **109**, 711–719 (2007).
80. Tidwell, T., Guzman, G. & Vogler, W. R. The effects of alkyl-lysophospholipids on leukemic cell lines. I. Differential action on two human leukemic cell lines, HL60 and K562. *Blood* **57**, 794–797 (1981).
81. Cabaner, C. *et al.* Induction of apoptosis in human mitogen-activated peripheral blood T-lymphocytes by the ether phospholipid ET-18-OCH₃: Involvement of the Fas receptor/ligand system. *Br J Pharmacol* **127**, 813–825 (1999).
82. Tsutsumi, T., Tokumura, A. & Kitazawa, S. Undifferentiated HL-60 cells internalize an antitumor alkyl ether phospholipid more rapidly than resistant K562 cells. *Biochim Biophys Acta* **1390**, 73–84 (1998).
83. Van der Luit, A. H., Budde, M., Ruurs, P., Verheij, M. & van Blitterswijk, W. J. Alkyl-lysophospholipid Accumulates in Lipid Rafts and Induces Apoptosis via Raft-dependent Endocytosis and Inhibition of Phosphatidylcholine Synthesis. *J Biol Chem* **277**, 39541–39547 (2002).
84. Bazill, G. W. & Dexter, T. M. Role of Endocytosis in the Action of Ether Lipids on WEHI-3B, HL60, and FDCP-Mix A4 Cells. *Cancer Res* **50**, 7505–7512 (1990).
85. Zoeller, R. A., Layne, M. D. & Modest, E. J. Animal cell mutants unable to take up biologically active glycerophospholipids. *J Lipid Res* **36**, 1866–1875 (1995).
86. Kelley, E. E., Modest, E. J. & Burns, C. P. Unidirectional membrane uptake of the ether lipid antineoplastic agent edelfosine by L1210 cells. *Biochem Pharmacol* **45**, 2435–2439 (1993).
87. Van der Luit, A. H. *et al.* A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther* **6**, 2337–2345 (2007).
88. Mollinedo, F. & Gajate, C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: New targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat* **9**, 51–73 (2006).
89. Heczková, B. & Slotte, J. P. Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes. *FEBS Lett* **580**, 2471–2476 (2006).
90. Van der Luit, A. H., Budde, M., Verheij, M. & van Blitterswijk, W. J. Different modes of internalization of apoptotic alkyl-lysophospholipid and cell-rescuing lysophosphatidylcholine. *Biochem J* **374**, 747 (2003).
91. Muñoz-Martínez, F., Torres, C., Castanys, S. & Gamarro, F. The anti-tumor alkylphospholipid perifosine is internalized by an ATP-dependent translocase activity across the plasma membrane of human KB carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 530–540 (2008).
92. Muñoz-Martínez, F., Torres, C., Castanys, S. & Gamarro, F. CDC50A plays a key role in the uptake of the anticancer drug perifosine in human carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **80**, 793–800 (2010).
93. Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A. & Williamson, P. A Subfamily of P-Type ATPases with Aminophospholipid Transporting Activity. *Science* **272**, 1495–1497 (1996).
94. Riekhof, W. R. & Voelker, D. R. The yeast plasma membrane P4-ATPases are major transporters for lysophospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 620–627 (2009).
95. Saito, K. *et al.* Cdc50p, a Protein Required for Polarized Growth, Associates with the Drs2p P-Type ATPase Implicated in Phospholipid Translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 3418–3432 (2004).
96. Pomorski, T. *et al.* Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p Are Required for Phospholipid Translocation across the Yeast Plasma Membrane and Serve a Role in Endocytosis. *Mol Biol Cell* **14**, 1240–1254 (2003).
97. Natarajan, P., Wang, J., Hua, Z. & Graham, T. R. Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *PNAS* **101**, 10614–10619 (2004).
98. Kato, U. *et al.* A Novel Membrane Protein, Ros3p, Is Required for Phospholipid Translocation across the Plasma Membrane in

- Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **277**, 37855–37862 (2002).
99. Riekhof, W. R. & Voelker, D. R. Uptake and Utilization of Lyso-phosphatidylethanolamine by Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **281**, 36588–36596 (2006).
100. Riekhof, W. R. *et al.* Lysophosphatidylcholine Metabolism in Saccharomyces cerevisiae THE ROLE OF P-TYPE ATPases IN TRANSPORT AND A BROAD SPECIFICITY ACYLTRANSFERASE IN ACYLATION. *J Biol Chem* **282**, 36853–36861 (2007).
101. Hanson, P. K., Malone, L., Birchmore, J. L. & Nichols, J. W. Lem3p Is Essential for the Uptake and Potency of Alkylphosphocholine Drugs, Edelfosine and Miltefosine. *J Biol Chem* **278**, 36041–36050 (2003).
102. Baldrige, R. D. & Graham, T. R. Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *PNAS* **109**, E290–E298 (2012).
103. Paulusma, C. C. & Oude Elferink, R. P. J. The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1741**, 11–24 (2005).
104. Paulusma, C. C. *et al.* ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* **47**, 268–278 (2008).
105. Bryde, S. *et al.* CDC50 Proteins Are Critical Components of the Human Class-1 P4-ATPase Transport Machinery. *J Biol Chem* **285**, 40562–40572 (2010).
106. Van der Velden, L. M. *et al.* Heteromeric Interactions Required for Abundance and Subcellular Localization of Human CDC50 Proteins and Class 1 P4-ATPases. *J Biol Chem* **285**, 40088–40096 (2010).
107. Chen, R., Brady, E. & McIntyre, T. M. Human TMEM30a Promotes Uptake of Antitumor and Bioactive Choline Phospholipids into Mammalian Cells. *J Immunol* **186**, 3215–3225 (2011).
108. Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M. & Castans, S. Functional Cloning of the Miltefosine Transporter A Novel P-Type Phospholipid Translocase from Leishmania Involved in Drug Resistance. *J Biol Chem* **278**, 49965–49971 (2003).
109. Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete, M. P., Castans, S. & Gamarro, F. Phospholipid Translocation and Miltefosine Potency Require Both L. donovani Miltefosine Transporter and the New Protein LdRos3 in Leishmania Parasites. *J Biol Chem* **281**, 23766–23775 (2006).
110. Berdel, W. E. *et al.* The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid-activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma. *Eur J Cancer* **16**, 1199–1204 (1980).
111. Scherf, H. R., Schuler, B., Berger, M. R. & Schmähel, D. Therapeutic activity of ET-18-OCH₃ and hexadecylphosphocholine against mammary tumors in BD-VI rats. *Lipids* **22**, 927–929 (1987).
112. Herrmann, D. B. J., Pahlke, W., Opitz, H.-G. & Bicker, U. In vivo antitumor activity of ilmofosine. *Cancer Treat Rev* **17**, 247–252 (1990).
113. Unger, C. *et al.* Hexadecylphosphocholine, a New Ether Lipid Analogue Studies on the Antineoplastic Activity in Vitro and in Vivo. *Acta Oncol* **28**, 213–217 (1989).
114. Mollinedo, F. *et al.* Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* **29**, 3748–3757 (2010).
115. Mollinedo, F. *et al.* In vitro and In vivo Selective Antitumor Activity of Edelfosine against Mantle Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Involving Lipid Rafts. *Clin Cancer Res* **16**, 2046–2054 (2010).
116. Ahmad, I. *et al.* Enhanced Therapeutic Effects of Liposome-associated 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Cancer Res* **57**, 1915–1921 (1997).
117. Fichtner, I. *et al.* Antineoplastic activity of alkylphosphocholines (APC) in human breast carcinomas in vivo and in vitro; use of liposomes. *Breast Cancer Res Tr* **32**, 269–279 (1994).
118. Zeisig, R., Arndt, D., Stahn, R. & Fichtner, I. Physical properties and pharmacological activity in vitro and in vivo of optimised liposomes prepared from a new cancerostatic alkylphospholipid. *Biochim Biophys Acta* **1414**, 238–248 (1998).
119. Woolley, P. V. *et al.* A phase II trial of ilmofosine in non-small cell bronchogenic carcinoma. *Invest New Drugs* **14**, 219–222 (1996).
120. Vogler, W. R. *et al.* A phase II trial of autologous bone marrow transplantation (ABMT) in acute leukemia with edelfosine purged bone marrow. *Adv Exp Med Biol* **416**, 389–396 (1996).
121. Verweij, J., Planting, A. S. T., Stoter, G., Gandia, D. & Armand, J. P. Phase II study of oral miltefosine in patients with squamous cell head and neck cancer. *Eur J Cancer* **29**, 778–779 (1993).
122. Planting, A. S. T., Stoter, G. & Verweij, J. Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* **29**, 518–519 (1993).
123. Verweij, J. *et al.* Phase II study of miltefosine (Hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of the adult— An EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group study. *Eur J Cancer* **29**, 208–209 (1993).
124. Posadas, E. M. & Gulley, J. A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **4**, 1133–1137 (2005).
125. Ernst, D. S. *et al.* Phase II Study of Perifosine in Previously Untreated Patients with Metastatic Melanoma. *Invest New Drugs* **23**, 569–575 (2005).
126. Knowling, M. *et al.* A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Invest New Drugs* **24**, 435–439 (2006).
127. Argiris, A. & Cohen, E. A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* **5**, 766–770 (2006).
128. Smorenburg, C. H. *et al.* Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer Drugs* **11**, 825–828 (2000).
129. Leonard, R. *et al.* Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial of 6% Miltefosine Solution, a Topical Chemotherapy in Cutaneous Metastases From Breast Cancer. *J Clin Onc* **19**, 4150–4159 (2001).
130. Magistrelli, A. *et al.* Fate of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (ET18-OME) in malignant cells, normal cells, and isolated and perfused rat liver. *Drug Metab Dispos* **23**, 113–118 (1995).
131. Van Blitterswijk, W. J. & Verheij, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 663–674 (2013).
132. Kuhlencord, A., Maniera, T., Eibl, H. & Unger, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1630–1634 (1992).
133. Sundar, S. *et al.* Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *N Engl J Med* **347**, 1739–1746 (2002).
134. Croft, S. L., Snowdon, D. & Yardley, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei. *J Antimicrob Chemother* **38**, 1041–1047 (1996).
135. Seifert, K. *et al.* Effects of Miltefosine and Other Alkylphosphocholines on Human Intestinal Parasite Entamoeba histolytica. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1505–1510 (2001).
136. Boon, J. M. & Smith, B. D. Chemical control of phospholipid

- distribution across bilayer membranes. *Med Res Rev* **22**, 251–281 (2002).
137. Cerbón, J. & Calderón, V. Changes of the compositional asymmetry of phospholipids associated to the increment in the membrane surface potential. *Biochim Biophys Acta* **1067**, 139–144 (1991).
138. McConnell, H. M. & Kornberg, R. D. Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* **10**, 1111–1120 (1971).
139. Daleke, D. L. Phospholipid Flippases. *J Biol Chem* **282**, 821–825 (2007).
140. Chen, C.-Y., Ingram, M. F., Rosal, P. H. & Graham, T. R. Role for Drs2p, a P-Type ATPase and Potential Aminophospholipid Translocase, in Yeast Late Golgi Function. *J Cell Biol* **147**, 1223–1236 (1999).
141. Hua, Z., Fatheddin, P. & Graham, T. R. An Essential Subfamily of Drs2p-related P-Type ATPases Is Required for Protein Trafficking between Golgi Complex and Endosomal/Vacuolar System. *Mol Biol Cell* **13**, 3162–3177 (2002).
142. Gall, W. E. *et al.* Drs2p-Dependent Formation of Exocytic Clathrin-Coated Vesicles In Vivo. *Curr Biol* **12**, 1623–1627 (2002).
143. Chen, S. *et al.* Roles for the Drs2p–Cdc50p Complex in Protein Transport and Phosphatidylserine Asymmetry of the Yeast Plasma Membrane. *Traffic* **7**, 1503–1517 (2006).
144. Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T. & Holthuis, J. C. M. Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p Disrupts Aminophospholipid Transport and Asymmetry in Yeast Post-Golgi Secretory Vesicles. *Mol Biol Cell* **17**, 1632–1642 (2006).
145. Zhou, X. & Graham, T. R. Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *PNAS* **106**, 16586–16591 (2009).
146. Graham, T. R. Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends Cell Biol* **14**, 670–677 (2004).
147. Furuta, N., Fujimura-Kamada, K., Saito, K., Yamamoto, T. & Tanaka, K. Endocytic Recycling in Yeast Is Regulated by Putative Phospholipid Translocases and the Ypt31p/32p–Rcy1p Pathway. *Mol Biol Cell* **18**, 295–312 (2007).
148. Wicky, S., Schwarz, H. & Singer-Krüger, B. Molecular Interactions of Yeast Neolp, an Essential Member of the Drs2 Family of Aminophospholipid Translocases, and Its Role in Membrane Trafficking within the Endomembrane System. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7402–7418 (2004).
149. Karnovsky, M. J., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L. & Klausner, R. D. The concept of lipid domains in membranes. *J Cell Biol* **94**, 1–6 (1982).
150. Simons, K. & Van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197–6202 (1988).
151. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nat Cell Biol* **387**, 569–572 (1997).
152. Simons, K. & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 688–699 (2010).
153. Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Simons, K. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *PNAS* **97**, 3254–3259 (2000).
154. Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M. & Tanner, W. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci* **117**, 6031–6041 (2004).
155. Aresta-Branco, F. *et al.* Gel Domains in the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Highly Ordered, Ergosterol-Free, and Sphingolipid-Enriched Lipid Rafts. *J Biol Chem* **286**, 5043–5054 (2011).
156. Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M. & Tanner, W. Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells. *Mol Biol Cell* **14**, 4427–4436 (2003).
157. Grossmann, G., Opekarov[[aacute]], M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I. & Tanner, W. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* **26**, 1–8 (2006).
158. Grossmann, G. *et al.* Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol* **183**, 1075–1088 (2008).
159. Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L. & Schneiter, R. Synthesis of Sphingolipids with Very Long Chain Fatty Acids but Not Ergosterol Is Required for Routing of Newly Synthesized Plasma Membrane ATPase to the Cell Surface of Yeast. *J Biol Chem* **280**, 22515–22522 (2005).
160. Strádalová, V. *et al.* Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci* **122**, 2887–2894 (2009).
161. Walther, T. C. *et al.* Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**, 998–1003 (2006).
162. Karotki, L. *et al.* Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *J Cell Biol* **195**, 889–902 (2011).
163. Toret, C. P. & Drubin, D. G. The budding yeast endocytic pathway. *J Cell Sci* **119**, 4585–4587 (2006).
164. Brach, T., Specht, T. & Kaksonen, M. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J Cell Sci* **124**, 328–337 (2011).
165. Parton, R. G. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185–194 (2007).
166. Ziółkowska, N. E., Christiano, R. & Walther, T. C. Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol* **22**, 151–158 (2012).
167. De Matteis, M. A. & Luini, A. Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 273–284 (2008).
168. Gurunathan, S., David, D. & Gerst, J. E. Dynamin and clathrin are required for the biogenesis of a distinct class of secretory vesicles in yeast. *EMBO J* **21**, 602–614 (2002).
169. Zanolari, B. *et al.* Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **124**, 1055–1066 (2011).
170. Surma, M. A., Klose, C. & Simons, K. Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1059–1067 (2012).
171. Muthusamy, B.-P., Natarajan, P., Zhou, X. & Graham, T. R. Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 612–619 (2009).
172. Stearns, T., Kahn, R. A., Botstein, D. & Hoyt, M. A. ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Mol Cell Biol* **10**, 6690–6699 (1990).
173. Gaynor, E. C., Graham, T. R. & Emr, S. D. COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way? *Biochim Biophys Acta* **1404**, 33–51 (1998).
174. Chen, C.-Y. & Graham, T. R. An arf1Δ Synthetic Lethal Screen Identifies a New Clathrin Heavy Chain Conditional Allele That Perturbs Vacuolar Protein Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**, 577–589 (1998).
175. Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S. & Schekman, R. W. The Yeast Clathrin Adaptor Protein Complex 1 Is Required for the Efficient Retention of a Subset of Late Golgi Membrane Proteins. *Dev Cell* **2**, 283–294 (2002).
176. Daboussi, L., Costaguta, G. & Payne, G. S. Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network.

- Nat Cell Biol* **14**, 239–248 (2012).
177. Zhdankina, O., Strand, N. L., Redmond, J. M. & Boman, A. L. Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. *Yeast* **18**, 1–18 (2001).
 178. Mullins, C. & Bonifacino, J. S. Structural Requirements for Function of Yeast GGAs in Vacuolar Protein Sorting, α -Factor Maturation, and Interactions with Clathrin. *Mol Cell Biol* **21**, 7981–7994 (2001).
 179. Ha, S.-A. *et al.* The Synaptojanin-like Protein Inp53/Sjl3 Functions with Clathrin in a Yeast TGN-to-Endosome Pathway Distinct from the GGA Protein-dependent Pathway. *Mol Biol Cell* **14**, 1319–1333 (2003).
 180. Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D. & Kahn, R. A. ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *PNAS* **87**, 1238–1242 (1990).
 181. Spang, A., Shiba, Y. & Randazzo, P. A. Arf GAPs: Gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Lett* **584**, 2646–2651 (2010).
 182. Zhang, C., Cavenagh, M. M. & Kahn, R. A. A Family of Arf Effectors Defined as Suppressors of the Loss of Arf Function in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 19792–19796 (1998).
 183. Yanagisawa, L. L. *et al.* Activity of Specific Lipid-regulated ADP Ribosylation Factor-GTPase-activating Proteins Is Required for Sec14p-dependent Golgi Secretory Function in Yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 2193–2206 (2002).
 184. Benjamin, J. J. R. *et al.* The yeast Arf GTPase-activating protein Age1 is regulated by phospholipase D for post-Golgi vesicular transport. *J Biol Chem* **286**, 5187–5196 (2011).
 185. Zhang, C.-J., Bowzard, J. B., Anido, A. & Kahn, R. A. Four ARF GAPs in *Saccharomyces cerevisiae* have both overlapping and distinct functions. *Yeast* **20**, 315–330 (2003).
 186. Poon, P. P. *et al.* Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J* **18**, 555–564 (1999).
 187. Wong, T. A. *et al.* Membrane metabolism mediated by Sec14 family members influences Arf GTPase activating protein activity for transport from the trans-Golgi. *PNAS* **102**, 12777–12782 (2005).
 188. Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campli, A. & De Matteis, M. A. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J* **27**, 2457–2470 (2008).
 189. Hama, H., Schnieders, E. A., Thorner, J., Takemoto, J. Y. & DeWald, D. B. Direct Involvement of Phosphatidylinositol 4-Phosphate in Secretion in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**, 34294–34300 (1999).
 190. Audhya, A., Foti, M. & Emr, S. D. Distinct Roles for the Yeast Phosphatidylinositol 4-Kinases, Stt4p and Pik1p, in Secretion, Cell Growth, and Organelle Membrane Dynamics. *Mol Biol Cell* **11**, 2673–2689 (2000).
 191. Demmel, L. *et al.* The Clathrin Adaptor Gga2p Is a Phosphatidylinositol 4-phosphate Effector at the Golgi Exit. *Mol Biol Cell* **19**, 1991–2002 (2008).
 192. Natarajan, P. *et al.* Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGAP. *Nat Cell Biol* **11**, 1421–1426 (2009).
 193. Johansen, J., Ramanathan, V. & Beh, C. Vesicle trafficking from a lipid perspective: Lipid regulation of exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Logist* **2**, 151–160 (2012).
 194. Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B. & Burger, K. N. J. Modulation of Membrane Curvature by Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid. *Traffic* **4**, 162–174 (2003).
 195. Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S. F. & Graham, T. R. P4-ATPase Requirement for AP-1/Clathrin Function in Protein Transport from the trans-Golgi Network and Early Endosomes. *Mol Biol Cell* **19**, 3526–3535 (2008).
 196. Sakane, H., Yamamoto, T. & Tanaka, K. The Functional Relationship between the Cdc50p-Drs2p Putative Aminophospholipid Translocase and the Arf GAP Gcs1p in Vesicle Formation in the Retrieval Pathway from Yeast Early Endosomes to the TGN. *Cell Struct Funct* **31**, 87–108 (2006).
 197. Sheetz, M. P. & Singer, S. J. Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *PNAS* **71**, 4457–4461 (1974).
 198. Bagnat, M., Chang, A. & Simons, K. Plasma Membrane Proton ATPase Pma1p Requires Raft Association for Surface Delivery in Yeast. *Mol Biol Cell* **12**, 4129–4138 (2001).
 199. Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. & Tuena, M. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **153**, 413–425 (1972).
 200. Martínez-Muñoz, G. A. & Kane, P. Vacuolar and Plasma Membrane Proton Pumps Collaborate to Achieve Cytosolic pH Homeostasis in Yeast. *J Biol Chem* **283**, 20309–20319 (2008).
 201. Madrid, R., Gómez, M. J., Ramos, J. & Rodríguez-Navarro, A. Ectopic Potassium Uptake in trk1 trk2 Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Correlates with a Highly Hyperpolarized Membrane Potential. *J Biol Chem* **273**, 14838–14844 (1998).
 202. Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. & Fink, G. R. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**, 689–693 (1986).
 203. Lauwers, E. & André, B. Association of Yeast Transporters with Detergent-Resistant Membranes Correlates with Their Cell-Surface Location. *Traffic* **7**, 1045–1059 (2006).
 204. Lee, M. C. S., Hamamoto, S. & Schekman, R. Ceramide Biosynthesis Is Required for the Formation of the Oligomeric H⁺-ATPase Pma1p in the Yeast Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* **277**, 22395–22401 (2002).
 205. Oh, C.-S., Toke, D. A., Mandala, S. & Martin, C. E. ELO2 and ELO3, Homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 Gene, Function in Fatty Acid Elongation and Are Required for Sphingolipid Formation. *J Biol Chem* **272**, 17376–17384 (1997).
 206. Eisenkolb, M., Zenzmaier, C., Leitner, E. & Schneider, R. A Specific Structural Requirement for Ergosterol in Long-chain Fatty Acid Synthesis Mutants Important for Maintaining Raft Domains in Yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 4414–4428 (2002).
 207. Gaigg, B., Toulmay, A. & Schneider, R. Very Long-chain Fatty Acid-containing Lipids rather than Sphingolipids per se Are Required for Raft Association and Stable Surface Transport of Newly Synthesized Plasma Membrane ATPase in Yeast. *J Biol Chem* **281**, 34135–34145 (2006).
 208. Surma, M. A., Klose, C., Klemm, R. W., Ejsing, C. S. & Simons, K. Generic Sorting of Raft Lipids into Secretory Vesicles in Yeast. *Traffic* **12**, 1139–1147 (2011).
 209. Klemm, R. W. *et al.* Segregation of Sphingolipids and Sterols During Formation of Secretory Vesicles at the Trans-Golgi Network. *J Cell Biol* **185**, 601–612 (2009).
 210. Curwin, A. J., LeBlanc, M. A., Fairn, G. D. & McMaster, C. R. Localization of Lipid Raft Proteins to the Plasma Membrane Is a Major Function of the Phospholipid Transfer Protein Sec14. *PLoS ONE* **8**, e55388 (2013).
 211. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481–3500 (2011).
 212. Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 597–608 (2009).
 213. Bonifacino, J. S. & Rojas, R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 568–579 (2006).

214. Rohn, W. M., Rouille, Y., Waguri, S. & Hoflack, B. Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J Cell Sci* **113**, 2093–2101 (2000).
215. Piper, R. C. & Luzio, J. P. Late Endosomes: Sorting and Partitioning in Multivesicular Bodies. *Traffic* **2**, 612–621 (2001).
216. Katzmann, D. J., Babst, M. & Emr, S. D. Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145–155 (2001).
217. Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B. & Emr, S. D. Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body. *Dev Cell* **3**, 283–289 (2002).
218. Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. & Emr, S. D. Escrt-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**, 271–282 (2002).
219. Bilodeau, P. S., Urbanowski, J. L., Winistorfer, S. C. & Piper, R. C. The Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nature Cell Biology* **4**, 534–539 (2002).
220. Saksena, S., Sun, J., Chu, T. & Emr, S. D. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci* **32**, 561–573 (2007).
221. Williams, R. L. & Urbe, S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 355–368 (2007).
222. Hurley, J. H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 4–11 (2008).
223. Hurley, J. H. & Hanson, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 556–566 (2010).
224. Hicke, L. & Dunn, R. Regulation of Membrane Protein Transport by Ubiquitin and Ubiquitin-Binding Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141–172 (2003).
225. Amerik, A. Y., Nowak, J., Swaminathan, S. & Hochstrasser, M. The Doa4 Deubiquitinating Enzyme Is Functionally Linked to the Vacuolar Protein-sorting and Endocytic Pathways. *Mol Biol Cell* **11**, 3365–3380 (2000).
226. Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J. & Hurley, J. H. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**, 172–177 (2009).
227. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell* **122**, 735–749 (2005).
228. Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell* **141**, 497–508 (2010).
229. Horazdovsky, B. F., Busch, G. R. & Emr, S. D. VPS21 encodes a rab5-like GTP binding protein that is required for the sorting of yeast vacuolar proteins. *EMBO J* **13**, 1297–1309 (1994).
230. Singer-Krüger, B. *et al.* Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J Cell Biol* **125**, 283–298 (1994).
231. Sönnichsen, B., Renzis, S. D., Nielsen, E., Rietdorf, J. & Zerial, M. Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* **149**, 901–914 (2000).
232. Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, P. H., Simmons, K. & Zerial, M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317–329 (1990).
233. Schimmoller, F. & Riezman, H. Involvement of Ypt7p, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast. *J Cell Sci* **106**, 823–830 (1993).
234. Haas, A., Scheglmann, D., Lazar, T., Gallwitz, D. & Wickner, W. The GTPase Ypt7p of *Saccharomyces cerevisiae* is required on both partner vacuoles for the homotypic fusion step of vacuole inheritance. *EMBO J* **14**, 5258–5270 (1995).
235. Grosshans, B. L., Ortiz, D. & Novick, P. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *PNAS* **103**, 11821–11827 (2006).
236. Gorvel, J.-P., Chavrier, P., Zerial, M. & Gruenberg, J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915–925 (1991).
237. Nordmann, M., Ungermann, C. & Cabrera, M. in *Rab GTPases and Membrane Trafficking* (Li, G. & Segev) 132–143 (Bentham Science, 2012).
238. Lachmann, J., Ungermann, C. & Engelbrecht-Vandré, S. Rab GTPases and tethering in the yeast endocytic pathway. *Small GTPases* **2**, 182–186 (2011).
239. Peplowska, K., Markgraf, D. F., Ostrowicz, C. W., Bange, G. & Ungermann, C. The CORVET Tethering Complex Interacts with the Yeast Rab5 Homolog Vps21 and Is Involved in Endo-Lysosomal Biogenesis. *Dev Cell* **12**, 739–750 (2007).
240. Markgraf, D. F. *et al.* The CORVET Subunit Vps8 Cooperates with the Rab5 Homolog Vps21 to Induce Clustering of Late Endosomal Compartments. *Mol Biol Cell* **20**, 5276–5289 (2009).
241. Balderhaar, H. J. kleine *et al.* The CORVET complex promotes tethering and fusion of Rab5/Vps21-positive membranes. *PNAS* **110**, 3823–3828 (2013).
242. Bröcker, C. *et al.* Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *PNAS* **109**, 1991–1996 (2012).
243. Nordmann, M. *et al.* The Mon1-Ccz1 Complex Is the GEF of the Late Endosomal Rab7 Homolog Ypt7. *Curr Biol* **20**, 1654–1659 (2010).
244. Seaman, M. N. J., Michael McCaffery, J. & Emr, S. D. A Membrane Coat Complex Essential for Endosome-to-Golgi Retrograde Transport in Yeast. *J Cell Biol* **142**, 665–681 (1998).
245. Horazdovsky, B. F. *et al.* A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Mol Biol Cell* **8**, 1529–1541 (1997).
246. Seaman, M. N. J. & Williams, H. P. Identification of the Functional Domains of Yeast Sorting Nexins Vps5p and Vps17p. *Mol Biol Cell* **13**, 2826–2840 (2002).
247. Van Weering, J. R. T. *et al.* Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *EMBO J* **31**, 4466–4480 (2012).
248. Nothwehr, S. F., Ha, S.-A. & Bruinsma, P. Sorting of Yeast Membrane Proteins into an Endosome-to-Golgi Pathway Involves Direct Interaction of Their Cytosolic Domains with Vps35p. *J Cell Biol* **151**, 297–310 (2000).
249. Hierro, A. *et al.* Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* **449**, 1063–1067 (2007).
250. Popoff, V. *et al.* The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *J Cell Sci* **120**, 2022–2031 (2007).
251. Seaman, M. N. J. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* **165**, 111–122 (2004).
252. Rojas, R. *et al.* Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* **183**, 513–526 (2008).
253. Van Weering, J. R. T., Verkade, P. & Cullen, P. J. SNX-BAR-Mediated Endosome Tubulation is Co-ordinated with Endosome Maturation. *Traffic* **13**, 94–107 (2012).
254. Balderhaar, H. J. kleine *et al.* The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *J Cell Sci* **123**, 4085–4094 (2010).
255. Liu, T.-T., Gomez, T. S., Sackey, B. K., Billadeau, D. D. & Burd,

- C. G. Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell* **23**, 2505–2515 (2012).
256. Nothwehr, S. F., Bryant, N. J. & Stevens, T. H. The newly identified yeast GRD genes are required for retention of late-Golgi membrane proteins. *Mol Biol Cell* **16**, 2700–2707 (1996).
257. Wilcox, C. A., Redding, K., Wright, R. & Fuller, R. S. Mutation of a tyrosine localization signal in the cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts Golgi retention and results in default transport to the vacuole. *Mol Biol Cell* **3**, 1353–1371 (1992).
258. Membrane protein retention in the yeast Golgi apparatus: dipeptidyl aminopeptidase A is retained by a cytoplasmic signal containing aromatic residues. *J Cell Biol* **121**, 1197–1209 (1993).
259. Cereghino, J. L., Marcusson, E. G. & Emr, S. D. The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol Biol Cell* **6**, 1089–1102 (1995).
260. Cooper, A. & Bussey, H. Yeast Kex1p is a Golgi-associated membrane protein: deletions in a cytoplasmic targeting domain result in mislocalization to the vacuolar membrane. *J Cell Biol* **119**, 1459–1468 (1992).
261. Cooper, A. & Bussey, H. Characterization of the yeast KEX1 gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. *Mol Cell Biol* **9**, 2706–2714 (1989).
262. Strohlic, T. I., Setty, T. G., Sitaram, A. & Burd, C. G. Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol* **177**, 115–125 (2007).
263. De Deken, R. H. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *J Gen Microbiol* **44**, 149–156 (1966).
264. Visser, W., Scheffers, W. A., Vegte, W. H. B. der & Dijken, J. P. van. Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3785–3792 (1990).
265. Andreasen, A. A. & Stier, T. J. B. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J Cell Comp Physiol* **41**, 23–36 (1953).
266. Andreasen, A. A. & Stier, T. J. B. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty and requirement for growth in a defined medium. *J Cell Comp Physiol* **43**, 271–281 (1954).
267. Alimardani, P. *et al.* SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochem J* **381**, 195 (2004).
268. Barnett, J. A. & Entian, K.-D. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* **22**, 835–894 (2005).
269. Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A. & Compagno, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet* **22**, 183–186 (2006).
270. DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* **278**, 680–686 (1997).
271. Wallace, P. G., Huang, M. & Linnane, A. W. The Biogenesis of Mitochondria II. The Influence of Medium Composition on the Cytology of Anaerobically Grown *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **37**, 207–220 (1968).
272. Rosenfeld, E., Schaeffer, J., Beauvoit, B. & Salmon, J.-M. Isolation and properties of promitochondria from anaerobic stationary-phase yeast cells. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**, 9–21 (2004).
273. Damsky, C. H. Environmentally induced changes in mitochondria and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces carlsbergensis* yeast. *J Cell Biol* **71**, 123–135 (1976).
274. Yotsuyanagi, Y. Études sur le chondriome de la levure: I. Variation de l'ultrastructure du chondriome au cours du cycle de la croissance aérobie. *J Ultrastruct Res* **7**, 121–140 (1962).
275. Hoffmann, H.-P. & Avers, C. J. Mitochondrion of Yeast: Ultrastructural Evidence for One Giant, Branched Organelle per Cell. *Science* **181**, 749–751 (1973).
276. Egner, A., Jakobs, S. & Hell, S. W. Fast 100-Nm Resolution Three-Dimensional Microscope Reveals Structural Plasticity of Mitochondria in Live Yeast. *PNAS* **99**, 3370–3375 (2002).
277. Visser, W. *et al.* Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**, 243–253 (1995).
278. Nunnari, J. *et al.* Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* **8**, 1233–1242 (1997).
279. Bleazard, W. *et al.* The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* **1**, 298–304 (1999).
280. Otsuga, D. *et al.* The Dynamin-related GTPase, Dnm1p, Controls Mitochondrial Morphology in Yeast. *J Cell Biol* **143**, 333–349 (1998).
281. Hermann, G. J. *et al.* Mitochondrial Fusion in Yeast Requires the Transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* **143**, 359–373 (1998).
282. Mozdy, A. D., McCaffery, J. M. & Shaw, J. M. Dnm1p Gtpase-Mediated Mitochondrial Fission Is a Multi-Step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p. *J Cell Biol* **151**, 367–380 (2000).
283. Frederick, R. L., McCaffery, J. M., Cunningham, K. W., Okamoto, K. & Shaw, J. M. Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* **167**, 87–98 (2004).
284. Kornmann, B., Osman, C. & Walter, P. The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum–mitochondria connections. *PNAS* **108**, 14151–14156 (2011).
285. Tolkovsky, A. M. Mitophagy. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1508–1515 (2009).
286. Gomes, L. C. & Scorrano, L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 205–212 (2013).
287. Mitchell, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
288. Luttik, M. A. H. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the Oxidation of Cytosolic NADH. *J Biol Chem* **273**, 24529–24534 (1998).
289. Barnett, J. A. A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics1. *Yeast* **24**, 799–845 (2007).
290. Goldring, E. S., Grossman, L. I., Krupnick, D., Cryer, D. R. & Marmor, J. The petite mutation in Yeast: Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J Mol Biology* **52**, 323–335 (1970).
291. Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M. & Rodenburg, R. J. T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* **35**, 211–225 (2012).
292. Fontanesi, F., Soto, I. C. & Barrientos, A. Cytochrome c oxidase biogenesis: New levels of regulation. *IUBMB Life* **60**, 557–568 (2008).
293. Huxley, T. H. in *Collected Essays Volume 8: Discourses: Biological and Geological* 110–136 (Cambridge University Press, 1871).
294. Broach, J. R., Strathern, J. N. & Hicks, J. B. Transformation in yeast: Development of a hybrid cloning vector and isolation of the *can1* gene. *Gene* **8**, 121–133 (1979).
295. Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 Genes. *Science* **274**, 546–567 (1996).
296. Foury, F. Human genetic diseases: a cross-talk between man and

- yeast. *Gene* **195**, 1–10 (1997).
297. Winzeler, E. A. *et al.* Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science* **285**, 901–906 (1999).
298. Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. & Philippsen, P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793–1808 (1994).
299. Giaever, G. *et al.* Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387–391 (2002).
300. Hillenmeyer, M. E. *et al.* The Chemical Genomic Portrait of Yeast: Uncovering a Phenotype for All Genes. *Science* **320**, 362–365 (2008).
301. Scherens, B. & Goffeau, A. The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol* **5**, 229 (2004).
302. Ruetz, S., Brault, M., Dalton, W. & Gros, P. Functional Interactions between Synthetic Alkyl Phospholipids and the ABC Transporters P-Glycoprotein, Ste-6, MRP, and Pgh-1. *Biochemistry* **36**, 8180–8188 (1997).
303. Widmer, F. *et al.* Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) Has Broad-Spectrum Fungicidal Activity and Is Efficacious in a Mouse Model of Cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 414–421 (2006).
304. Tong, Z. *et al.* In Vitro Activities of Miltefosine and Two Novel Antifungal Biscationic Salts against a Panel of 77 Dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2219–2222 (2007).
305. Zarembeg, V., Gajate, C., Cacharro, L. M., Mollinedo, F. & McMaster, C. R. Cytotoxicity of an Anti-cancer Lysophospholipid through Selective Modification of Lipid Raft Composition. *J Biol Chem* **280**, 38047–38058 (2005).
306. Kodaki, T. & Yamashita, S. Yeast phosphatidylethanolamine methylation pathway. Cloning and characterization of two distinct methyltransferase genes. *J. Biol. Chem.* **262**, 15428–15435 (1987).
307. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol Rev* **79**, 143–180 (1999).
308. Cid, V. J. *et al.* Assessment of PTEN tumor suppressor activity in nonmammalian models: the year of the yeast. *Oncogene* **27**, 5431–5442 (2008).
309. Urban, J. *et al.* Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**, 663–674 (2007).
310. Madeo, F., Frohlich, E. & Frohlich, K.-U. A Yeast Mutant Showing Diagnostic Markers of Early and Late Apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 729–734 (1997).
311. Carmona-Gutierrez, D. *et al.* Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ* **17**, 763–773 (2010).
312. Wesselborg, S. *et al.* A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. *Mol Cell* **9**, 911–917 (2002).
313. Wissing, S. *et al.* An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **166**, 969–974 (2004).
314. Madeo, F. *et al.* Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *J Cell Biol* **145**, 757–767 (1999).
315. Ludovico, P. *et al.* Cytochrome c Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**, 2598–2606 (2002).
316. Bitew, T., Sveen, C. E., Heyne, B. & Zarembeg, V. Vitamin E Prevents Lipid Raft Modifications Induced by an Anti-cancer Lysophospholipid and Abolishes a Yap1-mediated Stress Response in Yeast. *J Biol Chem* **285**, 25731–25742 (2010).
317. Darzynkiewicz, Z. & Robinson, J. P. *Flow Cytometry*. (Academic Press, 1994).
318. Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3–11 (2009).
319. Cuesta-Marbán, A., Botet J., Czyz O., Cacharro L. M., Gajate C., Hornillos V., Delgado J., Zhang H., Amat-Guerri F., Acuña U. A., McMaster C. R., Revuelta J. L., Zarembeg V., Mollinedo F. Drug uptake, lipid rafts and vesicle trafficking modulate resistance to an anticancer lysophosphatidylcholine analogue in yeast. *J Biol Chem* **288**, 8405–18 (2013).
320. Czyz O., Bitew T., Cuesta-Marbán, A., McMaster C. R., Mollinedo F., Zarembeg V. Alteration of plasma membrane organization by an anticancer lysophosphatidylcholine analogue induces intracellular acidification and internalization of plasma membrane transporters in yeast. *J Biol Chem* **288**, 8419–32 (2013).
321. Robinson, M., Grigull, J., Mohammad, N. & Hughes, T. FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* **3**, 35 (2002).
322. Consortium, T. G. O. Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation. *Genome Res* **11**, 1425–1433 (2001).
323. Mewes, H. W., Albermann, K., Heumann, K., Liebl, S. & Pfeiffer, F. MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucl Acids Res* **25**, 28–30 (1997).
324. Hughes, T. R. *et al.* Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat Genet* **25**, 333–337 (2000).
325. Quesada, E. *et al.* Fluorescent phenylpolyene analogues of the ether phospholipid edelfosine for the selective labeling of cancer cells. *J Med Chem* **47**, 5333–5335 (2004).
326. Mollinedo, F. *et al.* Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis* **2**, e158 (2011).
327. David, D., Sundarababu, S. & Gerst, J. E. Involvement of Long Chain Fatty Acid Elongation in the Trafficking of Secretory Vesicles in Yeast. *J Cell Biol* **143**, 1167–1182 (1998).
328. Preuss, D. *et al.* Structure of the yeast endoplasmic reticulum: Localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast* **7**, 891–911 (1991).
329. Gautier, T., Bergès, T., Tollervey, D. & Hurt, E. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* **17**, 7088–7098 (1997).
330. Feldheim, D., Rothblatt, J. & Schekman, R. Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol Cell Biol* **12**, 3288–3296 (1992).
331. BODIPY * Lipid Probes. (2003). at <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp03792.pdf>>
332. in *The Molecular Probes® Handbook* (Life Technologies).
333. Engqvist-Goldstein, Å. E. Y. & Drubin, D. G. Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287–332 (2003).
334. Geli, M. I. & Riezman, H. Role of Type I Myosins in Receptor-Mediated Endocytosis in Yeast. *Science* **272**, 533–535 (1996).
335. Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. & Riezman, H. end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **120**, 55–65 (1993).
336. Burston, H. E. *et al.* Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis. *J Cell Biol* **185**, 1097–1110 (2009).
337. Rooij, I. I. S. *et al.* A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *J Cell Sci* **123**, 3496–3506 (2010).
338. Roumanie, O., Peypouquet, M.-F., Thoraval, D., Doignon, F. & Crouzet, M. Functional interactions between the VRP1-LAS17 and RHO3-RHO4 genes involved in actin cytoskeleton organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **40**, 317–325 (2002).
339. Riezman, H. Endocytosis in yeast: Several of the yeast secretory

- mutants are defective in endocytosis. *Cell* **40**, 1001–1009 (1985).
340. Vida, T. & Emr, S. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779–792 (1995).
341. Busto, J., del Canto-Jañez, E., Goñi, F., Mollinedo, F. & Alonso, A. Combination of the anti-tumour cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug. *J Chem Biol* **1**, 89–94 (2008).
342. Lorenz, R. T. & Parks, L. W. Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1660–1665 (1990).
343. Basson, M. E., Thorsness, M. & Rine, J. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *PNAS* **83**, 5563–5567 (1986).
344. Basson, M. E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R. M. & Rine, J. Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Cell Biol* **8**, 3797–3808 (1988).
345. Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. & Pitha, J. Differential effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* **186**, 17–22 (1989).
346. Du, W. & Ayscough, K. R. Methyl β -cyclodextrin reduces accumulation of reactive oxygen species and cell death in yeast. *Free Radic Biol Med* **46**, 1478–1487 (2009).
347. Dulaney, E. L., Stapley, E. O. & Simpf, K. Studies on Ergosterol Production by Yeasts. *Appl Microbiol* **2**, 371–379 (1954).
348. Jørgensen, M. U., Emr, S. D. & Winther, J. R. Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **260**, 461–469 (1999).
349. Shi, Y., Stefan, C. J., Rue, S. M., Teis, D. & Emr, S. D. Two novel WD40 domain-containing proteins, Ere1 and Ere2, function in the retromer-mediated endosomal recycling pathway. *Mol Biol Cell* **22**, 4093–4107 (2011).
350. Hettema, E. H., Lewis, M. J., Black, M. W. & Pelham, H. R. B. Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *EMBO J* **22**, 548–557 (2003).
351. Chen, S. H. *et al.* Ypt31/32 GTPases and Their Novel F-Box Effector Protein Rcy1 Regulate Protein Recycling. *Mol Biol Cell* **16**, 178–192 (2005).
352. Conibear, E. & Stevens, T. H. Vps52p, Vps53p, and Vps54p Form a Novel Multisubunit Complex Required for Protein Sorting at the Yeast Late Golgi. *Mol Biol Cell* **11**, 305–323 (2000).
353. Siniosoglou, S. & Pelham, H. R. B. An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes. *EMBO J* **20**, 5991–5998 (2001).
354. Coe, J. G. S., Lim, A. C. B., Xu, J. & Hong, W. A Role for Tlg1p in the Transport of Proteins within the Golgi Apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**, 2407–2423 (1999).
355. Valdez-Taubas, J. & Pelham, H. Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J* **24**, 2524–2532 (2005).
356. Lam, M. H. Y. *et al.* Interaction of the Deubiquitinating Enzyme Ubp2 and the E3 Ligase Rsp5 Is Required for Transporter/Receptor Sorting in the Multivesicular Body Pathway. *PLoS ONE* **4**, e4259 (2009).
357. Pearce, D. A., Nosel, S. A. & Sherman, F. Studies of pH Regulation by Btn1p, the Yeast Homolog of Human Cln3p. *Mol Genet Metab* **66**, 320–323 (1999).
358. Schuldiner, M. *et al.* Exploration of the Function and Organization of the Yeast Early Secretory Pathway through an Epistatic Miniarray Profile. *Cell* **123**, 507–519 (2005).
359. Breslow, D. K. *et al.* A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nat Methods* **5**, 711–718 (2008).
360. Gaber, R. F., Styles, C. A. & Fink, G. R. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 2848–2859 (1988).
361. Arino, J., Ramos, J. & Sychrova, H. Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 95–120 (2010).
362. Weisman, L. S., Bacallao, R. & Wickner, W. Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *J Cell Biol* **105**, 1539–1547 (1987).
363. Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A. & Stevens, T. H. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389–1402 (1992).
364. Kane, P. M. The Where, When, and How of Organelle Acidification by the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 177–191 (2006).
365. Graham, L. A. & Stevens, T. H. Assembly of the Yeast Vacuolar Proton-Translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 39–47 (1999).
366. Preston, R. A., Murphy, R. F. & Jones, E. W. Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *PNAS* **86**, (1989).
367. Zinser, E. *et al.* Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**, 2026–2034 (1991).
368. Schneider, R. *et al.* Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (Esi-MS/MS) Analysis of the Lipid Molecular Species Composition of Yeast Subcellular Membranes Reveals Acyl Chain-Based Sorting/Remodeling of Distinct Molecular Species En Route to the Plasma Membrane. *J Cell Biol* **146**, 741–754 (1999).
369. Katzmann, D. J., Odorizzi, G. & Emr, S. D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893–905 (2002).
370. Ozkaynak, E., Finley, D. & Varshavsky, A. The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* **312**, 663–666 (1984).
371. Pannunzio, V. G. *et al.* A Simple Chemical Method for Rendering Wild-Type Yeast Permeable to Brefeldin A That Does Not Require the Presence of an *erg6* Mutation. *J Biomed Biotechnol* **2004**, 150–155 (2004).
372. Kawamukai, M. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnol Appl Biochem* **53**, 217–226 (2009).
373. Hsieh, E. J. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch Biochem Biophys* **463**, 19–26 (2007).
374. Barrientos, A., Zambrano, A. & Tzagoloff, A. Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **23**, 3472–3482 (2004).
375. Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A. & Fox, T. D. Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific Translational Activator Proteins on the Inner Surface of the Mitochondrial Inner Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 324–333 (2003).
376. Carlson, C. G., Barrientos, A., Tzagoloff, A. & Glerum, D. M. COX16 Encodes a Novel Protein Required for the Assembly of Cytochrome Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 3770–3775 (2003).

377. Nobrega, M. P., Bandeira, S. C. B., Beers, J. & Tzagoloff, A. Characterization of COX19, a Widely Distributed Gene Required for Expression of Mitochondrial Cytochrome Oxidase. *J Biol Chem* **277**, 40206–40211 (2002).
378. Barros, M. H., Johnson, A. & Tzagoloff, A. COX23, a Homologue of COX17, Is Required for Cytochrome Oxidase Assembly. *J Biol Chem* **279**, 31943–31947 (2004).
379. Liu, J., Zhang, Y., Huang, D. & Song, G. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* **280**, 139–145 (2005).
380. Fabrizio, P. *et al.* SOD2 Functions Downstream of Sch9 to Extend Longevity in Yeast. *Genetics* **163**, 35–46 (2003).
381. Medvedik, O., Lammig, D. W., Kim, K. D. & Sinclair, D. A. MSN2 and MSN4 Link Calorie Restriction and TOR to Sirtuin-Mediated Lifespan Extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* **5**, e261 (2007).
382. Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Büttner, S., Tavernarakis, N. & Madeo, F. Necrosis in yeast. *Apoptosis* **15**, 257–268 (2010).
383. Mesquita, A. *et al.* Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *PNAS* **107**, 15123–15128 (2010).
384. Pan, Y., Schroeder, E. A., Ocampo, A., Barrientos, A. & Shadel, G. S. Regulation of Yeast Chronological Life Span by TORC1 via Adaptive Mitochondrial ROS Signaling. *Cell Metab* **13**, 668–678 (2011).
385. Bucana, C., Saiki, I. & Nayar, R. Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells. *J Histochem Cytochem* **34**, 1109–1115 (1986).
386. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335–344 (2003).
387. Rothe, G. & Valet, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* **47**, 440–448 (1990).
388. Büttner, G. R. & Jurkiewicz, B. A. Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. *Radiat Res* **145**, 532 (1996).
389. Pozniakovskiy, A. I. *et al.* Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* **168**, 257–269 (2005).
390. Chevtzoff, C. *et al.* Reactive Oxygen Species-mediated Regulation of Mitochondrial Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**, 1733–1742 (2010).
391. Guaragnella, N., Passarella, S., Marra, E. & Giannattasio, S. Knock-out of metacaspase and/or cytochrome c results in the activation of a ROS-independent acetic acid-induced programmed cell death pathway in yeast. *FEBS Lett* **584**, 3655–3660 (2010).
392. Büttner, S. *et al.* The Ca²⁺/Mn²⁺ ion-pump PMR1 links elevation of cytosolic Ca²⁺ levels to α -synuclein toxicity in Parkinson's disease models. *Cell Death Differ* **20**, 465–77 (2012).
393. Wattenberg, L. W. Protective effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyisole on chemical carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* **24**, 1099–1102 (1986).
394. Rikhvanov, E. G. *et al.* Do mitochondria regulate the heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*? *Curr Genet* **48**, 44–59 (2005).
395. Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J. & Reed, J. C. The Mitochondrial F₀F₁-ATPase Proton Pump Is Required for Function of the Proapoptotic Protein Bax in Yeast and Mammalian Cells. *Mol Cell* **1**, 327–336 (1998).
396. Rikhvanov, E. G., Varakina, N. N., Rusaleva, T. M., Rachenko, E. I. & Voinikov, V. K. The Effect of Sodium Malonate on Yeast Thermotolerance. *Microbiology* **72**, 548–552 (2003).
397. Machida, K., Tanaka, T., Fujita, K. & Taniguchi, M. Farnesol-Induced Generation of Reactive Oxygen Species via Indirect Inhibition of the Mitochondrial Electron Transport Chain in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **180**, 4460–4465 (1998).
398. Goldenthal, M. J. & Marín-García, J. Mitochondrial signaling pathways: A receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem* **262**, 1–16 (2004).
399. Kroemer, G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ* **4**, 443–456 (1997).
400. Skulachev, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* **11**, 473–485 (2006).
401. Eisenberg, T., Büttner, S., Kroemer, G. & Madeo, F. The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis* **12**, 1011–1023 (2007).
402. Johnson, L. V., Walsh, M. L., Bockus, B. J. & Chen, L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **88**, 526–535 (1981).
403. Korchak, H. M., Rich, A. M., Wilkenfeld, C., Rutherford, L. E. & Weissmann, G. A carbocyanine dye, DiOC₆(3), acts as a mitochondrial probe in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* **108**, 1495–1501 (1982).
404. Machida, K. & Tanaka, T. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F₀F₁-ATPase in yeast. *FEBS Lett* **462**, 108–112 (1999).
405. Chen, L. B. in *Methods in Cell Biology* (Yu-Li Wang, D. L. T. and K. W. J.) **Volume 29**, 103–123 (Academic Press, 1988).
406. Terasaki, M. & Reese, T. S. Characterization of endoplasmic reticulum by co-localization of BiP and dicarbocyanine dyes. *J Cell Sci* **101**, 315–322 (1992).
407. Koning, A. J., Lum, P. Y., Williams, J. M. & Wright, R. DiOC₆ staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**, 111–128 (1993).
408. Mousley, C. J. *et al.* Trans-Golgi Network and Endosome Dynamics Connect Ceramide Homeostasis with Regulation of the Unfolded Protein Response and TOR Signaling in Yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 4785–4803 (2008).
409. Cox, J. S. & Walter, P. A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell* **87**, 391–404 (1996).
410. Merksamer, P. I., Trusina, A. & Papa, F. R. Real-Time Redox Measurements during Endoplasmic Reticulum Stress Reveal Interlinked Protein Folding Functions. *Cell* **135**, 933–947 (2008).
411. Uren, A. G. *et al.* Identification of Paracaspases and Metacaspases: Two Ancient Families of Caspase-like Proteins, One of which Plays a Key Role in MALT Lymphoma. *Mol Cell* **6**, 961–967 (2000).
412. Pereira, C. *et al.* Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 1286–1302 (2008).
413. Dolle, R. E. *et al.* P1 Aspartate-Based Peptide .alpha.-((2,6-Dichlorobenzoyl)oxy)methyl Ketones as Potent Time-Dependent Inhibitors of Interleukin-1.beta.-Converting Enzyme. *J Med Chem* **37**, 563–564 (1994).
414. Vercammen, D., Declercq, W., Vandenebeele, P. & Van Breusegem, F. Are metacaspases caspases? *J Cell Biol* **179**, 375–380 (2007).
415. Váchová, L. & Palková, Z. Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts. *FEMS Yeast Res* **7**, 12–21 (2007).
416. Carmona-Gutierrez, D., Fröhlich, K.-U., Kroemer, G. & Madeo, F. Metacaspases are caspases. Doubt no more. *Cell Death Differ* **17**, 377–378 (2010).
417. Enoksson, M. & Salvesen, G. S. Metacaspases are not caspases –

- always doubt. *Cell Death Differ* **17**, 1221–1221 (2010).
418. Rine, J., Hansen, W., Hardeman, E. & Davis, R. W. Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects. *PNAS* **80**, 6750–6754 (1983).
419. Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. & Tzagoloff, A. Yeast *E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163–167 (1986).
420. Engebrecht, J., Hirsch, J. & Roeder, G. S. Meiotic gene conversion and crossing over: Their relationship to each other and to chromosome synapsis and segregation. *Cell* **62**, 927–937 (1990).
421. Clarke, L. & Carbon, J. A colony bank containing synthetic CoI EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**, 91–99 (1976).
422. Inadome, H., Noda, Y., Kamimura, Y., Adachi, H. & Yoda, K. Tvp38, Tvp23, Tvp18 and Tvp15: Novel membrane proteins in the Tlg2-containing Golgi/endosome compartments of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* **313**, 688–697 (2007).
423. Albert, Š. & Gallwitz, D. Two New Members of a Family of Ypt/Rab GTPase Activating Proteins. Promiscuity of substrate recognition. *J Biol Chem* **274**, 33186–33189 (1999).
424. Poirey, R. *et al.* Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* DUP240 multigene family reveals membrane-associated proteins that are not essential for cell viability. *Microbiology* **148**, 2111–2123 (2002).
425. Sandmann, T., Herrmann, J. M., Dengjel, J., Schwarz, H. & Spang, A. Suppression of Coatomer Mutants by a New Protein Family with COPI and COPII Binding Motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 3097–3113 (2003).
426. Marzioch, M. *et al.* Erp1p and Erp2p, Partners for Emp24p and Erv25p in a Yeast p24 Complex. *Mol Biol Cell* **10**, 1923–1938 (1999).
427. Kean, L. S., Fuller, R. S. & Nichols, J. W. Retrograde lipid traffic in yeast: identification of two distinct pathways for internalization of fluorescent-labeled phosphatidylcholine from the plasma membrane. *J Cell Biol* **123**, 1403–1419 (1993).
428. Hanson, P. K., Grant, A. M. & Nichols, J. W. NBD-labeled phosphatidylcholine enters the yeast vacuole via the pre-vacuolar compartment. *J Cell Sci* **115**, 2725–2733 (2002).
429. Nichols, J. W. Internalization and trafficking of fluorescent-labeled phospholipids in yeast. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 179–184 (2002).
430. Beh, C. T., McMaster, C. R., Kozminski, K. G. & Menon, A. K. A Detour for Yeast Oxysterol Binding Proteins. *J Biol Chem* **287**, 11481–11488 (2012).
431. Tamaki, H. *et al.* LPT1 Encodes a Membrane-bound O-Acyltransferase Involved in the Acylation of Lysophospholipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**, 34288–34298 (2007).
432. Pichler, H. *et al.* A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* **268**, 2351–2361 (2001).
433. Schreve, J. L. & Garrett, J. M. Yeast Agp2p and Agp3p function as amino acid permeases in poor nutrient conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 745–751 (2004).
434. Roermund, C. W. T. van, Hettema, E. H., Berg, M. van den, Tabak, H. F. & Wanders, R. J. A. Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *EMBO J* **18**, 5843–5852 (1999).
435. Aouida, M., Leduc, A., Poulin, R. & Ramotar, D. AGP2 Encodes the Major Permease for High Affinity Polyamine Import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 24267–24276 (2005).
436. Aouida, M., Pagé, N., Leduc, A., Peter, M. & Ramotar, D. A Genome-Wide Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Altered Transport As a Mechanism of Resistance to the Anticancer Drug Bleomycin. *Cancer Res* **64**, 1102–1109 (2004).
437. Kennedy, M. A. *et al.* Srf1 Is a Novel Regulator of Phospholipase D Activity and Is Essential to Buffer the Toxic Effects of C16:0 Platelet Activating Factor. *PLoS Genet* **7**, e1001299 (2011).
438. Thornton, B. R. & Toczyski, D. P. Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* **20**, 3069–3078 (2006).
439. Buschhorn, B. A. *et al.* Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 6–13 (2011).
440. Vink, S. R., van der Luit, A. H., Klarenbeek, J. B., Verheij, M. & van Blitterswijk, W. J. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **74**, 1456–1465 (2007).
441. Van der Luit, A. H. *et al.* Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated sphingomyelin synthase 1 expression with consequent sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts. *Biochem J* **401**, 541 (2007).
442. Dinter, A. & Berger, E. G. Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* **109**, 571–590 (1998).
443. Wang, L. H., Rothberg, K. G. & Anderson, R. G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**, 1107–1117 (1993).
444. Nicoziani, P. *et al.* Role for Dynamin in Late Endosome Dynamics and Trafficking of the Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor. *Mol Biol Cell* **11**, 481–495 (2000).
445. Zeng, G., Yu, X. & Cai, M. Regulation of Yeast Actin Cytoskeleton-Regulatory Complex Pan1p/Slp1p/End3p by Serine/Threonine Kinase Prk1p. *Mol Biol Cell* **12**, 3759–3772 (2001).
446. Wendland, B., Steece, K. E. & Emr, S. D. Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. *EMBO J* **18**, 4383–4393 (1999).
447. Stolz, L. E., Huynh, C. V., Thorner, J. & York, J. D. Identification and Characterization of an Essential Family of Inositol Polyphosphate 5-Phosphatases (INP51, INP52 and INP53 Gene Products) in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**, 1715–1729 (1998).
448. Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J. & Alessi, D. R. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* **9**, 186–S4 (1999).
449. Youn, J.-Y. *et al.* Dissecting BAR Domain Function in the Yeast Amphiphysins Rvs161 and Rvs167 during Endocytosis. *Mol Biol Cell* **21**, 3054–3069 (2010).
450. Goodman, A., Goode, B. L., Matsudaira, P. & Fink, G. R. The *Saccharomyces cerevisiae* Calponin/Transgelin Homolog Scp1 Functions with Fimbrin to Regulate Stability and Organization of the Actin Cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **14**, 2617–2629 (2003).
451. Wang, P. C., Vancura, A., Mitcheson, T. G. & Kuret, J. Two genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode a membrane-bound form of casein kinase-1. *Mol Biol Cell* **3**, 275–286 (1992).
452. Baggett, J. J. & Wendland, B. Clathrin Function in Yeast Endocytosis. *Traffic* **2**, 297–302 (2001).
453. Kaksonen, M., Toret, C. P. & Drubin, D. G. A Modular Design for the Clathrin- and Actin-Mediated Endocytosis Machinery. *Cell* **123**, 305–320 (2005).
454. Prosser, D. C., Drivas, T. G., Maldonado-Báez, L. & Wendland, B. Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J Cell Biol* **195**, 657–671 (2011).
455. Orij, R., Postmus, J., Beek, A. T., Brul, S. & Smits, G. J. In vivo

- measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* **155**, 268–278 (2009).
456. Calahorra, M., Martínez, G. A., Hernández-Cruz, A. & Peña, A. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* **14**, 501–515 (1998).
457. Lesage, P., Yang, X. & Carlson, M. Analysis of the SIP3 protein identified in a two-hybrid screen for interaction with the SNF1 protein kinase. *Nucl Acids Res* **22**, 597–603 (1994).
458. Portillo, F., Mulet, J. M. & Serrano, R. A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Lett* **579**, 512–516 (2005).
459. Young, B. P. *et al.* Phosphatidic Acid Is a pH Biosensor That Links Membrane Biogenesis to Metabolism. *Science* **329**, 1085–1088 (2010).
460. Portillo, F. & Serrano, R. Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem* **186**, 501–507 (1989).
461. McCusker, J. H., Perlin, D. S. & Haber, J. E. Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 4082–4088 (1987).
462. Serrano, R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* **156**, 11–14 (1983).
463. Luo, Z. & Gallwitz, D. Biochemical and Genetic Evidence for the Involvement of Yeast Ypt6-GTPase in Protein Retrieval to Different Golgi Compartments. *J Biol Chem* **278**, 791–799 (2003).
464. Ali, R., Brett, C. L., Mukherjee, S. & Rao, R. Inhibition of Sodium/Proton Exchange by a Rab-GTPase-activating Protein Regulates Endosomal Traffic in Yeast. *J Biol Chem* **279**, 4498–4506 (2004).
465. Woolford, C. A. *et al.* The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2500–2510 (1986).
466. Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. & Pelham, H. R. B. Specific Retrieval of the Exocytic SNARE Snc1p from Early Yeast Endosomes. *Mol Biol Cell* **11**, 23–38 (2000).
467. Rieder, S. E., Banta, L. M., Köhrer, K., McCaffery, J. M. & Emr, S. D. Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell* **7**, 985–999 (1996).
468. Proszynski, T. J. *et al.* A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *PNAS* **102**, 17981–17986 (2005).
469. Mayor, S., Presley, J. F. & Maxfield, F. R. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J Cell Biol* **121**, 1257–1269 (1993).
470. Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 121–132 (2004).
471. Nikko, E., Marini, A.-M. & André, B. Permease Recycling and Ubiquitination Status Reveal a Particular Role for Bro1 in the Multivesicular Body Pathway. *J Biol Chem* **278**, 50732–50743 (2003).
472. Bugnicourt, A. *et al.* Antagonistic Roles of ESCRT and Vps Class C/HOPS Complexes in the Recycling of Yeast Membrane Proteins. *Mol Biol Cell* **15**, 4203–4214 (2004).
473. Chang, A. & Fink, G. R. Targeting of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase: a novel gene AST1 prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole. *J Cell Biol* **128**, 39–49 (1995).
474. Pizzirusso, M. & Chang, A. Ubiquitin-mediated Targeting of a Mutant Plasma Membrane ATPase, Pma1-7, to the Endosomal/Vacuolar System in Yeast. *Mol Biol Cell* **15**, 2401–2409 (2004).
475. Yashiroda, H., Kaida, D., Toh-e, A. & Kikuchi, Y. The PY-motif of Bul1 protein is essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various stress conditions. *Gene* **225**, 39–46 (1998).
476. Hettema, E. H., Valdez-Taubas, J. & Pelham, H. R. B. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J* **23**, 1279–1288 (2004).
477. Luo, W. & Chang, A. Novel Genes Involved in Endosomal Traffic in Yeast Revealed by Suppression of a Targeting-defective Plasma Membrane ATPase Mutant. *J Cell Biol* **138**, 731–746 (1997).
478. Luo, W. & Chang, A. An Endosome-to-Plasma Membrane Pathway Involved in Trafficking of a Mutant Plasma Membrane ATPase in Yeast. *Mol Biol Cell* **11**, 579–592 (2000).
479. Wang, Q. & Chang, A. Sphingoid base synthesis is required for oligomerization and cell surface stability of the yeast plasma membrane ATPase, Pma1. *PNAS* **99**, 12853–12858 (2002).
480. Dupré, S. & Haguenuer-Tsapis, R. Raft Partitioning of the Yeast Uracil Permease During Trafficking Along the Endocytic Pathway. *Traffic* **4**, 83–96 (2003).
481. Gong, X. & Chang, A. A mutant plasma membrane ATPase, Pma1-10, is defective in stability at the yeast cell surface. *PNAS* **98**, 9104–9109 (2001).
482. Liu, Y. & Chang, A. Quality control of a mutant plasma membrane ATPase: ubiquitylation prevents cell-surface stability. *J Cell Sci* **119**, 360–369 (2006).
483. Butow, R. A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial Signaling: The Retrograde Response. *Mol Cell* **14**, 1–15 (2004).
484. Hallstrom, T. C. & Moye-Rowley, W. S. Multiple Signals from Dysfunctional Mitochondria Activate the Pleiotropic Drug Resistance Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 37347–37356 (2000).
485. Eisenberg, T., Büttner, S., Kroemer, G. & Madeo, F. The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis* **12**, 1011–1023 (2007).
486. Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P. & Rojo, M. Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 558–565 (2010).
487. Baker Brachmann, C. *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115–132 (1998).
488. Huh, W.-K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691 (2003).
489. Güldener, U. & Hegemann, J. H. A second generation of GFP-vectors for subcellular localization studies in budding yeast. at <<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/yeast/info/tools/hegemann/gfp.html>>
490. Han, G.-S., O'Hara, L., Carman, G. M. & Siniosoglou, S. An unconventional diacylglycerol kinase that regulates phospholipid synthesis and nuclear membrane growth. *J Biol Chem* **283**, 20433–20442 (2008).
491. Balguerie, A., Bagnat, M., Bonneau, M., Aigle, M. & Breton, A. M. Rvs161p and Sphingolipids Are Required for Actin Repolarization following Salt Stress. *Eukaryot Cell* **1**, 1021–1031 (2002).
492. Daniel Gietz, R. & Woods, R. A. in *Methods in Enzymology* (Christine Guthrie and Gerald R. Fink) **Volume 350**, 87–96 (Academic Press, 2002).
493. Robzyk, K. & Kassir, Y. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucl Acids Res* **20**, 3790 (1992).

Tablas suplementarias

Las tablas presentadas a continuación recogen los resultados de los tres *screenings* realizados empleando la colección de cepas KO. Las siguientes abreviaturas se emplean en las tablas. Res: resistencia; Sens: sensibilidad; M: mitocondria; RE: retículo endoplásmico; V: vacuola; N: núcleo; C: citoplasma; R: ribosoma; AG: aparato de Golgi; MP: membrana plasmática.

Tabla supl. 1: mutantes resistentes a edelfosina.

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|---------------|---|--------------------------|
| +++ | <i>AGP2</i> | Transporte aminoácidos, carnitina, poliaminas | MP, RE, V membrana |
| +++ | <i>AGP3</i> | Transporte de aminoácidos | MP |
| +++ | <i>AIM10</i> | ? | M |
| +++ | <i>AIM25</i> | ? | M |
| +++ | <i>ATP25</i> | Transporte vesicular | M |
| +++ | <i>ATP5</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATP sintasa | M |
| +++ | <i>ATP7</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATP sintasa | M |
| +++ | <i>BSD2</i> | Transporte de metales, regulación | RE, V |
| +++ | <i>BUD26</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | <i>CAF130</i> | Transcripción y degradación RNAm, complejo CCR4-Not | C |
| +++ | <i>CDH1</i> | Complejo promotor de la anafase, ciclo celular | N |
| +++ | <i>COX23</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M, espacio intermembrana |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------|--|---------------------|
| +++ | <i>COX6</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M |
| +++ | <i>CPR3</i> | Plegamiento de proteínas | M |
| +++ | <i>CST6</i> | Factor de Factor de transcripción, fuente de carbono | N |
| +++ | <i>DIA4</i> | aminoacil-RNAt sintasa, serina | M |
| +++ | <i>DIT1</i> | Esporulación | ? |
| +++ | <i>DJP1</i> | Transporte de proteínas, chaperona HSP40, proteínas peroxisomales | C |
| +++ | <i>DOA4</i> | Complejo ESCRT III | E |
| +++ | <i>DOC1</i> | Complejo promotor de la anafase, ciclo celular | N |
| +++ | <i>DOT5</i> | Respuesta a estrés oxidativo, homeostasis redox, cambio diáuxico | N |
| +++ | <i>EAF6</i> | Histona acetilasa | N |
| +++ | <i>ECM22</i> | Factor de transcripción, biosíntesis de esteroides | N |
| +++ | <i>EGD2</i> | Transporte de proteínas | R, C |
| +++ | <i>GAT1</i> | Factor de Factor de transcripción, represión catabolitos nitrógeno | C, N |
| +++ | <i>GEM1</i> | Mitocondria, organización | M, membrana externa |
| +++ | <i>GPM3</i> | Glicólisis | C |
| +++ | <i>GUP2</i> | Transporte de glicerol | MP |
| +++ | <i>HMI1</i> | Mantenimiento del ADN | M |
| +++ | <i>IMG2</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>IRC19</i> | Esporulación | ? |
| +++ | <i>KTR7</i> | Glicosilación de proteínas | AG |
| +++ | <i>LEM3</i> | Tranlocación de fosfolípidos | MP, RE |
| +++ | <i>MCA1</i> | Apoptosis | N |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|---------------|--|----------------------|
| +++ | <i>MLP1</i> | Transporte de proteínas, exportación del núcleo | N, envoltura nuclear |
| +++ | <i>MRP21</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MRP7</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MRPL10</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MRPL33</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MRPL35</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MRPL38</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MRPS8</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MSR1</i> | aminoacil-RNAt sintasa, arginina | M |
| +++ | <i>MTF1</i> | Transcripción | M |
| +++ | <i>NRG2</i> | Transcripción, crecimiento pseudohifal | N |
| +++ | <i>PAT1</i> | Transcripción, segregación cromosómica | R, C |
| +++ | <i>PKP2</i> | Piruvato deshidrogenasa | M |
| +++ | <i>PLB2</i> | Metabolismo lipídico, lisofosfolipasa | Pared celular |
| +++ | <i>POC4</i> | Proteasoma, ensamblaje | C |
| +++ | <i>PPT1</i> | Ser/Thr fosfatasa | C, N |
| +++ | <i>RAD18</i> | Reparación ADN, ubiquitina-ligasa | N |
| +++ | <i>RAD57</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>RCN1</i> | Calcineurina, regulación | C |
| +++ | <i>RHO4</i> | Citoesqueleto de actina, organizacion, polaridad celular | C |
| +++ | <i>RLM1</i> | Biogénesis y organización de la pared celular, ruta MAPK | N |
| +++ | <i>RPL37B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| +++ | <i>RPL42A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | C |
| +++ | <i>RPL8B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| +++ | <i>RPN14</i> | Proteasoma | C |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------|--|---------------|
| +++ | <i>RPS8A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | Citosol, R |
| +++ | <i>RRG9</i> | Mantenimiento del ADN | M |
| +++ | <i>RSM19</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>RSM25</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>RSM7</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>SEM1</i> | Proteasoma | C, proteasoma |
| +++ | <i>SET3</i> | Histona deacetilasa | N |
| +++ | <i>SSA3</i> | Respuesta a estrés, plegamiento de proteínas | C |
| +++ | <i>STO1</i> | Transcripción, transporte y degradación RNAm | N |
| +++ | <i>SUB1</i> | Transcripción | N |
| +++ | <i>SUT2</i> | Transcripción, transporte de esteroides | N |
| +++ | <i>SVP26</i> | Transporte vesicular, RE al AG | RE, AG |
| +++ | <i>SWF1</i> | Palmitoilación de proteínas, transporte retrógrado | RE |
| +++ | <i>TUF1</i> | Biosíntesis de proteínas | M |
| +++ | <i>UFD4</i> | Proteasoma | C |
| +++ | <i>VPS35</i> | Transporte retrógrado, retrómero | E |
| +++ | YBR099C | ? | ? |
| +++ | YBR246W | ? | ? |
| +++ | YDL062W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YDL063C | ? | C, N |
| +++ | YDL118W | ? | ? |
| +++ | YDR114C | ? | ? |
| +++ | YDR161W | ? | C, N |
| +++ | YDR417C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | <i>YGP1</i> | ? | Pared celular |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|-----------|--|---------------------------|
| +++ | YJL185C | ? | ? |
| +++ | YLH47 | ? | M |
| +++ | YMR084W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YNL184C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YNL228W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YRA2 | Traducción, exportación del ARNm del núcleo | N |
| +++ | YTA12 | Degradación de proteínas mal plegadas | M |
| ++ | ALO1 | Respuesta a estrés oxidativo | M |
| ++ | BRO1 | Complejo ESCRT III | E, C |
| ++ | BUL2 | Ubiquitinación de proteínas | C |
| ++ | CSN9 | De-neddilación de proteínas | C, signalosome |
| ++ | DID4/VPS2 | Complejo ESCRT III | E |
| ++ | DNF2 | Translocación de fosfolípidos | MP |
| ++ | DNM1 | Mitocondria, organización y biogénesis | M |
| ++ | DRS2 | Translocación de fosfolípidos | AG, trans-AG |
| ++ | EDC3 | Transcripción, procesado ARNm | C |
| ++ | END3 | Endocitosis, organización esqueleto actina | Parche cortical de actina |
| ++ | EXO1 | Reparación ADN | N |
| ++ | HIS2 | Biosíntesis histidina | C |
| ++ | HPC2 | Remodelado de cromatina, ciclo celular | N |
| ++ | ISC1 | Metabolismo esfingolípidos, producción de ceramida, respuesta a estrés | RE, M membrana externa |
| ++ | MDM38 | Mitocondria, organización y biogénesis | M, membrana interna |
| ++ | MGM101 | Reparación ADN | M |
| ++ | MLH1 | Reparación ADN | N |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|------------|---|--------------|
| ++ | MRP20 | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| ++ | MRPL11 | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| ++ | MRT4 | Ribosoma, biogénesis | Nucleolo |
| ++ | MSB1 | Biogénesis de la pared celular, vía de las MAPK | M, yema |
| ++ | MSF1 | aminoacil-RNAt sintasa, fenilalanina | M |
| ++ | MSH2 | Reparación ADN | N |
| ++ | MSY1 | aminoacil-RNAt sintasa, tirosina | M |
| ++ | NOT5 | Transcripción, complejo CCR4-Not | C |
| ++ | NST1 | Respuesta a estrés | C |
| ++ | PDE2 | señalización por cAMP | C, N |
| ++ | PEP8/VPS26 | Transporte retrógrado | E |
| ++ | PET8 | Transporte S-adenosilmetionina, respiración | M |
| ++ | PMS1 | Reparación ADN | N |
| ++ | RAD14 | Reparación ADN | N |
| ++ | RBS1 | ? | C |
| ++ | RPL19A | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| ++ | RPL1B | Biosíntesis proteica | R, C |
| ++ | RPL21A | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| ++ | RPL23A | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal, HSP70 chaperona | R, C |
| ++ | RPL6B | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| ++ | RPN4 | Proteasoma, factor de transcripción | N |
| ++ | SGF11 | Regulación de histonas | N |
| ++ | SIR3 | Silenciamiento loci apareamiento, sensibilidad a feromona | N |
| ++ | SIR4 | Silenciamiento loci apareamiento, sensibilidad a feromona | N |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|-------------------|--|-----------------------|
| ++ | <i>SLM3</i> | Traducción, modificación RNAt, 2-tiouridilasa | M |
| ++ | <i>SPO7</i> | Organización nuclear, fosfatasa | RE |
| ++ | <i>SRN2/VPS37</i> | Complejo ESCRT I | E |
| ++ | <i>SSM4</i> | Degradación de proteínas asociada al RE | RE, envoltura nuclear |
| ++ | <i>STE24</i> | Pheromona, maduración, metaloproteasa | RE |
| ++ | <i>SXM1</i> | Transporte de proteínas al núcleo | N |
| ++ | <i>TGS1</i> | Ribosoma, maduración del ARN | Nucleolo |
| ++ | <i>TIR2</i> | Respuesta a estrés | Pared celular |
| ++ | <i>TMA22</i> | ? | R, C |
| ++ | <i>TOM1</i> | Regulación de histonas | N |
| ++ | <i>UAF30</i> | Transcripción | N |
| ++ | <i>UBP8</i> | De-ubiquitinación de proteínas | N, complejo SAGA |
| ++ | <i>ULA1</i> | Nedilación de proteínas | ? |
| ++ | <i>VAM10</i> | Transporte vesicular, fusión vacuolar | V, membrana |
| ++ | <i>VPS17</i> | Transporte retrógrado | E |
| ++ | <i>VPS24</i> | Complejo ESCRT III | E |
| ++ | <i>VPS27</i> | Complejo ESCRT 0 | E |
| ++ | <i>VPS29</i> | Transporte retrógrado | E |
| ++ | <i>VPS3</i> | Complejo CORVET | C |
| ++ | <i>VPS4</i> | Complejo ESCRT III | E |
| ++ | <i>VPS52</i> | Transporte retrógrado, garp complex, cvt pathway | AG |
| ++ | <i>YCR061W</i> | ? | C |
| ++ | <i>YDR042C</i> | ? | ? |
| ++ | <i>YDR442W</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| ++ | <i>YHC3</i> | pH homeostasis | V |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|----------------|---|---------------------|
| ++ | <i>YNL171C</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| ++ | <i>YNR004W</i> | ? | Nucleolo |
| ++ | <i>YNR005C</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| ++ | <i>YPL080C</i> | ? | ? |
| ++ | <i>YPS7</i> | Pared celular, yapsina | RE, C |
| ++ | <i>YSY6</i> | Secreción de proteínas | RE |
| + | <i>AAT2</i> | Metabolismo del nitrógeno | C, peroxisoma |
| + | <i>ACE2</i> | Factor de Factor de transcripción, ciclo celular (G1) | N, C |
| + | <i>ADD66</i> | Proteasoma, ensamblaje | C |
| + | <i>ADH3</i> | Metabolismo de etanol | M |
| + | <i>AEP2</i> | Fosforilación oxidativa, traducción FoF1-ATP sintasa | M |
| + | <i>ALG6</i> | Glicosilación de proteínas | RE |
| + | <i>ALG8</i> | Glicosilación de proteínas | RE |
| + | <i>APJ1</i> | Plegamiento de proteínas, putativa chaperona HSP40 | M |
| + | <i>ARX1</i> | Ribosoma, biogénesis y ensamblaje | C |
| + | <i>ATG26</i> | Síntesis de glucoesteros de la MP | C |
| + | <i>ATP14</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATP sintasa | M |
| + | <i>ATP18</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATP sintasa | M |
| + | <i>ATP20</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1 sintasa | M |
| + | <i>ATP23</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATPsintasa, ensamblaje | M, membrana interna |
| + | <i>ATP4</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATP sintasa | M |
| + | <i>BGL2</i> | Biogénesis y organización de la pared celular | Pared celular |
| + | <i>BLM10</i> | Proteasoma, ensamblaje y activación | N, proteasoma |
| + | <i>BUD17</i> | Selección sitio gemación | C, N |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------|---|--------------------------------------|
| + | <i>CAT5</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M |
| + | <i>CBS2</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal, activador RNAm Citocromo B | R, M |
| + | <i>CCZ1</i> | Transporte vesicular | E |
| + | <i>CNM67</i> | Chromosome segregation, Spindle orientation and mitotic nuclear migration | N |
| + | <i>COQ3</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M, membrana interna |
| + | <i>COQ6</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M |
| + | <i>COQ9</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M |
| + | <i>COX16</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M, membrana interna |
| + | <i>COX19</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M, C |
| + | <i>CSI1</i> | De-nedilación de proteínas | Signalosome |
| + | <i>CYT1</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M |
| + | <i>DIA1</i> | Crecimiento pseudohifal | C |
| + | <i>DID2</i> | Complejo ESCRT III | E |
| + | <i>EMI1</i> | ? | ? |
| + | <i>GCN2</i> | Fosforilación de proteínas, traducción | R, C |
| + | <i>GIM5</i> | Plegamiento de tubulina, complejo prefoldina | C |
| + | <i>GLO3</i> | Transporte retrógrado, Golgi al RE | AG |
| + | <i>GYP6</i> | Tranporte vesicular | E, vesículas recubiertas de clatrina |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|---------------|--|---------------------------|
| + | <i>HDA2</i> | Histona deacetilasa | N |
| + | <i>IFM1</i> | Traducción, iniciación | M |
| + | <i>INH1</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATP sintasa, regulación | M |
| + | <i>KEX1</i> | Feromona, maduración (carboxipeptidasa) | AG, trans-AG |
| + | <i>KEX2</i> | Feromona, maduración, serina proteasa | AG |
| + | <i>KNH1</i> | Biosíntesis pared celular | Pared celular |
| + | <i>LCB3</i> | Biosíntesis esfingolípidos | RE |
| + | <i>LDB17</i> | Endocitosis | |
| + | <i>LIN1</i> | Transcripción, splicing | N |
| + | <i>MFA2</i> | Feromona factor-a | Extracelular |
| + | <i>MKS1</i> | Represión de catabolitos nitrógeno, señalización retrógrada mitocondria-núcleo | C |
| + | <i>MOG1</i> | Transporte de proteínas al núcleo | N |
| + | <i>MRPL15</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| + | <i>MSH1</i> | Reparación ADN | M |
| + | <i>MSN2</i> | Factor de transcripción, respuesta a estrés | C, N |
| + | <i>MSS51</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M |
| + | <i>MYO5</i> | Endocitosis, organización citoesqueleto de actina | Parche cortical de actina |
| + | <i>NOP12</i> | Ribosome, biogenesis, metabolismo RNAr | Nucleolo |
| + | <i>NUP170</i> | Transporte de proteínas del/al núcleo | N, poro nuclear |
| + | <i>OPI8</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| + | <i>PBA1</i> | Proteasoma, ensamblaje | C |
| + | <i>PET122</i> | Fosforilación oxidativa, traducción mitocondrial | M |
| + | <i>PML39</i> | ?; marco de lectura dudoso. | N, poro nuclear |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------------|--|-------------------------------------|
| + | <i>PMT2</i> | Glicosilación de proteínas | RE |
| + | <i>POR1/VDAC</i> | Transportador, canal de aniones dependiente de voltaje | M |
| + | <i>PPA2</i> | Respiración, pirofosfatasa | M |
| + | <i>PTC6/AUP1</i> | Mitocondria, mitofagia, regulación del número | M |
| + | <i>PTC7</i> | Ser/Thr fosfatasa | M |
| + | <i>RCY1</i> | Transporte retrógrado, reciclaje proteínas MP, endocitosis | E, sitios de crecimiento polarizado |
| + | <i>RPL33B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| + | <i>RPL37A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| + | <i>RPL9B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal, traducción | R, C |
| + | <i>RPO41</i> | Transcripción mitocondrial | M |
| + | <i>RRI2/CSN10</i> | De-nedilación de proteínas | Siganolosome |
| + | <i>RUB1</i> | Nedilación de proteínas | C |
| + | <i>SIR1</i> | Silenciamiento loci apareamiento, sensibilidad a feromona | N |
| + | <i>SKG3</i> | ? | Bud |
| + | <i>SNX4</i> | Transporte retrógrado, autofagia, ruta CVT | E |
| + | <i>SNX42/ATG20</i> | Transporte retrógrado, autofagia, ruta CVT | E |
| + | <i>SOV1</i> | ? | M |
| + | <i>SSF1</i> | Ribosoma, maduración subunidad mayor | Nucleolo |
| + | <i>STP22/VPS23</i> | Complejo ESCRT I | E |
| + | <i>TLG2</i> | Transporte retrogrado, complejo GARP | AG, E |
| + | <i>TMA23</i> | Ribosoma, biogenesis | Nucleolo |
| + | <i>UBP2</i> | Complejo ESCRT III | C |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|----------------|---|---------------------|
| + | <i>UBS1</i> | Exportación de proteínas desde el núcleo | N |
| + | <i>ULS1</i> | Degradación de proteínas sumoiladas | N |
| + | <i>UTH1</i> | Mitocondria, morfología, mitofagia | M, membrana externa |
| + | <i>VPS1</i> | Transporte vesicular | C |
| + | <i>VPS20</i> | Complejo ESCRT III | E |
| + | <i>VPS8</i> | Complejo CORVET | E |
| + | <i>VPS9</i> | Transporte vesicular, incorporación de proteínas a la vacuola | C |
| + | <i>YAP7</i> | Factor de transcripción | N |
| + | <i>YDR065W</i> | Acidificación vacuolar | M |
| + | <i>YLL044W</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| + | <i>YLR202C</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| + | <i>YML082W</i> | Metabolismo de sulfuro (predicho) | C, N |
| + | <i>YML108W</i> | ? | C, N |
| + | <i>YNL050C</i> | ? | ? |
| + | <i>YNL170W</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| + | <i>YOR186W</i> | ? | ? |
| + | <i>YPT7</i> | Transporte vesicular | C |
| + | <i>YTA7</i> | Regulación histonas | N |

Tabla supl. 2: mutantes sensibles a edelfosina.

| Sens | Gen | Función celular | Localización |
|------|--------------------|-----------------------------------|--------------|
| +++ | <i>BEM1</i> | Organización y biogénesis celular | yema |
| +++ | <i>HTA3 (HTZ1)</i> | Remodelado de cromatina | N |
| +++ | <i>SIN3</i> | Remodelado de cromatina | M-N |
| +++ | <i>SNF2</i> | Remodelado de cromatina | N |
| +++ | <i>SNF6</i> | Remodelado de cromatina | N |

| Sens | Gen | Función celular | Localización |
|------|--------------|---|------------------------|
| +++ | YJL175W | Remodelado de cromatina | probablemente SWI3 (N) |
| +++ | SIP3 | Homeostasis energética | N |
| +++ | SNF1 | Homeostasis energética | N, M, V, C |
| +++ | ERG3 | Metabolismo lipídico | RE |
| +++ | AFG3 | Fosforilación de proteínas | M |
| +++ | DBF2 | Fosforilación de proteínas | yema, C |
| +++ | GAL11 | Transcripción | N |
| +++ | PGD1 | Transcripción | N |
| +++ | SPT7 | Transcripción | N, M |
| +++ | REI1 | Traducción | C, R |
| +++ | VMA16 (PPA1) | ATPasa vacuolar | V |
| +++ | VMA2 | ATPasa vacuolar | V |
| +++ | VMA4 | ATPasa vacuolar | V |
| +++ | VMA5 | ATPasa vacuolar | V |
| +++ | VMA9 | ATPasa vacuolar | V |
| +++ | VPH2 (VMA12) | ATPasa vacuolar, ensamblaje | RE |
| ++ | BIM1 | Organización y biogénesis celular | microtúbulos |
| ++ | NAP1 | Remodelado de cromatina | N, C |
| ++ | PAA1 | Remodelado de cromatina | C |
| ++ | SNF5 | Remodelado de cromatina | N |
| ++ | COX17 | Citocromo C, ensamblaje | M, N? |
| ++ | SHY1 | Citocromo C, ensamblaje | M |
| ++ | CYC2 | Citocromo C, regulación | M |
| ++ | SNF4 | Homeostasis energética | N, PM, C |
| ++ | SPF1 | Transporte de iones (ATPasa de clase P) | RE, M |

| Sens | Gen | Función celular | Localización |
|------|--------------|-------------------------------|--|
| ++ | ETR1 | Metabolismo lipídico | M, N |
| ++ | FEN1 | Metabolismo lipídico | RE |
| ++ | LIP5 | Metabolismo lipídico | M |
| ++ | PDA1 | Metabolismo lipídico | M |
| ++ | SPO14 | Metabolismo lipídico | E? |
| ++ | SUR4 | Metabolismo lipídico | RE |
| ++ | YBR178W | Metabolismo lipídico | probablemente EHT1 (M, partícula lipídica) |
| ++ | SER1 | Metabolismo lipídico | C |
| ++ | TRK1 | Transporte de iones | PM |
| ++ | DOA1 | Degradación de proteínas | N, C |
| ++ | UBP6 | Degradación de proteínas | N, C |
| ++ | DEF1 | Degradación de proteínas | N, C |
| ++ | AKR1 | Palmitoilación de proteínas | AG |
| ++ | VPS15 | Desfosforilación de proteínas | AG, M, E |
| ++ | RPB4 | Transcripción | N |
| ++ | SRB2 | Transcripción | N, C |
| ++ | SWI6 | Transcripción | N, C |
| ++ | YDR521W | Transcripción | probablemente YDR520C (N) |
| ++ | ASC1 | Traducción | C, R |
| ++ | VMA10 | ATPasa vacuolar | V |
| ++ | VMA11 (TFP3) | ATPasa vacuolar | V, RE |
| ++ | VMA21 | ATPasa vacuolar, ensamblaje | V |
| ++ | SEC22 | Transporte vesicular | AG-RE |
| + | VMA6 | ATPasa vacuolar | V |

Tabla supl. 3: mutantes resistentes a miltefosina.

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------|---|---------------------|
| +++ | <i>ACF4</i> | ? | ? |
| +++ | <i>ADR1</i> | Factor de transcripción, cambio diáuxico | N |
| +++ | <i>AIM1</i> | ? | ? |
| +++ | <i>AIM17</i> | ? | M |
| +++ | <i>AIM3</i> | ? | Membranas |
| +++ | <i>AIM5</i> | ? | M |
| +++ | <i>ALD6</i> | Metabolismo, acetaldehído deshidrogenasa | C |
| +++ | <i>ALP1</i> | Transporte aminoácidos, Arg | MP |
| +++ | <i>ALR2</i> | Transporte cationes inorgánicas di-, tri-valentes | MP |
| +++ | <i>ANS1</i> | ? | ? |
| +++ | <i>APL2</i> | Transporte vesicular asociado a clatrina | Complejo AP-1 |
| +++ | <i>APL5</i> | Transporte vesicular asociado a clatrina | Complejo AP-3 |
| +++ | <i>APM1</i> | Transporte vesicular asociado a clatrina | Complejo AP-1 |
| +++ | <i>ARF1</i> | Transporte vesicular, reclutamiento de recubrimientos | AG, vesículas AG |
| +++ | <i>ARO80</i> | Factor de transcripción | N |
| +++ | <i>ASG1</i> | Factor de transcripción, respuesta a estrés | N |
| +++ | <i>ATG16</i> | Autofagia | Pre-autofagosoma |
| +++ | <i>ATG21</i> | Autofagia, ruta cvt | C, E |
| +++ | <i>ATP20</i> | Fosforilación oxidativa, FoF1-ATP sintasa | M |
| +++ | <i>BUD17</i> | Selección sitio gemación | C, N |
| +++ | <i>BUL2</i> | Endocitosis, ubiquitinación | C |
| +++ | <i>CAF16</i> | Transcripción, regulación | C |
| +++ | <i>CAN1</i> | Transporte de aminoácidos, arginina | MP |
| +++ | <i>CIN2</i> | Plegamiento de tubulina | ? |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------------|--|------------------------|
| +++ | <i>CLG1</i> | Ciclo celular | N |
| +++ | <i>CMP2 (CNA2)</i> | Calcineurina, subunidad catalítica | C |
| +++ | <i>CMS1</i> | Ribosoma, biosíntesis | N |
| +++ | <i>CRT10</i> | Transcripción, regulación | ? |
| +++ | <i>CYB2</i> | Metabolismo, lactate oxidation | M |
| +++ | <i>DAP2</i> | Dipeptidil aminopeptidasa | V, membrana |
| +++ | <i>DER1</i> | Degradación de proteínas asociada al RE | RE |
| +++ | <i>DIN7</i> | Reparación ADN | M |
| +++ | <i>DNF2</i> | Translocación de fosfolípidos | MP |
| +++ | <i>DNM1</i> | Mitocondria, organización y biogénesis | M |
| +++ | <i>DOT5</i> | Homeostasis redox, respuesta a estrés, cambio diáuxico | N |
| +++ | <i>DUR1,2</i> | Metabolismo de alantoina y urea | C |
| +++ | <i>DUS3</i> | Traducción, modificación RNAt modification, dihidrouridina sintasa | C, N |
| +++ | <i>ECM5</i> | ? | N |
| +++ | <i>EDC3</i> | Transcripción, procesamiento RNAm | C |
| +++ | <i>EFT2</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| +++ | <i>EMI5</i> | Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones | M |
| +++ | <i>ERV15</i> | Transporte de proteínas del RE | RE, vesículas RE-AG |
| +++ | <i>FES1</i> | Plegamiento de proteínas, traducción | C |
| +++ | <i>FMP25</i> | Cadena de transporte de electrones | M |
| +++ | <i>FUN26</i> | Transporte de nucleósidos | V, membrana |
| +++ | <i>GDT1</i> | ? | V |
| +++ | <i>GIM3</i> | Plegamiento de proteínas, complejo prefoldina | C |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|---------------|--|--------------------------|
| +++ | <i>GLN3</i> | Represión catabolitos nitrógeno, factor de transcripción | C, N |
| +++ | <i>GLO2</i> | Metabolismo metilgloxal | C |
| +++ | <i>GYP8</i> | Transporte vesicular | C |
| +++ | <i>HAT2</i> | Histona acetilasa | N |
| +++ | <i>HHF1</i> | Estructura cromatina, histona H3 | N |
| +++ | <i>HIS2</i> | Biosíntesis histidina | C |
| +++ | <i>HKR1</i> | Biogénesis y organización de la pared celular | MP |
| +++ | <i>HPC2</i> | Remodelado de cromatina, ciclo celular | N |
| +++ | <i>IML3</i> | Segregación cromosómica, cinetocoro | N |
| +++ | <i>IPK1</i> | Señalización, síntesis fitato | N |
| +++ | <i>IRC16</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | <i>ISC1</i> | Metabolismo esfingolípidos, producción de ceramida, respuesta a estrés | RE, M, membrana externa |
| +++ | <i>KTR1</i> | Glicosilación de proteínas | AG |
| +++ | <i>LDB19</i> | Endocitosis | C |
| +++ | <i>LEA1</i> | Transcripción, splicing | C |
| +++ | <i>LEM3</i> | Translocación de fosfolípidos | MP, RE |
| +++ | <i>LYS2</i> | Biosíntesis de lisina | C |
| +++ | <i>MAL33</i> | Transcripción | N |
| +++ | <i>MIC14</i> | ? | M, espacio intermembrana |
| +++ | <i>MLH1</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>MMS4</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>MRPL44</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, M |
| +++ | <i>MSB3</i> | Transporte vesicular | Bud |
| +++ | <i>MSH2</i> | Reparación ADN | N |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|---------------------|--|----------------|
| +++ | <i>MSH6</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>MTC4</i> | ? | C |
| +++ | <i>NCS2</i> | Traducción, modificación RNAt | C |
| +++ | <i>NHP10</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>NIP100</i> | Segregación chromosomal, orientación huso mitótico | Huso mitótico |
| +++ | <i>NNF2</i> | ? | Membranas |
| +++ | <i>NPP2</i> | Metabolismo fosfato | ? |
| +++ | <i>OPI7</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | <i>PAC10</i> | Plegamiento de proteínas, complejo prefoldina | C |
| +++ | <i>PDE2</i> | Señalización por cAMP | C, N |
| +++ | <i>PEP8 (VPS26)</i> | Transporte retrógrado | E |
| +++ | <i>PES4</i> | ? | Reparación ADN |
| +++ | <i>PEX15</i> | Peroxisome, reciclaje receptores | Peroxisoma |
| +++ | <i>PEX28</i> | Peroxisome, organización y biosíntesis | Peroxisoma |
| +++ | <i>PFA3</i> | Palmitoilación proteínas, fusión vacuolar | V |
| +++ | <i>PGC1</i> | Metabolismo glicerofosfolípidos | RE, M |
| +++ | <i>PMS1</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>PRR2</i> | Ser/Thr quinasa | N |
| +++ | <i>PYC2</i> | Gluconeogenesis | C |
| +++ | <i>RAD14</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>RAD16</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>RAD17</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>RGP1</i> | Transporte vesicular | AG |
| +++ | <i>RKM1</i> | Ribosoma, maduración, lisina metiltransferasa | C, N |
| +++ | <i>RPL16A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |

| Res | Gen | Función celular | Localización | Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|---------------------|--|-----------------------|-----|---------------------|---|---------------------|
| +++ | <i>RPL17B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C | +++ | <i>SYT1</i> | Transporte vesicular | AG |
| +++ | <i>RPL19A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C | +++ | <i>TEA1</i> | Transcripción, transposón | N |
| +++ | <i>RPL33B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C | +++ | <i>TIR2</i> | Pared celular manoprotein, stress response | Pared celular |
| +++ | <i>RPL7B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C | +++ | <i>TLG2</i> | Transporte retrogrado, complejo GARP | AG, E |
| +++ | <i>RPS17B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C | +++ | <i>ULA1</i> | Nedilación proteica | ? |
| +++ | <i>RPS18B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C | +++ | <i>ULS1</i> | Degradación de proteínas sumoiladas | N |
| +++ | <i>RRG1</i> | Mantenimiento del ADN, acidificación vacuolar | M | +++ | <i>URA2</i> | Metabolismo pirimidinas | C |
| +++ | <i>RSA1</i> | Ribosoma, ensamblaje | N | +++ | <i>UTH1</i> | Mitocondria, mitofagia | M, membrana externa |
| +++ | <i>SER1</i> | Metabolismo, biosíntesis serina and glicina | C | +++ | <i>VAB2</i> | ? | C |
| +++ | <i>SGF11</i> | Regulación de histonas | N | +++ | <i>VAM10</i> | Fusión vacuolar | V, membrana |
| +++ | <i>SGN1</i> | Traducción | C | +++ | <i>VID24 (GID4)</i> | Gluconeogenesis, degradación de proteína | C, vesículas |
| +++ | <i>SMA1</i> | ? | ? | +++ | <i>VPS20</i> | Complejo ESCRT III | E |
| +++ | <i>SNX41</i> | Transporte retrógrado, Autofagia, vía cvt | E | +++ | <i>VPS29</i> | Transporte retrógrado | E |
| +++ | <i>SNZ2</i> | ? | ? | +++ | <i>VPS35</i> | Transporte retrógrado | E |
| +++ | <i>SRN2 (VPS37)</i> | Transporte vesicular, Complejo ESCRT I | E | +++ | <i>VPS52</i> | Transporte retrógrado, complejo GARP, vía cvt | AG |
| +++ | <i>SSA2</i> | Plegamiento de proteínas, HSP70 chaperona | C | +++ | <i>VPS54</i> | Transporte retrógrado, complejo GARP, vía cvt | AG |
| +++ | <i>SSF1</i> | Ribosoma, maduración subunidad mayor | Nucleolo | +++ | <i>VPS61</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | <i>STE14</i> | Feromona, maduración, isoprenilación | RE | +++ | <i>XRS2</i> | Reparación ADN | N |
| +++ | <i>STE24</i> | Feromona, maduración, metaloproteasa | RE | +++ | <i>YAK1</i> | Ser/Thr proteina quinasa, complejo CCR4-Not | C, N |
| +++ | <i>SUL2</i> | Transporte sulfato | MP | +++ | <i>YBL104C</i> | ? | C |
| +++ | <i>SUM1</i> | Esporulación | N | +++ | <i>YBR056W</i> | ? | C |
| +++ | <i>SWF1</i> | Palmitoilación de proteínas, transporte retrógrado | RE | +++ | <i>YBR071W</i> | ? | C |
| +++ | <i>SWH1</i> | Transporte de esteroides, unión a oxisterol | AG, envoltura nuclear | +++ | <i>YBR134W</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | <i>SXM1</i> | Transporte de proteínas al núcleo | N | +++ | <i>YBR184W</i> | ? | ? |
| | | | | +++ | <i>YBR224W</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|-------------|--|-----------------------------------|
| +++ | YCR061W | ? | C |
| +++ | YDL162C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YDR222W | ? | C |
| +++ | YEL014C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YEL028W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YEL043W | ? | RE |
| +++ | YFR016C | ? | Yema, C |
| +++ | YFR020W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YGR050C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YGR122W | ? | C |
| +++ | YGR250C | ? | C |
| +++ | <i>YHC3</i> | pH homeostasis, transportador vacuolar | V |
| +++ | YHL041W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YIR014W | ? | V |
| +++ | YJL144W | ? | C |
| +++ | YJL147C | ? | M |
| +++ | YJR079W | ? | ? |
| +++ | YKL077W | ? | V |
| +++ | YKR023W | ? | C, M |
| +++ | YLL058W | ? | ? |
| +++ | <i>YMC2</i> | Metabolismo oleato y glutamato | M, membrana interna |
| +++ | YML037C | ? | Vesículas recubiertas de clatrina |
| +++ | YML102C-A | ? | ? |
| +++ | YMR147W | ? | ? |
| +++ | YMR158W-A | ?; marco de lectura dudoso | ? |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------|-------------------------------------|------------------------------|
| +++ | YNL194C | ? | MP, eisosoma |
| +++ | YNL303W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YNR004W | ? | Nucleolo |
| +++ | YNR005C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YOL057W | Maduración péptidos | C, N |
| +++ | YOL083W | ? | ? |
| +++ | YOR055W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YOR343C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YPL009C | ? | C |
| +++ | YPL062W | ? | ? |
| +++ | YPL080C | ? | ? |
| +++ | YPL088W | ? | ? |
| +++ | YPL245W | ? | C, N |
| +++ | YPR090W | ? | ? |
| +++ | YPR126C | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| +++ | YPR153W | ? | ? |
| +++ | <i>YSY6</i> | Secreción proteínas | RE |
| +++ | <i>YTF2</i> | ? | ? |
| ++ | <i>ANP1</i> | Glicosilación de proteínas | AG |
| ++ | <i>APT1</i> | Feromona, transducción de señales | C, N |
| ++ | <i>ARN1</i> | Transporte sideróforos-hierro | C, vesículas de secreción, E |
| ++ | <i>CSI1</i> | De-nedilación de proteínas | Signalosome |
| ++ | <i>CTF19</i> | Segregación cromosómica, cinetocoro | N |
| ++ | <i>ECM29</i> | Proteasoma | C, N, proteasoma |
| ++ | <i>ELC1</i> | Transcripción, reparación ADN | M |
| ++ | <i>FMP52</i> | ? | RE, M |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|--------------|---|--------------|
| ++ | <i>HNT2</i> | Metabolismo nucleósidos | C, M, N |
| ++ | <i>KTR7</i> | Glicosilación de proteínas | AG |
| ++ | <i>MED1</i> | Transcripción | N |
| ++ | <i>MFA2</i> | Feromona, factor a | Extracelular |
| ++ | <i>MTH1</i> | Señalización | ? |
| ++ | <i>MVB12</i> | Complejo ESCRT I | E |
| ++ | <i>NDT80</i> | Esporulación | N |
| ++ | <i>OPI8</i> | ?; marco de lectura dudoso; doa4D suppressor | ? |
| ++ | <i>PEX6</i> | Peroxisome receptor recycling | Peroxisome |
| ++ | <i>PIG2</i> | Metabolism, glycogen biosynthesis | C |
| ++ | <i>PMP1</i> | Pma1p regulation | MP |
| ++ | <i>RBD2</i> | ? | AG |
| ++ | <i>RSC2</i> | Mid-late spore formation | N |
| ++ | <i>STE2</i> | Pheromone receptor, alpha factor | MP |
| ++ | <i>SVF1</i> | Stress response, cell survival | C, N |
| ++ | <i>TMA23</i> | Ribosome biogenesis | Nucleolo |
| ++ | <i>VHR1</i> | Factor de transcripción, biotin biosynthesis | N, C |
| ++ | <i>VPS21</i> | Vesicular Transporte retrógrado | E |
| ++ | <i>VPS3</i> | Transporte vesicular CORVET complex, Protein targeting to vacuole, vacuolar acidification | C |
| ++ | <i>WHI4</i> | Regulation of cell size | C |
| ++ | YBR197C | ? | C, N |
| ++ | YDR442W | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| ++ | YFR017C | ? | C |
| ++ | YJL206C | ? | ? |
| ++ | YOR318C | ?; marco de lectura dudoso | ? |

| Res | Gen | Función celular | Localización |
|-----|---------------|--|-------------------|
| ++ | YPR109W | ? | ? |
| + | <i>APD1</i> | ? | C, N |
| + | <i>BRO1</i> | Transporte vesicular, Complejo ESCRT III, Protein deubiquitination, vacuolar transport | E, C |
| + | <i>BXI1</i> | ? | V |
| + | <i>CAM1</i> | Factor de transcripción, phospholipid and calcium binding | N |
| + | <i>DDC1</i> | Reparación ADN, damage checkpoint | N |
| + | <i>DIG1</i> | Invasive growth regulation | N |
| + | <i>HIS1</i> | Metabolism, histidine biosynthesis | C |
| + | <i>HLR1</i> | Biogénesis y organización de la pared celular | C |
| + | <i>IFA38</i> | Fatty acid elongation | RE |
| + | <i>KIN1</i> | Ser/Thr kinase, exocytosis | MP |
| + | <i>NOP13</i> | ? | N |
| + | <i>PHM7</i> | ? | Cell periphery, V |
| + | <i>PRB1</i> | Vacuolar protein catabolism | V |
| + | <i>RPL11B</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| + | <i>RPL8A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| + | <i>RPS11A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| + | <i>RPS6A</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal | R, C |
| + | <i>SDL1</i> | Metabolism, serine metabolism | ? |
| + | <i>SEC66</i> | Protein targeting and import into the RE | RE |
| + | <i>SIF2</i> | Chromatin remodelling, histone deacetylation | N |
| + | <i>TCA17</i> | Vesicular Transporte retrógrado, endosome to Golgi, GEF | AG |

| Res | Gen | Función celular | Localizacion |
|-----|--------------------|---|--------------|
| + | <i>TIF3</i> | Biosíntesis proteica, proteína ribosomal, Traducciónal initiation | R, C |
| + | <i>TSA1</i> | Stress response (oxidative), mutation decrease | C |
| + | <i>UBC13</i> | Reparación ADN, postreplication repair | C, N |
| + | <i>VMA3 (CUP5)</i> | Vacuolar acidification (V-ATPase) | V |
| + | <i>VMA8</i> | Vacuolar acidification (V-ATPase) | V |
| + | <i>YBR138C</i> | ? | C |

| Res | Gen | Función celular | Localizacion |
|-----|----------------|----------------------------|--------------|
| + | <i>YBR226C</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| + | <i>YDR306C</i> | ? | ? |
| + | <i>YEL047C</i> | Anaerobic growth | C, M |
| + | <i>YGR226C</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| + | <i>YKR015C</i> | ? | ? |
| + | <i>YML089C</i> | ?; marco de lectura dudoso | ? |
| + | <i>YPR089W</i> | ? | ? |
| + | <i>YSA1</i> | ? | C, M, N |

Índice de figuras

Ilustraciones

| | | | |
|----------------------|----|----------------------|-----|
| Ilustración 1 | 17 | Ilustración 26 | 86 |
| Ilustración 2 | 19 | Ilustración 27 | 89 |
| Ilustración 3 | 20 | Ilustración 28 | 90 |
| Ilustración 4 | 22 | Ilustración 29 | 90 |
| Ilustración 5 | 32 | Ilustración 30 | 93 |
| Ilustración 6 | 37 | Ilustración 31 | 97 |
| Ilustración 7 | 41 | Ilustración 32 | 99 |
| Ilustración 8 | 46 | Ilustración 33 | 100 |
| Ilustración 9 | 48 | Ilustración 34 | 103 |
| Ilustración 10 | 49 | Ilustración 35 | 104 |
| Ilustración 11 | 52 | Ilustración 36 | 105 |
| Ilustración 12 | 54 | Ilustración 37 | 107 |
| Ilustración 13 | 58 | Ilustración 38 | 108 |
| Ilustración 14 | 65 | Ilustración 39 | 109 |
| Ilustración 15 | 67 | Ilustración 40 | 110 |
| Ilustración 16 | 68 | Ilustración 41 | 111 |
| Ilustración 17 | 69 | Ilustración 42 | 113 |
| Ilustración 18 | 70 | Ilustración 43 | 114 |
| Ilustración 19 | 72 | Ilustración 44 | 116 |
| Ilustración 20 | 74 | Ilustración 45 | 120 |
| Ilustración 21 | 75 | Ilustración 46 | 121 |
| Ilustración 22 | 76 | Ilustración 47 | 122 |
| Ilustración 23 | 77 | Ilustración 48 | 123 |
| Ilustración 24 | 83 | Ilustración 49 | 125 |
| Ilustración 25 | 85 | Ilustración 50 | 126 |

| | | | |
|----------------------|-----|----------------------|-----|
| Ilustración 51 | 129 | Ilustración 66 | 152 |
| Ilustración 52 | 130 | Ilustración 67 | 154 |
| Ilustración 53 | 132 | Ilustración 69 | 157 |
| Ilustración 54 | 134 | Ilustración 70 | 163 |
| Ilustración 56 | 136 | Ilustración 71 | 163 |
| Ilustración 57 | 138 | Ilustración 72 | 175 |
| Ilustración 58 | 139 | Ilustración 73 | 198 |
| Ilustración 59 | 142 | Ilustración 74 | 205 |
| Ilustración 60 | 143 | Ilustración 75 | 209 |
| Ilustración 61 | 144 | Ilustración 76 | 215 |
| Ilustración 62 | 147 | Ilustración 77 | 219 |
| Ilustración 63 | 148 | Ilustración 78 | 221 |
| Ilustración 64 | 149 | Ilustración 79..... | 222 |
| Ilustración 65 | 150 | | |

Tablas

| | |
|--------------------|-----|
| Tabla 1 | 45 |
| Tabla 2 | 118 |
| Tabla 3 | 118 |
| Tabla 4 | 160 |
| Tabla 5 | 162 |
| Tabla supl. 1..... | 240 |
| Tabla supl. 2..... | 245 |
| Tabla supl. 3..... | 247 |

Agradecimientos

Este trabajo no existiría sin el apoyo de muchas personas. Faustino Mollinedo, que me hizo un lugar en su laboratorio y dirigió el trabajo. Scott E. Erdman, que me acogió allende los mares. José Luís Revuelta, que ofreció ayuda y paciencia infinita. Jihad y Jorge, que chocaron codos conmigo. Esta tesis es también vuestra (al menos las partes buenas)

Esta tesis no existiría sin mis compañeros de laboratorio y de fatigas. Gracias por vuestras críticas, también por vuestras risas.

Yo no existiría sin mis amigos, sin mi familia, sin Cris. Gracias por escuchar, aguantar y sacarme adelante. Puedo prometer y prometo que ya no más.

