



Participación de *dni1*⁺, *dni2*⁺ y *prm1*⁺
en la fusión celular durante
la conjugación

María Ángeles Curto Borrego

Tesis doctoral, 2016



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y GENÓMICA



Participación de *dni1*⁺, *dni2*⁺ y *prm1*⁺ en la fusión celular durante la conjugación

Tesis Doctoral
María de los Ángeles Curto Borrego
Salamanca, 2016



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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "**Participación de *dni1⁺*, *dni2⁺* y *prm1⁺* en la fusión celular durante la conjugación**", presentada por la licenciada **María de los Ángeles Curto Borrego** para optar al grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^a Henar Valdivieso Montero en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a 14 de junio de 2016.

Fdo. Dr. Francisco del Rey Iglesias



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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "**Participación de *dni1⁺*, *dni2⁺* y *prm1⁺* en la fusión celular durante la conjugación**", presentada por la licenciada **María de los Ángeles Curto Borrego** para optar al grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a 17 de junio de 2016.

Fdo. Dra. M^a Henar Valdivieso Montero

Esta Tesis Doctoral se ha realizado gracias a una beca predoctoral del Programa de Formación del Profesorado Universitario (2011/2015) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España, proyectos del Plan Nacional de I+D (MICINN/Programa FEDER: BFU2007-61866, y BFU2010-15085) (MINECO/Programa FEDER: BFU2013-48583-C2-2-P) y proyectos de la Junta de Castilla y León GR231 y SA073U14.

Un proverbio chino cuenta que "el simple aleteo de una mariposa, puede provocar un tsunami al otro lado del mundo". Además de tratarse de una bonita frase, para mí está llena de significado, ya que esta tesis, con sus defectos y cualidades, es así y no de otra manera, por vosotros. Por ello, lo mínimo que puedo hacer es recordaros en una página de este extenso relato.

La historia comenzó hará unos ocho años, cuando una profesora de la facultad, pequeñita pero muy agradable, hizo que me entrara el gusanillo por el trabajo en microbiología. Un tiempo más tarde, me vi haciendo prácticas en el Instituto de Microbiología Bioquímica y fue donde aquella profesora, Henar, creyó en mí y decidió darme una oportunidad en su laboratorio que me ha permitido formarme como científica. Además de abrirme las puertas a la investigación, Henar ha sido como una "mami", siempre pendiente de todo. Pero también he de darle las gracias por haberme dejado volar, y aunque a menudo me haya resultado complicado, me ha permitido evolucionar, aprender y descubrir nuevos horizontes de este trabajo. Durante aquel tiempo coincidí con Nacho, Laura, Civi, Ontoso; que me contaban historias apasionantes sobre esto de la ciencia. Pero pronto aquella cuevecita, el 231, se nos quedó pequeña, y nos mudamos al p1.1. en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, vamos, el edificio rojo que es como mejor se le conoce. Durante toooooo este tiempo he podido compartir laboratorio con muy diferentes personas: Nagore, la Mentora!!, Mohammad, Cristina, siempre pendiente de que nada faltara, Marta, Sandra, Fran, nuestro Niño!!, y Carmen. Gracias a todos vosotros porque de una forma u otra me habéis permitido crecer tanto personal como profesionalmente.

Y sin duda, el que han forjado los mejores recuerdos que me llevo de esta etapa de mi vida, el doctorado, es el grupo de café: Mariona, mi Hermanita!; Iris, con su energía contagiosa; Sara, que siempre guarda una sonrisa para recibirme; Rebeca, el mejor ejemplo a seguir; Maite, con su perseverancia; Victor, el alma de la fiesta; Pedro, la calidez en persona, Carlos, siempre dispuesto a lo que le propongas; Irene, guardiana de secretos y confianzas pero sobre todo gran consejera; Tomás, con una sofisticada visión objetiva y quien me ha rescatado de la rebelión de los ordenadores; Elvira, todo un reservorio de positividad; Luisa, por su cariño incondicional. Sencillamente... ¡¡¡son geniales!!! También Sofía, Carlos, Miguel y Raúl, que hace algún tiempo alzaron el vuelo, y que son promotores de este grupo de café, aunque ahora se vaya una hora más tarde..... ¡Ejem!

En todas las historias siempre aparece algún troll, o un lobo, o incluso un dragón. Cuando comencé mi andadura por aquí, alguien me comentó que los lunes tocaban "seminarios de pared", en los que tendría la oportunidad de enfrentarme a muchos ogros. El consejo que recibí fue que debía evitar que olieran mi miedo. Es cierto que gritar... ¡gritan! Sobre todo César. Pero cuando los conoces te das cuenta que son grandes personas y grandes profesionales: Ángel, Juan Carlos, Junior, Belén, Carlos, Pilar, Bea, César y Yolanda, siempre dispuestos a darte una idea, un consejo, a resolverte una duda,

a prestarte una cepa, e incluso a regalarte una visión diferente que puede llegar a ser muy interesante. También quiero recordar a Alessandro Senes y a Claire por su ayuda, a pesar de no conocerme, en la búsqueda de los codiciados plásmidos del TOXCAT.

Así que sí, parece ser que me voy a convertir en Doctora en Biología. Pero, quién me metió en la cabeza esto de estudiar la ciencia de la vida. La verdad... no lo recuerdo, pero lo que sí sé es que fue todo un regalo porque me sirvió para conocer a mis Supernenas: Alicia, Sheila, Rosa y Patri. Siempre han estado y están ahí apoyándome y generando buenas vibraciones.

De quien tampoco quiero olvidarme es de Toda la Banda: todos y cada uno de vosotros sois excepcionales! Siempre dispuestos a ayudarme en lo que os he pedido a pesar de la distancia. Y sin duda alguna, esta historia hubiera sido muy diferente sin mis Grecas: Lali, Ana, Nayra, Eva, Laura y Julia, siempre mostrando interés por mis levaduras y sobre todo proporcionándome energía para afrontar esta batalla. ¡Hacemos un gran equipo!

Y como no podía ser menos, esta historia también pertenece a las personas que han estado ahí desde el principio de los tiempos: Conchi, Marta, Nuria; la gente con la que he crecido. Marta, Jessy, el pequeño Pablo, Pilar, Teresa; esas personitas que me han visto querer ser periodista y han terminado viéndome estresada por una tesis. Y como no los "allegados", Nacho, Juli, Pipe, y especialmente Chuchi, porque una parte de este "manuscrito" es más tuya que mía. Recordar a Cándido y Tere; que me han tratado como una hija. También a toda mi familia, y en particular a mis padres y hermanos, que siempre han creído en mí y me han defendido a capa y espada, aunque no hayan sido pocas las ocasiones que he discutido con Juan y Ángel... Y sobre todo Rubén, porque no he sobrevivido a una tesis, hemos sobrevivido a una tesis. El príncipe verde, porque los azules salen rana, que ha tenido la santa paciencia de aguantarme antes, durante y después de la tesis, y ha sabido sacar lo mejor de mí.

Sinceramente, GRACIAS!

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto
y pensar lo que nadie más ha pensado”

Albert Szent-Györgyi

A Juan y Ángel

aa	A mino á cido
ACoA	A cetil C oenzima A
ADN	Á cido d esoxirribo n ucleico
ARN	Á cido r ibo n ucleico
BF	B re F eldina A
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAM	Cloranfenicol (<i>ChlorAMphenicol</i>)
CAT	C loranfenicol A cetil T ransferasa
dNTP	D esoxi N ucleótido T ri f osfato
DTM	D ominio T rans M embrana
DMSO	D imetil s ulf ó xido
D.O.	D ensidad Ó ptica
EDTA	Ácido e tilén d iamino t etra- a cético
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HA	H emag l utinina
Kb	K ilo b ase
KDa	K ilo D alton
Lat A	L atrunculina A
LB	Medio L uria- B ertani
MAP	Proteína activada por mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein</i>)
MBC	M etil B enzimidazol-2-il C arbamato
MBP	Proteína de unión a maltosa (<i>Maltose Binding Protein</i>)
MEA	Agar extracto de malta (<i>Malt Extract Agar</i>)
MM	M edio m ínimo

MM-N	M edio m ínimo sin n itrógeno
ng	N ano G ramo
ORF	Fase de lectura abierta (<i><u>O</u>pen <u>R</u>eadin<u>E</u> <u>F</u>rame</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida (<i><u>P</u>oly<u>A</u>crilamide <u>G</u>el <u>E</u>lectrophoresis</i>)
pb	P ares de b ases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (<i><u>P</u>hosphatidil<u>E</u>tanolamine</i>)
PS	Fosfatidilserina (<i><u>P</u>hosphadil<u>S</u>erine</i>)
RFP	Proteína roja fluorescente (<i><u>R</u>ed <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein</i>)
rpm	R evoluciones p or m inuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (<i><u>R</u>everse <u>T</u>ranscriptase <u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i><u>S</u>odium <u>D</u>odecyl <u>S</u>ulfate</i>)
SPA	Agar de esporulación (<i><u>S</u>Porulation <u>A</u>gar</i>)
TAE	Tampón T ris- a cético E DTA
TCA	Ácido T ric C loro A cético
Ti	T iamina
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i><u>U</u>nfolded <u>P</u>rotein <u>R</u>esponse</i>)
UV	U ltra V ioleta



Índice



INTRODUCCIÓN

1. LAS LEVADURAS COMO ORGANISMO MODELO.....	1
2. LA LEVADURA DE FISIÓN <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
2.1. El ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	2
2.2. El proceso de conjugación en levaduras.....	3
3. MUTANTES CON DEFECTOS EN LA FUSIÓN CELULAR DURANTE LA CONJUGACIÓN.....	5
3.1. Mutantes con defectos en la producción de feromonas.....	6
3.2. Mutantes con defectos en la degradación de la pared celular.....	6
3.3. Mutantes con defectos en el citoesqueleto.....	8
3.4. Mutantes con defectos en la fusión de membranas.....	10
4. LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	15
4.1 Organización de la membrana plasmática.....	15
4.2. Compartimentalización de la membrana.....	17
1. Mecanismos dependientes de energía.....	18
2. Barreras físicas.....	20
3. Agrupaciones específicas.....	20
4.3. Las claudinas.....	21
5. FUSIÓN DE MEMBRANAS.....	25
5.1. Mecanismo general de fusión de membranas.....	25
5.2. Importancia de la fusión de membranas.....	27

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antecedentes y objetivos.....	29
-------------------------------	----

RESULTADOS

1. LA PROTEÍNA Prm1p ES NECESARIA PARA LA FUSIÓN CELULAR.....	31
1.1. La expresión de <i>prm1</i> ⁺ aumenta durante conjugación.....	31
1.2. Prm1p se localiza en la zona de contacto de los <i>shmoos</i>	31
1.3. Prm1p es necesaria para la fusión celular.....	32

1.4. El defecto en fusión celular de <i>prm1Δ</i> es más severo que el de <i>dni1Δ</i> y/o <i>dni2Δ</i>	36
1.5. La distribución de la pared celular y de la membrana plasmática en la zona de contacto de los <i>shmoo</i> s es defectuosa en el mutante <i>prm1Δ</i>	38
1.6. Distribución de enzimas necesarias para la remodelación de la pared celular en prezigotos <i>prm1Δ</i>	41
1.7. Las envueltas celulares presentan un comportamiento erróneo durante la fusión celular en zigotos <i>prm1Δ</i>	43
1.8. La distribución de la fosfatidilserina se modifica antes de la fusión celular....	46
2. RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS Dni1p Y Dni2p.....	49
2.1. Relación funcional entre Dni1p y Dni2p.....	49
2.1.1. Dni1p y Dni2p colocalizan en la zona de contacto celular.....	49
2.1.2. La localización de Dni1p y Dni2p es interdependiente.....	49
2.1.3. Dni2p controla específicamente la localización de Dni1p.....	50
2.1.4. La sobreexpresión de <i>dni1⁺</i> o <i>dni2⁺</i> no complementa la ausencia del otro gen.....	53
2.1.5. Dni1p y Dni2p forman un complejo.....	55
2.2. Relación estructura-función de Dni1p y Dni2p.....	55
2.2.1. Los elementos estructurales que Dni1p comparte con las claudinas no son esenciales para su función.....	56
2.2.2. Los elementos estructurales que Dni2p comparte con las claudinas son esenciales para su función.....	61
2.2.3. Otros elementos estructurales en Dni1 y Dni2: motivos <i>small-xxx-small</i>	65
2.2.4. Los motivos <i>small-xxx-small</i> son necesarios para la función de Dni2p pero no para la de Dni1p.....	68
2.2.5. Dni2p interacciona consigo misma a través del motivo <i>small-xxx-small</i> de la cuarta hélice transmembrana (DTM4).....	70

3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CONCENTRACIÓN DE Dni1p Y Dni2p EN EL MICRODOMINIO DE FUSIÓN.....	74
3.1. Papel de la endocitosis en la concentración de Dni1p en el microdominio de fusión.....	74
3.1.1. La endocitosis es necesaria para una fusión celular eficiente.....	74
3.1.2. La endocitosis contribuye ligeramente a concentrar a Dni1p en la punta de los <i>shmoos</i>	75
3.1.3. Dni1p contiene en su extremo C-terminal un motivo di-leucina que participa en su endocitosis.....	76
3.1.4. El mutante <i>dni1Δ</i> no presenta defectos en endocitosis.....	79
3.2. Papel de la actina en la concentración de Dni1p en el microdominio de fusión...	80
3.2.1. La localización de Dni2p en el microdominio de fusión requiere la integridad del citoesqueleto de actina.....	80
3.2.2. La actina asociada al foco de fusión colabora en la concentración de Dni1p y Dni2p en la zona de contacto intercelular.....	82
3.2.3. La actina se organiza correctamente en los mutantes <i>dni1Δ</i> y/o <i>dni2Δ</i>	84
3.3. La concentración de Dni1p en el microdominio de fusión requiere que los esteroides de la membrana se organicen correctamente.....	84
3.4. Los requerimientos Dni1p y Dni2p para permanecer en el microdominio de fusión son distintos.....	86
4. ESTUDIOS DE SOBREENPRESIÓN.....	89
4.1. Las células que sobreexpresan <i>dni1⁺</i> pierden la integridad celular en un proceso dependiente de Dni2p.....	89
4.2. La muerte de las células que sobreexpresan <i>dni1⁺</i> no se remedia por sorbitol....	92
4.3. La sobreexpresión de <i>dni1⁺</i> provoca una expansión del RE.....	93
4.4. Las células que sobreexpresan <i>dni1⁺</i> se mueren por una señalización dependiente de Ire1p.....	94
4.5. Las cisteínas conservadas y el dominio C-terminal de Dni1p son necesarios para que se produzca daño celular en condiciones de sobreexpresión.....	96

5. RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS Dni1p, Dni2p y Prm1p.....	97
5.1. Los genes dni⁺ y prm1⁺ actúan en rutas funcionales diferentes.....	97
5.2. Los mutantes <i>dni1Δ</i> y <i>prm1Δ</i> presentan sensibilidad a compuestos que interfieren con los lípidos de la membrana plasmática.....	101
5.3. Efecto del calcio en el proceso de conjugación en distintos mutantes.....	104

DISCUSIÓN

1. Prm1p y las proteínas Dni participan en dos rutas funcionales independientes necesarias para la remodelación de las envueltas celulares durante la fusión celular.....	107
2. La ausencia de Prm1p y de las proteínas Dni podrían alterar algunas propiedades de la membrana plasmática en el microdominio de fusión.....	109
3. Relación entre Dni1p, Dni2p y las claudinas.....	111
4. Dni2p podría formar homo-oligómeros a través de motivos <i>small-xxx-small</i>	114
5. Compartimentalización de Dni1p en el microdominio de fusión.....	116

MATERIALES Y MÉTODOS

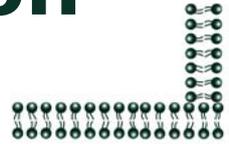
1. MICROORGANISMO EMPLEADOS.....	123
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	123
2.1. Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	124
2.2. Crecimiento <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	124
2.2.1. Crecimiento vegetativo.....	124
2.2.2. Conjugación y esporulación.....	125
2.2.3. Condiciones especiales de crecimiento.....	128
3. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	129
3.1. Vectores utilizados.....	129
3.1.1. Vectores de <i>E. coli</i>	129
3.1.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	130
3.2. Técnicas generales de manipulación de ADN.....	131
3.3. Obtención de ADN.....	132
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	132

3.5. PCR semicuantitativa.....	133
3.6. Mutagénesis dirigida <i>in vitro</i>	134
3.7. Construcción de plásmidos.....	135
3.7.1. Clonación del gen <i>prm1</i> ⁺	135
3.7.2. Construcción del casete de delección <i>prm1::KAN</i>	135
3.7.3. Construcción del casete de delección <i>dni2::NAT</i>	136
3.7.4. Marcaje de los genes <i>dni1</i> ⁺ , <i>dni2</i> ⁺ y <i>prm1</i> ⁺	136
3.7.5. Construcción de plásmidos de sobreexpresión.....	137
3.7.6. Construcción del plásmido KS+LactC2-GFP.....	137
3.7.7. Construcción del plásmido 148+Psy1-mCherry.....	138
3.7.8. Clonación de hélices transmembrana para el ensayo TOXCAT.....	138
3.8. Transformaciones.....	138
3.8.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	138
3.8.2. Transformación de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	139
4. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIONES.....	139
4.1. Microscopía de campo claro y de contraste de fases.....	139
4.2. Microscopía de fluorescencia.....	139
4.2.1. Fluorescencia directa con GFP y RFP.....	140
4.2.2. Tratamientos con compuestos químicos.....	141
4.2.3. Tinción con Calcoflúor.....	141
4.2.4. Tinción con Hoeschst 33258.....	142
4.2.5. Tinción con FM4-64.....	142
4.2.6. Tinción con <i>Lucifer yellow</i>	143
4.3. Experimentos de <i>time-lapse</i>	143
4.4. Cuantificación por "line-scan".....	144
4.5. Microscopía electrónica de transmisión.....	144

5. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	144
5.1. Obtención de extractos proteicos.....	144
5.2. Separación por electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas	145
5.3 Co-inmunoprecipitación.....	146
6. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	147
7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE DATOS.....	149
ANEXO.....	151
BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía.....	159



Introducción



1. LAS LEVADURAS COMO ORGANISMO MODELO

El término levadura engloba a los hongos microscópicos unicelulares. Se considera que las levaduras fueron los primeros microorganismos “domesticados” por el hombre, ya que los productos surgidos de su actividad (la fermentación del pan, cerveza o vino) han estado presentes en nuestra sociedad desde muy antiguo. La participación de estos microorganismos en la mejora de nuestra calidad de vida no se limita a este aspecto práctico, ya que el impacto y contribución de las levaduras a la ciencia no es menos notable. Desde que en los años 50 Herchel Roman se propusiera desarrollar a *Saccharomyces cerevisiae* (una levadura de gemación) como organismo modelo, y de igual forma Murdoch Mirchison reconociera el innegable potencial de *Schizosaccharomyces pombe* (una levadura de fisión) como sistema modelo para estudios de división celular y crecimiento (Mitchison y Nurse, 1985), han sido muchos los avances logrados. Ambas levaduras comparten una serie de características que han hecho de ellas excelentes organismos modelo. Entre ellas destacan que son organismos de pequeño tamaño que no requieren demasiado espacio ni condiciones especiales para su cultivo, no son patógenos, y presentan tiempos de generación cortos, por lo que se multiplican rápidamente. Asimismo son fáciles de manipular en el laboratorio, siendo susceptibles de análisis genético clásico y molecular. Además presentan ciclos sexuales no muy largos. Todo esto, unido al desarrollo y mejora de las técnicas de manipulación de estos organismos, así como la secuenciación completa de sus genomas en los años 1996 para *S. cerevisiae* (Goffeau et al., 1996) y 2002 para *S. pombe* (Wood et al., 2002), ha confirmado el poderoso potencial de ambas levaduras como organismos modelo. La contribución de estos organismos al conocimiento de diferentes procesos celulares ha sido, y es, de gran relevancia para la comprensión de los mecanismos moleculares de diversas enfermedades humanas tales como el cáncer, procesos neurodegenerativos, enfermedades metabólicas o distintas enfermedades infecciosas (Breitenbach et al., 2013; Lasserre et al., 2015; Pfau and Amon, 2012; Popa et al., 2016). No en vano, los importantes hallazgos obtenidos mediante el uso de ambas levaduras han sido reconocidos mediante la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina a Lee Hartwell y Randy Schekman (por sus respectivos trabajos en *S. cerevisiae*) y a Paul Nurse (por sus estudios en *S. pombe*). No obstante, estas dos levaduras son muy distintas entre sí, ya que divergieron de un ancestro común hace 330-420 millones de años (Sipiczki, 2000). Por ello el estudio de un proceso biológico en ambos organismos puede aportar información complementaria que ayude a comprender dicho proceso.

2. LA LEVADURA DE FISIÓN *Schizosaccharomyces pombe*

Este trabajo se ha realizado con *S. pombe*, una levadura de fisión que fue aislada en 1893 por Lindner de una variedad de cerveza africana. Precisamente a ello debe su

nombre, ya que "*pombe*" significa cerveza en Swahili. Sin embargo, la mayoría de las estirpes usadas en el laboratorio derivan de una cepa aislada en el sur de Francia en 1921 por A. Osterwalder, procedente de un jugo de uva rancio con grandes cantidades de sulfuro, y que fue caracterizada genéticamente por Urs Leopold en los años 40. Este cultivo contenía, entre otras, células con el tipo sexual h^{90} (cepa 968), el tipo sexual h^- (cepa 972) y el tipo sexual h^+ (cepa 975) (Leupold, 1949).

S. pombe pertenece al filo *Ascomycycota*. Se trata de un organismo haplodiplobionte cuyo genoma de 13,8 Mb contiene 4.824 genes repartidos en 3 cromosomas: I (5,7 Mb), II (4,6 Mb) y III (3,5 Mb).

2.1. El ciclo de vida de *S. pombe*

Las células de esta levadura en condiciones normales son haploides y presentan una morfología cilíndrica que se mantiene a lo largo del ciclo celular. Las células al nacer miden unos 3-4 μm de diámetro y 7-8 μm de largo; el diámetro se mantiene constante y la longitud aumenta hasta 12-15 μm en el momento de la mitosis. Las células de *S. pombe* se dividen por fisión, de modo que cuando la célula madre alcanza el tamaño adecuado, se genera un septo que la divide en dos células hijas, que crecen hasta alcanzar el tamaño de la célula madre, momento en el que se dividen de nuevo por fisión (**figura 1**). Esta fase del ciclo, en el que las células crecen de manera exponencial, se denomina crecimiento vegetativo. Estas células haploides pueden ser de dos tipos sexuales complementarios: M (h^-) o P (h^+).

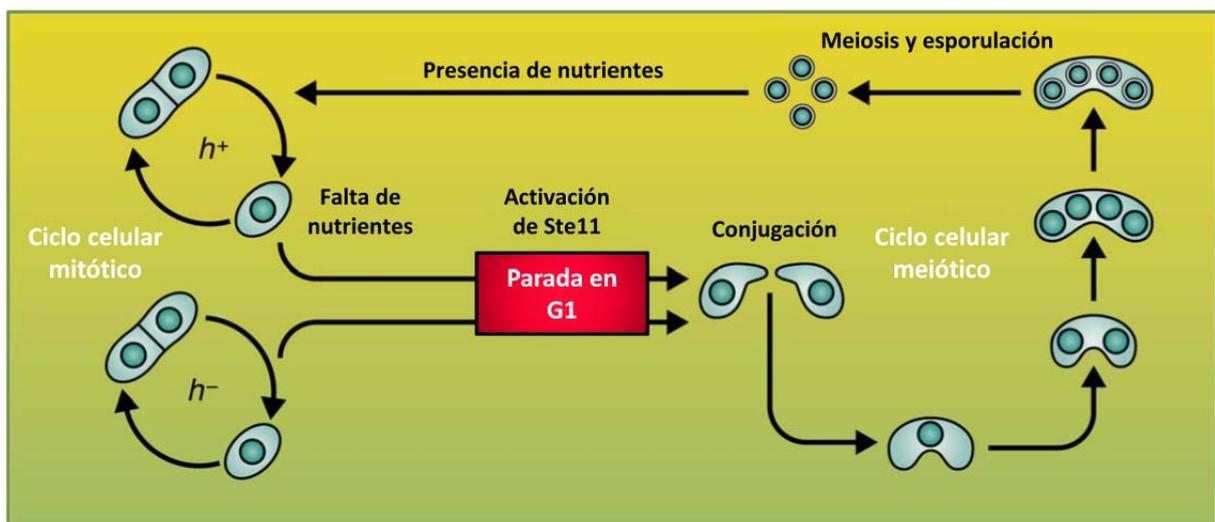


FIGURA 1:

Ciclo de vida de *S. pombe*. Durante el ciclo mitótico, las células de *S. pombe* se dividen por fisión. Ante una falta de nutrientes estas células entran en el programa de diferenciación sexual, en el que las células de tipos celulares opuestos se fusionan generando un cigoto diploide, que sufre meiosis para generar 4 ascosporas haploides, que germinan cuando se reestablece la concentración de nutrientes. Adaptación de Otsubo et al., 2012.

Ste11p es el factor de transcripción principal responsable de la transición de división celular a diferenciación sexual. La expresión de Ste11p se encuentra bajo el control de varias rutas de señalización como son AMPc, TOR, y MAPK, que responden a factores externos como la disminución de la cantidad de nutrientes (en especial nitrógeno), estrés, y feromonas. La activación de Ste11p promueve la parada del ciclo celular en la fase G1, produciéndose la diferenciación de las células a "shmoo" (Otsubo y Yamamoto, 2012) que son células en las que uno de los polos crece generando una proyección para facilitar el contacto con otro *shmoo* de tipo sexual opuesto. El conjunto de eventos que tienen lugar desde la diferenciación sexual hasta la formación del cigoto se denomina conjugación. En *S. pombe* los cigotos son inestables, de modo que la meiosis ocurre inmediatamente, dando lugar a un asca que contiene 4 esporas haploides. Las esporas se liberan por dehiscencia del asca y germinan cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables, reiniciando así de nuevo el ciclo (Davey, 1998). Si los cigotos se inoculan en medio rico, antes de que ocurra la meiosis, pueden iniciar un ciclo mitótico diploide. Cuando el medio se empobrece los diploides esporulan originando un asca azigótica. Las estirpes h^+ y h^- son heterotálicas, por lo que necesitan un compañero de tipo sexual opuesto para poder conjugarse (Gutz, 1967). Existe una estirpe homotálica denominada h^{90} que es capaz de conjugarse por sí sola. Las células de esta estirpe pueden cambiar de tipo sexual entre h^+ y h^- cada dos generaciones, lo que significa que una única célula es capaz de originar una colonia que contiene células h^+ y h^- , que pueden conjugarse entre sí cuando las condiciones nutricionales son limitantes (Leupold, 1958). En el presente trabajo se han empleado estirpes h^{90} para realizar la mayoría de los estudios de conjugación.

2.2. El proceso de conjugación en levaduras

La conjugación comprende una serie de eventos cuyo fin es asegurar la correcta transmisión del material genético, por lo que es un proceso esencial para la supervivencia de las especies. El microorganismo donde más se ha estudiado la conjugación es *S. cerevisiae* por ello, aunque este trabajo se ha realizado con *S. pombe*, se hará referencia a algunos aspectos del proceso en la levadura de gemación. En la **figura 2** se muestra un esquema general de los sucesivos pasos que ocurren durante la conjugación en ambas levaduras. En *S. cerevisiae* las células pueden conjugarse espontáneamente en medio rico ante la presencia de células del tipo sexual opuesto, generando diploides estables que esporulan cuando las condiciones de nutrientes son limitantes (Merlini et al., 2013). Por su parte, en *S. pombe* el desarrollo sexual requiere que se den dos circunstancias: un bajo nivel de nutrientes (en particular de nitrógeno) y la presencia de feromonas. En ausencia de nitrógeno desciende el nivel de AMPc en la célula, lo que provoca la disociación de una proteína G heterotrimérica y que el factor de transcripción Ste11p inicie la transcripción de varios genes necesarios para el desarrollo sexual, entre ellos los necesarios para la producción de

feromonas (Davey, 1998; Nielsen, 2004; Yamamoto et al., 1997). En *S. cerevisiae* el factor de transcripción responsable de la diferenciación sexual es Ste12 (Roberts and Fink, 1994). En ambas levaduras, cada tipo sexual sintetiza una clase de feromona, la cual se trata de un oligopéptido que se une a su receptor específico presente en la membrana de las células del tipo sexual opuesto. Así, una estirpe *h⁺* de *S. pombe* secreta factor P que se une a su receptor Mam2p presente en la membrana plasmática de las células *h⁻*; por su parte, estas células *h⁻* segregan factor M, que se une a su receptor Map3 localizado en la membrana de las células *h⁺* (Obara et al., 1991). En *S. cerevisiae* las células secretan factor \underline{a} , que se une a su receptor Ste3, o bien liberan factor $\underline{\alpha}$ que es el ligando del receptor Ste2 (Elion, 2000). En ambas levaduras la transmisión de la señal se lleva a cabo a través de un módulo de MAP quinasas. En *S. pombe* la unión de la feromona a su receptor promueve que una segunda proteína G heterotrimérica active la cascada de señalización que permite que el factor de transcripción Ste11p continúe promoviendo la transcripción de diferentes genes necesarios para el desarrollo sexual (Merlini et al., 2013). Como consecuencia, se produce una parada de ciclo en G1, cuyo fin es asegurar que ambas células se encuentren en la fase del ciclo correcta en el momento de la conjugación.

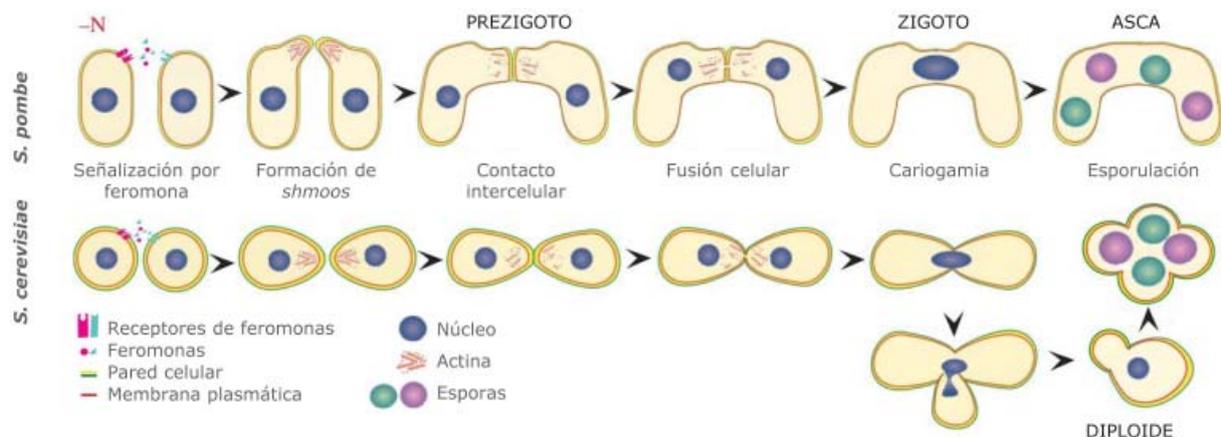


FIGURA 2:

Fases del proceso de conjugación en levaduras. Representación de las distintas etapas del proceso. En *S. pombe* la falta de nitrógeno activa la conjugación cuando están presentes células de tipos sexuales complementarios. En *S. cerevisiae* las células de tipos sexuales opuestos son capaces de conjugarse en medio rico formando diploides que no esporulan hasta que las condiciones de nutrientes son limitantes. En ambos organismos tras el intercambio de feromonas, las células crecen de manera polarizada hacia el otro *shmoo*, lo que favorece la fusión y que posteriormente se produzca la cariogamia y la esporulación. Adaptación de Merlini et al., 2013.

En este punto las células emiten una proyección hacia la fuente de feromona, que es el compañero de tipo sexual opuesto, desarrollándose así los característicos *shmoos*. Este crecimiento polarizado facilita el contacto intercelular, que inicialmente está mediado por puentes de hidrógeno y por tanto es reversible (Nielsen, 2004). A continuación las aglutininas Mam3p en células *h⁻*, y Map4p en *h⁺* (Mata y Bahler, 2006; Sharifmoghadam et al., 2006; Sharifmoghadam y Valdivieso, 2008), que son adhesinas específicas de cada tipo sexual localizadas en la pared celular, interaccionan entre sí reforzando la unión entre las células

que están conjugando. En *S. cerevisiae* las aglutininas son Aga1 y Sag1 en los tipos sexuales α y a respectivamente (Cappellaro et al., 1991). La interacción entre las aglutininas de los *shmoo*s de tipos sexuales opuestos hace que el contacto entre *shmoo*s sea estable a partir de este momento, dando lugar a los denominados "prezigotos" (Calleja et al., 1977).

Las levaduras están rodeadas por una estructura externa a la membrana plasmática denominada pared celular, que se ha propuesto que es el equivalente a la matriz extracelular de los mamíferos. Se trata de un exoesqueleto que permite soportar la presión interna y que proporciona a la célula una barrera protectora contra condiciones ambientales como la temperatura y los diferentes cambios osmóticos del medio. Además, dota a la célula de un escudo de protección contra el posible ataque de otros microorganismos. Como se ha mencionado, el contacto entre las aglutininas de la pared celular es un requisito para la formación del cigoto. La pared celular de hongos contiene glicoproteínas y polisacáridos dispuestos en diferentes capas fibrilares. En el caso de *S. pombe*, está compuesta principalmente por α -glucano y β -glucano, y en menor proporción por galactomanano (Horisberger y Rouvet-Vauthey, 1985). Por su parte, la pared celular de *S. cerevisiae* está compuesta por β -glucano, quitina y manoproteínas (Fleet, 1991). La pared celular, a pesar de su rigidez, no es una estructura estática sino que es altamente dinámica ya que sufre continuamente procesos de remodelación. Las enzimas β -glucansintasas (Bgs) en *S. pombe* son las encargadas de la síntesis de β -glucano, mientras que las glucanasas son las responsables de su degradación. Cuando la unión entre dos *shmoo*s es estable debido a la acción de las aglutininas, la pared celular que las separa se degrada gracias a la actuación de varias clases de glucanasas que se acumulan en la zona de contacto intercelular (Dudin et al., 2015). La degradación de la pared celular permite que las membranas plasmáticas de los dos *shmoo*s entren en contacto y se fusionen, lo que a su vez permite la difusión del contenido citoplasmático procedente de ambas células (Calleja et al., 1977). A continuación tiene lugar la cariogamia generándose un cigoto diploide. Como se ha comentado anteriormente, en *S. pombe* los diploides son inestables, de manera que la meiosis ocurre inmediatamente después de su formación (Davey, 1998; Nielsen, 2004; Yamamoto et al., 1997).

3. MUTANTES CON DEFECTOS EN LA FUSIÓN CELULAR DURANTE LA CONJUGACIÓN

Distintos estudios sobre el proceso de conjugación han permitido a la caracterización de mutantes con defectos en alguno de los eventos que tienen lugar durante dicho proceso. Uno de los pasos clave para que la conjugación se desarrolle de forma eficiente es la fusión de las membranas plasmáticas de los *shmoo*s de tipos sexuales opuestos. Cuando la fusión celular no consigue completarse de forma correcta, en los cultivos se produce una

acumulación de prezigotos que no consiguen desarrollar cigotos ni ascas. Se ha observado que mutantes en genes que regulan distintos pasos de la conjugación acumulan prezigotos en las mezclas de conjugación, lo que denota la relación de dichos genes con la fusión celular.

3.1. Mutantes con defectos en la producción de feromonas

En *S. cerevisiae* se ha descrito una acumulación de prezigotos en mutantes que secretan un nivel reducido de feromonas funcionales (Brizzio et al., 1996; Elia and Marsh, 1996), como son las estirpes *axl1/fus5* (defectiva en una proteasa que procesa el factor α . Chen et al., 1997), *ram1/fus8* (defectiva en la farnesiltransferasa del factor α . He et al., 1991) o *ste6Δ* (defectiva en el transportador necesario para que el factor α salga al exterior celular). En todos estos mutantes los prezigotos que se observan se caracterizan por la existencia de pared celular separando ambos *shmoos* (**figura 3A**). No obstante es posible observar zonas donde la pared celular se ha erosionado parcialmente (se indica con un asterisco). También se detecta una acumulación de vesículas en la zona de fusión (se marca con una punta de flecha). En algunos de estos mutantes se puede observar la presencia de invaginaciones de la membrana plasmática o de la pared celular (se señala con flechas) hacia el citoplasma de uno de los *shmoos*. Dado que las feromonas son características de cada tipo sexual, estos defectos son específicos del tipo sexual, por esta razón aunque el *shmoo* de tipo sexual opuesto sea silvestre, no tiene lugar la fusión celular y por tanto se acumulan prezigotos en los cultivos. Estos estudios llevaron a pensar que la señal para la fusión de membranas podría propagarse a través de la cascada de señalización que se activaría tras la unión de la feromona a su receptor (Brizzio et al., 1996; Elia and Marsh, 1996). De hecho, la MAP quinasa Fus3 es necesaria para una fusión celular eficiente, de manera que en un mutante *fus3Δ* se acumulan prezigotos con la pared celular sin degradar (Elion et al., 1990; Fujimura, 1990).

3.2. Mutantes con defectos en la degradación de la pared celular

En *S. cerevisiae* se ha descrito otro grupo de mutantes que se caracterizan porque el defecto no es tan drástico cuando uno de los parentales es silvestre, lo que indica que el defecto no depende del tipo sexual. Estas cepas presentan mutaciones en los siguientes genes:

- *FUS1*: codifica una proteína transmembrana que se localiza en la punta del *shmoo* (Trueheart et al., 1987).
- *FUS2*: codifica una proteína citoplásmica que se acumula igualmente en la punta del *shmoo* (Elion et al., 1995).

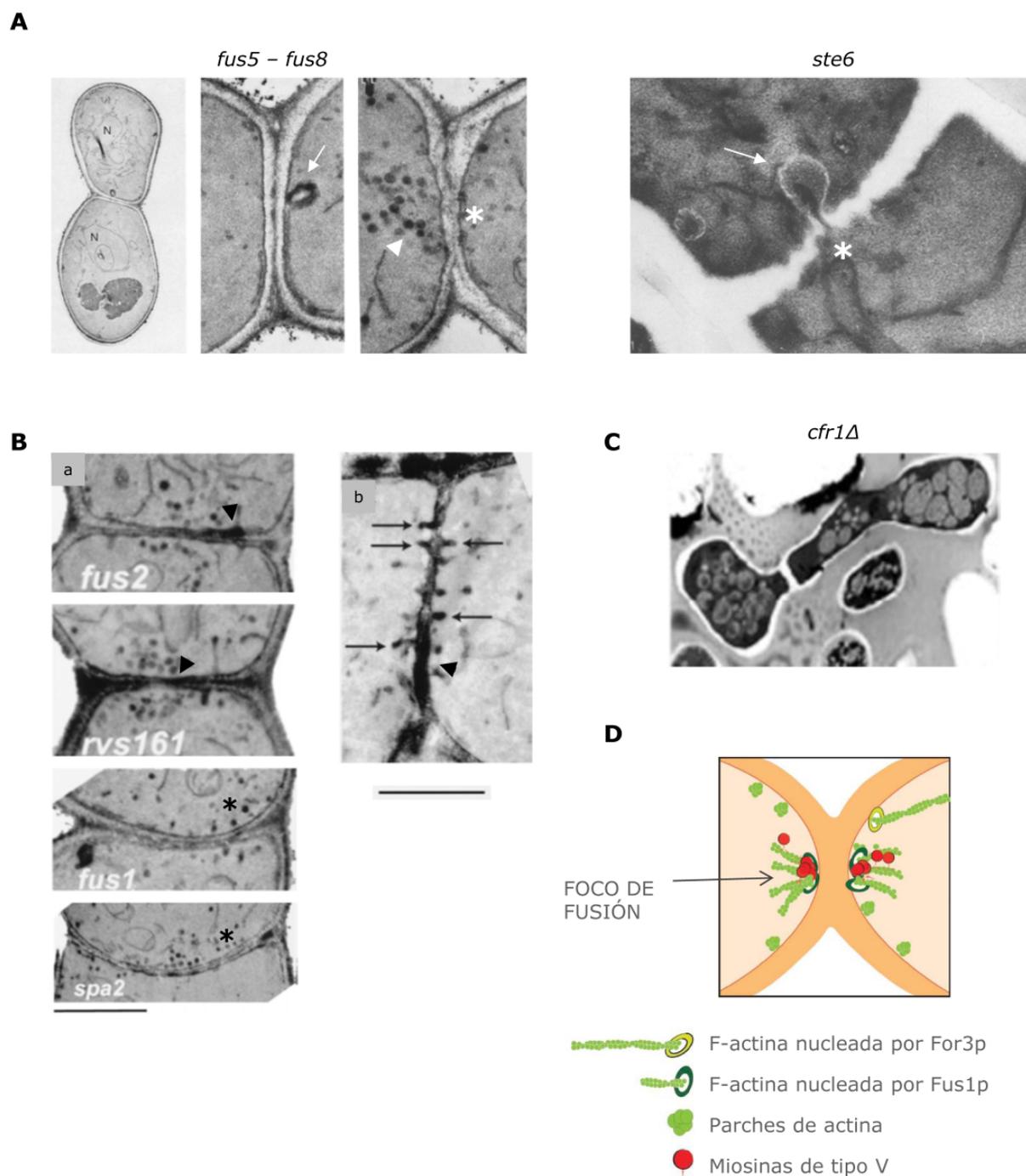


FIGURA 3:

Prezigotos descritos en distintos mutantes que presentan defectos en conjugación. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión. **(A)** Fenotipo de los mutantes *fus5*, *fus8* y *ste6* de *S. cerevisiae*. Las flechas señalan burbujas de pared celular y membrana plasmática, la punta de flecha indica acumulación de vesículas, y los asteriscos denotan adelgazamientos de la pared celular. Adaptaciones de Elia et al., 1996 y Brizzio et al., 1996. **(B)** Fenotipo de los mutantes *fus1*, *fus2*, *rvs161* y *spa2* de *S. cerevisiae*. Los asteriscos indican una disposición más dispersa y en menor número de las vesículas que se localizan en la zona de contacto intercelular. Las flechas señalan invaginaciones de la membrana plasmática, y las puntas de flecha la presencia de placas densas a los electrones. Barras de escala 1 μ m en panel a, y 0,5 μ m en panel b. Adaptación de Gammie et al., 1998. **(C)** Fenotipo del mutante *cfr1Δ* de *S. pombe*. Adaptación de Cartagena-Lirola et al., 2006. **(D)** Esquema de la arquitectura del foco de fusión. En la leyenda se señalan las distintas estructuras de actina que se posicionan en la prolongación de los *shmoos*. Adaptación de Dudin et al., 2015.

- *RVS161*: codifica una proteína con un dominio BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) que genera curvatura en la membrana plasmática (Frost et al., 2009), y que interviene en la fusión celular y en la endocitosis. Interacciona con Fus2p (Gammie et al., 1998).
- *CDC42*: su producto es una GTPasa de la familia Rho, necesaria para la respuesta a feromonas y para definir el sitio de polarización del *shmoo* (Nern and Arkowitz, 2000). Fus2 es un efector Cdc42p (Ydenberg et al., 2012).
- *SPA2*: codifica un componente del polarisoma, un complejo multiproteico que controla el crecimiento polarizado (Sheu et al., 1998). Por lo tanto, Spa2p es necesaria para la polarización del *shmoo*.

Ninguno de estos mutantes es capaz de degradar la pared celular en la zona de contacto intercelular, aunque sí que es posible detectar ciertos adelgazamientos de la misma (**figura 3B**). Fus2p, Rvs161p, y Cdc42p definen una ruta funcional paralela a la integrada por Fus1p (Gammie et al., 1998; Ydenberg et al., 2012). Los mutantes *fus1* y *spa2* presentan una menor cantidad de vesículas de secreción (señaladas con un asterisco en la figura) en la proximidad de la zona de contacto intercelular respecto a las estirpes WT, *fus2*, *rvs161* y *cdc42*; además en los mutantes *fus1* y *spa2* estas vesículas están más dispersas. Por su parte, *fus2* y *rvs161* y *cdc42* presentan unas placas densas a los electrones (se señala en la figura con una punta de flecha) y diversas invaginaciones de la membrana plasmática (se indica con flechas) en las zonas de contacto de los dos *shmoos*. Se ha propuesto que la ruta funcional donde actúan Fus2p/Rvs161p/Cdc42p pudiera intervenir en la fusión de las vesículas de secreción que se sitúan próximas a la zona de fusión, participando así en la secreción de las enzimas necesarias para la degradación de la pared celular. Fus1p y Spa2p intervendrían en la localización de dichas vesículas de manera polarizada (Gammie et al., 1998; Ydenberg et al., 2012).

En *S. pombe* el gen *cfr1*⁺ codifica una proteína del aparato de Golgi implicada en transporte intracelular. Su ausencia conduce a un defecto en conjugación que se caracteriza porque la pared celular que separa las células parentales no se degrada (**figura 3C**), de modo que también se acumulan prezigotos en las mezclas de conjugación. Además en los cultivos de este mutante se observan grupos de varias células conjugando simultáneamente, en lo que parece un fenómeno de polispermia (Cartagena-Lirola et al., 2006), por lo que Cfr1p podría participar en una señalización que inactivara la diferenciación sexual una vez que se ha producido el contacto estable entre los *shmoos*.

3.3. Mutantes con defectos en el citoesqueleto

El citoesqueleto de actina es esencial para la fusión de muchos tipos celulares como osteoclastos, mioblastos y levaduras (Abmayr y Pavlath, 2012). En *S. cerevisiae* se ha

corroborado la importancia de la actina en la fusión celular durante la conjugación, puesto que la delección de algunos genes relacionados con la actina provoca una acumulación de prezigotos. Entre estos genes se encuentran

- *BNI1*: codifica una formina, proteína que induce la polimerización de monómeros de actina (Dorer et al., 1997).
- *SPA2*: como se ha mencionado en el punto anterior, forma parte del polarisoma, e interacciona con Bni1p (Dorer et al., 1997; Fujiwara et al., 1998).
- *TPM1*: codifica la tropomiosina, que se une a filamentos de actina incrementando su estabilidad (Liu y Bretscher, 1992).
- *MYO2*: miosina de tipo V. Esta clase de miosinas transporta cargos deslizándose a lo largo de los filamentos de actina (Liu and Bretscher, 1992).

Por su parte en *S. pombe* también se han descrito distintos mutantes defectivos en procesos relacionados con la actina que presentan defectos en conjugación. Todos estos mutantes se caracterizan porque las células son capaces de aglutinarse y de formar las uniones que estabilizan el prezigoto, pero las paredes celulares de la zona de contacto intercelular no llegan a degradarse, de modo que se produce una acumulación de prezigotos. Las proteínas que codifican estos genes se localizan en la zona de fusión, y basta con que estén presentes en uno de los parentales para que la fusión celular tenga lugar. Estos genes implicados en fusión celular son:

- *cdc3⁺*: codifica la profilina, que se une a monómeros de actina regulando su dinámica de polimerización/despolimerización (Petersen et al., 1998b).
- *cdc8⁺*: codifica la tropomiosina (Kurahashi et al., 2002).
- *fus1⁺*: aunque comparte el mismo nombre que la proteína transmembrana de *S. cerevisiae* no se trata de genes homólogos, ya que en *S. pombe* codifica una formina específica de conjugación (Petersen et al., 1995) que utiliza actina unida a profilina (Scott et al., 2011).
- *myo51⁺* y *myo52⁺*: codifican miosinas de tipo V (Doyle et al., 2009; Dudin et al., 2015).

Además se ha descrito que el tratamiento con latrunculina A (un agente que secuestra los monómeros de actina, impidiendo su polimerización) provoca una disminución de la eficiencia de fusión (Dudin et al., 2015).

También se ha observado que un tratamiento con agentes que desestabilizan los microtúbulos reduce la eficiencia de fusión celular (Petersen et al., 1998a), lo que implica a estas estructuras en dicho proceso.

Tanto la forma Fus1p como las miosinas de tipo V son imprescindibles para la formación del denominado "foco de fusión", que es una estructura de actina F (polimérica) que se acumula en la zona de contacto intercelular. Su formación tiene lugar antes de la fusión celular y desaparece cuando la fusión ha tenido lugar. Esta estructura se genera de manera independiente del anillo contráctil de actina que se forma durante la citocinesis y de los parches y los cables de actina, todas ellas estructuras nucleadas por otras formas diferentes (Cdc12 y For3). El foco de fusión se organiza en forma de áster, en el que los extremos de los cortos filamentos de actina se disponen altamente focalizados muy próximos a la membrana (**figura 3D**) (Dudin et al., 2015). Por lo tanto, en la punta de los *shmoos* aparecen tres estructuras de actina distintas: los cables (necesarios para la secreción), los parches (necesarios para la endocitosis), y el foco de fusión (específico de la conjugación) que permite la concentración polarizada de las vesículas de secreción que transportan las enzimas que degradan la pared celular.

Una serie de análisis genéticos y citológicos demostraron que los genes *cfr1+* y *fus1+* de *S. pombe* no están relacionados funcionalmente, por lo que Cfr1p regula la conjugación a través de una ruta independiente de Fus1p (Cartagena-Lirola et al., 2006). Este dato puso de manifiesto la existencia de varias rutas funcionales implicadas en la fusión celular en *S. pombe*.

3.4. Mutantes con defectos en la fusión de membranas

Con respecto a la maquinaria involucrada directamente en la fusión de las membranas durante la conjugación en levaduras, existen varias familias de proteínas conservadas que están relacionadas con dicho proceso. En *S. cerevisiae* el gen *PRM1* (*Pheromone Regulated Membrane protein*) codifica una proteína con 5 dominios transmembrana que se localiza en la zona de contacto intercelular. La ausencia de Prm1p provoca un descenso de aproximadamente el 50% en la eficiencia de fusión celular, generando una acumulación de prezigotos en los que las paredes celulares se degradan, pero las membranas de los dos *shmoos* permanecen en contacto sin llegar a fusionarse (**figura 4A**). A veces se observan protrusiones en las que parte del citoplasma de una célula invade el de la otra, que se han denominado "burbujas", "ampollas" o "dedos", según los autores. (Heiman y Walter, 2000; Olmo y Grote, 2010b). El hecho de que en el mutante *prm1Δ* las membranas queden próximas, pero no lleguen a fusionarse sugiere que Prm1p pudiera actuar como una fusasa, que son las proteínas que promueven la fusión de membranas (ver más adelante). Sin embargo, sus características estructurales (Prm1p carece de estructuras *coiled-coil* y tiene más de un dominio transmembrana) hacen que no se sepa con seguridad si Prm1p es un auténtico facilitador de la fusión de las membranas, o es un regulador del proceso. Además, Prm1p es necesaria para prevenir la lisis dependiente de contacto en zigotos, lo

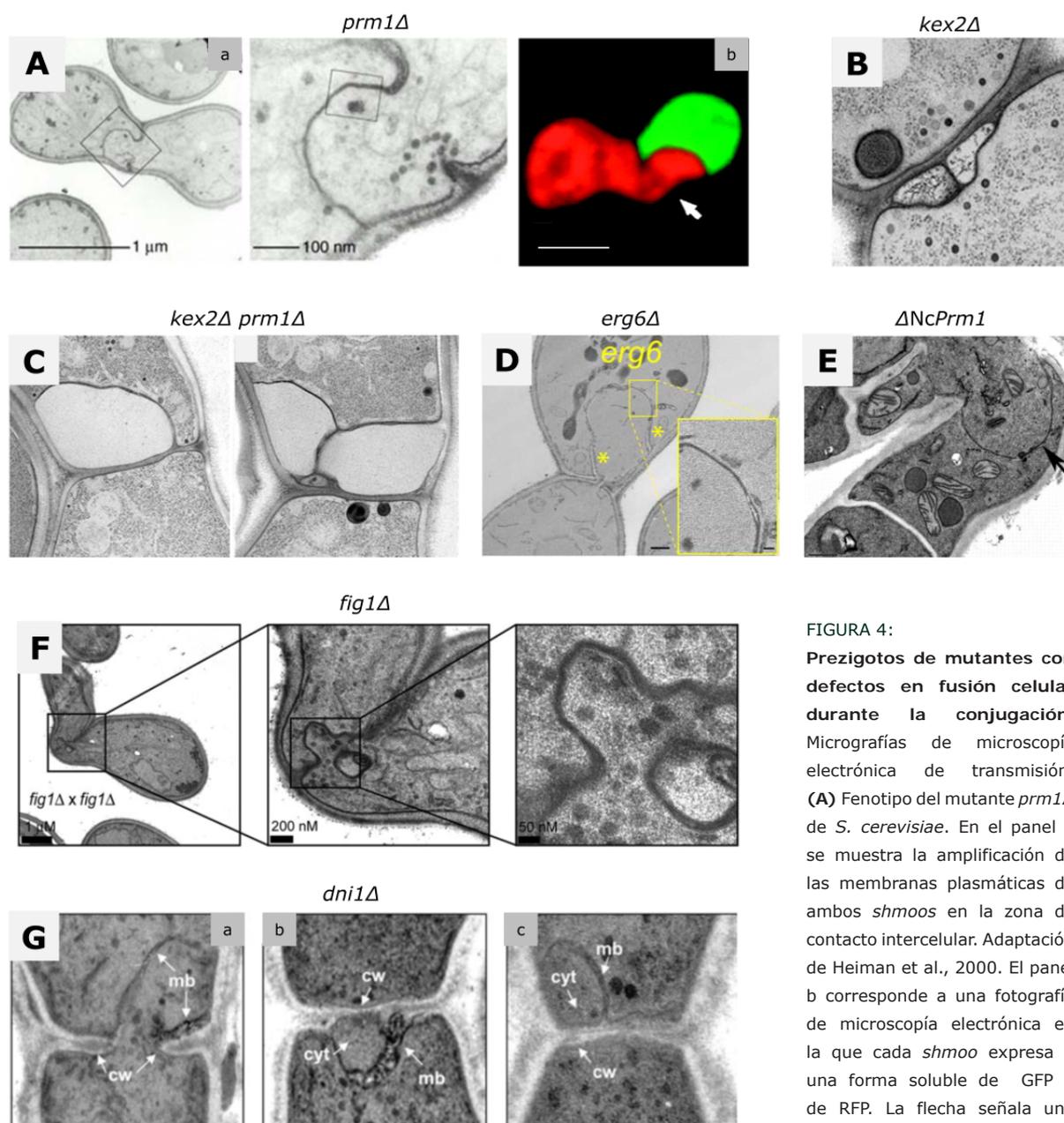


FIGURA 4:

Prezigotos de mutantes con defectos en fusión celular durante la conjugación. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión.

(A) Fenotipo del mutante *prm1Δ* de *S. cerevisiae*. En el panel a se muestra la amplificación de las membranas plasmáticas de ambos *shmoo*s en la zona de contacto intercelular. Adaptación de Heiman et al., 2000. El panel b corresponde a una fotografía de microscopía electrónica en la que cada *shmoo* expresa o una forma soluble de GFP o de RFP. La flecha señala una burbuja. Barra de escala 2 μ m. Adaptación de Jin et al., 2004.

(B) Prezigotos del mutante *kex2Δ*. Adaptación de Heiman et al., 2007. (C) Fenotipo de la estirpe *kex2Δ prm1Δ* de *S. cerevisiae*. Adaptación de Heiman et al., 2007. (D) Prezigoto del mutante *erg6Δ* de *S. cerevisiae*. La amplificación muestra las membranas plasmáticas de los dos *shmoo*s, y los asteriscos indican existencia de pared celular. Barra de escala 2 μ m. Adaptación de Jin et al., 2008. (E) Prezigotos del mutante *prm1Δ* de *N. crassa*. La flecha señala las membranas plasmáticas de los dos parentales. Barra de escala 0,5 μ m. Adaptación de Fleissner et al., 2009. (F) Prezigoto del mutante *fig1Δ* de *S. cerevisiae*. Se muestran distintas amplificaciones de la zona de contacto intercelular. Adaptación de Aguilar et al., 2007. (G) Prezigotos del mutante *dni1Δ* de *S. pombe*. La membrana plasmática se indica como "mb", la pared celular como "cw", y el citoplasma como "cyt". Adaptación de Clemente-Ramos et al., 2009.

que ha llevado a pensar que quizá esta proteína pudiera actuar estabilizando el poro de fusión, es decir el poro inicial que se forma en la membrana plasmática en el momento de la fusión celular (Jin et al., 2004). El defecto en conjugación del mutante *prm1Δ* se corrige al añadir Ca^{2+} al medio (Aguilar et al., 2007). La proteína Prm1 forma homodímeros

mediante la formación de puentes disulfuro en los que están implicadas la cisteína en la posición aminoacídica 120 (en el primer lazo extracelular) de una molécula y la cisteína en la posición 545 (segundo lazo extracelular) de la otra molécula. Estas cisteínas, y por lo tanto la formación de los dímeros, son necesarias para la funcionalidad de la proteína (Engel et al., 2010; Olmo y Grote, 2010a).

KEX2 codifica una proteasa del aparato de Golgi y su delección también provoca una ligera acumulación de prezigotos que se caracterizan porque la pared celular no logra degradarse (**figura 4B**). La mayoría de estos prezigotos presentan una serie de burbujas en la zona de contacto intercelular rodeadas de membrana y sin contacto aparente con el citoplasma, aunque su interior muestra una apariencia similar a la del citosol. Al combinar la delección de *KEX2* con la de *PRM1*, el defecto en fusión se ve incrementado con respecto al que muestran los mutantes simples. Los prezigotos que se acumulan en esta estirpe contienen burbujas rodeadas de membrana plasmática cuyo interior muestra una textura muy diferente a la del citoplasma, como si estuvieran vacías (**figura 4C**) (Heiman et al., 2007). Por otro lado, un defecto en la síntesis de ergosterol también agrava el defecto de *prm1Δ*, y no se debe a una deslocalización de Prm1p. Los prezigotos que se acumulan en un mutante *erg6Δ* presentan un fenotipo similar al de *prm1Δ*, donde las membranas se disponen íntimamente unidas en la zona de contacto intercelular pero sin llegar a fusionarse (**figura 4D**). También se detecta la aparición de protrusiones de una célula dentro de su compañera en cuya base se aprecian fragmentos de pared celular, dispuestos perpendicularmente respecto a la pared celular que separa ambos *shmoo*s (en la figura se indica con asteriscos). Este resultado sugiere que pudiera tratarse de pared celular de nueva síntesis, como consecuencia de la falta de progresión de la fusión. Este tipo de formaciones también se ha observado en prezigotos *prm1Δ* (Jin et al., 2008).

La proteína homóloga a Prm1p en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* se localiza en la zona de contacto intercelular y es necesaria para la fusión celular, tanto en células de tipos sexuales opuestos durante la fertilización, como entre células idénticas durante el crecimiento vegetativo. El fenotipo causado por la eliminación de Prm1p es similar al del mutante *prm1Δ* de *S. cerevisiae*, puesto que la fusión disminuye un 50%, las paredes celulares desaparecen pero las membranas quedan yuxtapuestas sin llegar a fusionarse, y en algunos zigotos se observan protrusiones de una célula sobre otra (**figura 4E**). Además la adición de Ca^{2+} al medio de cultivo revierte el defecto (Fleissner et al., 2009). En *N. crassa* se ha descrito una proteína, denominada Lfd-1, que contiene un dominio transmembrana y es necesaria para la fusión celular. Se localiza en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi. Su homóloga en *S. cerevisiae* es Rsb1p que es una proteína transmembrana que se cree que funciona como un transportador de esfingolípidos de cadena larga. Aunque la delección de *LFD-1* provoca un fenotipo similar al de la delección de *PRM1*, ambos genes actúan en diferentes rutas funcionales (Palma-Guerrero et al., 2014).

Otra proteína necesaria para la fusión de membranas en *N. crassa* es Lfd-2, que también contiene un dominio transmembrana y se localiza en el RE y en el aparato de Golgi. La cepa que carece de Lfd-2 presenta un defecto en conjugación y una lisis dependiente de Ca^{2+} similar a la de los mutantes *lfd-1* (Palma-Guerrero et al., 2015).

Existen varios mecanismos de reparación de membranas dependientes de Ca^{2+} en los que interviene un sensor de este ion divalente denominado sinaptotagmina. La sinaptotagmina está conservada en diferentes especies, desde mamíferos a plantas, e interviene en un mecanismo de reparación basado en exocitosis mediante su interacción con proteínas SNARE, proteínas transmembrana responsables de la fusión de vesículas (Cheng et al., 2015). Tanto en *S. cerevisiae* como en *N. crassa* la lisis dependiente de Ca^{2+} se produce como consecuencia de una fusión ineficiente de las membranas, y la señalización tiene lugar a través de Tcb3p o Syt1p, los homólogos de la sinaptotagmina en *S. cerevisiae* y *N. crassa* respectivamente (Aguilar et al., 2007; Palma-Guerrero et al., 2014).

En *S. cerevisiae* se produce un único momento durante la conjugación en el que las células toman calcio del exterior, coincidiendo con la polarización celular. Existen dos sistemas de toma de calcio en respuesta a feromonas (Muller et al., 2001). El sistema HACS (de *High Affinity Calcium System*) tiene una afinidad alta por el Ca^{2+} , funciona en medio mínimo y requiere la presencia de los canales Mid1 y Cch1. El sistema LACS (de baja afinidad) funciona en medio rico y requiere la presencia de proteínas implicadas en polaridad y de una proteína con cuatro dominios transmembrana denominada Fig1p. Los mutantes carentes del gen *FIG1* muestran un defecto en la toma de Ca^{2+} en respuesta a feromonas (Muller et al., 2001) y además presentan un defecto en la fusión celular. En ausencia de *FIG1* se produce una acumulación de prezigotos en los que se ha digerido la pared celular y las membranas aparecen muy próximas pero sin llegar a fusionarse (**figura 4F**) (Aguilar et al., 2007; Muller et al., 2003), lo que relaciona ambos procesos. Además, Fig1p y la toma de calcio son necesarios para que los *shmoos* no se lisen durante el crecimiento polarizado que ocurre en presencia de las feromonas. Por otro lado, Prm1p y Fig1p colaboran para mediar la fusión de las membranas y para evitar la lisis celular durante la fusión de las células parentales (Aguilar et al., 2007; Jin et al., 2004).

La función de Fig1p como canal de Ca^{2+} de baja afinidad aparece conservada en varios hongos filamentosos. En *N. crassa* Fig1p también es necesaria para la fusión de membranas y para evitar la lisis dependiente de Ca^{2+} (Palma-Guerrero et al., 2015). Además interviene en el desarrollo sexual, ya que en su ausencia se originan cuerpos fructíferos defectuosos (Cavinder y Trail, 2012). En *Candida albicans* Fig1p media el tigmotropismo, que es la capacidad de producir respuesta de crecimiento en relación a cambios en la topología del sustrato, característica relacionada con la patogenicidad. Se localiza en la zona de fusión (Brand et al., 2007), pero no se ha descrito su implicación en dicho proceso. En *Fusarium gramineum* la falta de Fig1p durante el crecimiento vegetativo provoca

una homeostasis defectuosa del Ca^{2+} y un descenso en la tasa de crecimiento que no se reestablece con la adición de Ca^{2+} . También interviene en el desarrollo sexual (Cavinder y Trail, 2012). En *Aspergillus nidulans* la delección de *FIGA* provoca un retraso en el crecimiento hifal que se revierte con la adición de Ca^{2+} . Asimismo Fig1Ap es necesaria para el correcto desarrollo sexual y asexual, y se localiza en los sitios de septación (Zhang et al., 2013).

La familia de proteínas Fig1 pertenece a la superfamilia PMP22/EMP/MP20/Claudina (pfam00822) (Zhang et al., 2006). Aunque los miembros fúngicos muestran una escasa identidad de secuencia con los ortólogos de mamíferos, presentan una topología y una estructura secundaria similar: todos contienen 4 dominios transmembrana, con los extremos N y C intracelulares, y en el primer lazo extracelular presentan la secuencia conservada $\text{G}\Phi\Phi\text{GxC}(8-10\text{aa})\text{C}$ donde $\Phi=\text{F,L,M}$ (Cavinder y Trail, 2012). Esta secuencia es similar a la secuencia consenso de las claudinas de metazoos $\text{GLWxxC}(8-10\text{aa})\text{C}$. Por otro lado, la familia de proteínas Sur7 también muestra la misma topología y una secuencia consenso equivalente a las anteriores: $\text{WxxW/YxxC}(7-10\text{aa})\text{C}$. Se ha descrito que las proteínas de la familia Sur7 se organizan en microdominios extremadamente estables dentro de la membrana, de manera que intervienen en la organización de los eisosomas; los eisosomas son complejos proteicos asociados a la cara citosólica de la membrana plasmática en puntos estáticos que participan en la regulación de la endocitosis. En *S. cerevisiae* estas proteínas están relacionadas con la esporulación y la cantidad de esfingolípidos en las membranas (Young et al., 2002). En *C. albicans* Sur7p es necesaria para una síntesis de pared celular correcta y para que las septinas (proteínas que mantienen la polaridad celular concentrando proteínas de membrana y parches de actina), se dispongan correctamente formando un anillo en la zona del cuello entre la célula madre y la hija (Alvarez et al., 2009; Alvarez et al., 2008). Recientemente también se ha relacionado a Sur7p de *C. albicans* con la distribución de fosfoinosítidos en la membrana plasmática (Wang et al., 2016).

En *S. pombe* el gen *dni1*⁺ codifica una proteína que presenta un 21% de identidad y un 48% de similitud con la proteína Fig1 de *S. cerevisiae* (Clemente-Ramos et al., 2009). El mutante *dni1* Δ se caracteriza por presentar una acumulación de prezigotos (**figura 4G**) en los que se intuyen regiones donde las membranas plasmáticas de los dos *shmoos* aparecen íntimamente asociadas pero sin llegar a fusionarse (panel a). También son frecuentes diversas desorganizaciones de la membrana plasmática en la zona de contacto intercelular (panel b) e incluso la aparición de protrusiones de una célula sobre la otra. A veces la pared celular no llega a degradarse completamente. Por otro lado, el gen *dni2*⁺ muestra un 23% de identidad con *dni1*⁺, y se ha descrito que los mutantes *dni1* Δ , *dni2* Δ y *dni1* Δ *dni2* Δ presentan fenotipos similares. Adicionalmente distintos estudios genéticos han demostrado que los genes *dni1*⁺, *dni2*⁺ y *fus1*⁺ actúan en la misma ruta funcional, aunque no se sabe cómo se relacionan funcionalmente entre sí. Dni1p se detecta en la

punta de los *shmoos* y su correcta localización depende de la actina, puesto que en un mutante *fus1Δ* o en un silvestre tratado con Latrunculina A, Dni1p no aparece concentrado en la punta del *shmoo*, a pesar de permanecer polarizada en la prolongación del mismo. Sin embargo, Fus1p sí que se localiza correctamente cuando Dni1p está ausente. Dni1p también deja de estar concentrado cuando los *shmoos* se tratan con el complejo filipina (compuesto que interfiere con los esteroides de la membrana). Las proteínas Dni1p y Dni2p de *S. pombe* presentan un motivo conservado similar al de las claudinas, e idéntico al de la familia Fig1 (Clemente-Ramos et al., 2009). Aunque en *S. cerevisiae* Fig1p es necesaria para la toma de Ca^{2+} (Muller et al., 2001), esta función no parece estar conservada en la homóloga de *S. pombe*, ya que la falta de Ca^{2+} no reduce la eficiencia de esporulación de *dni1Δ*. No obstante, la adición de Ca^{2+} en altas cantidades rescata parcialmente el defecto en esporulación de *dni1Δ* (Clemente-Ramos et al., 2009).

En genoma de *S. pombe* contiene un gen correspondiente a la ORF SPAP7G5.03 que codifica una proteína con un 24% de identidad y un 44% de similitud con la proteína Prm1p de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en el momento de iniciar este trabajo no se había demostrado la implicación de la proteína que codifica *prm1+* durante la fusión celular en *S. pombe*.

La conjugación en levaduras, por lo tanto, es un proceso complejo que implica la participación de muchas proteínas cuyas funciones son necesarias para la reorganización del citoesqueleto, la degradación de la pared celular y la fusión de las membranas plasmáticas. Los mecanismos moleculares que subyacen este proceso resultan muy interesantes ya que mecanismos similares podrían participar en otros procesos de desarrollo en organismos multicelulares.

4. LA MEMBRANA PLASMÁTICA

4.1 Organización de la membrana plasmática

La membrana plasmática constituye la barrera de la vida, ya que es la estructura que rodea a las células y les confiere individualidad al separarlas de su entorno. Todas las membranas biológicas están compuestas por una bicapa de fosfolípidos que se mueven en el plano lateral. En esta bicapa lipídica se intercalan proteínas que se pueden desplazar a través de ella mediante movimientos laterales o de rotación. Por lo tanto, se trata de una estructura dinámica y no homogénea en la que sus componentes se encuentran en continuo movimiento. Las bases de este modelo de organización para la membrana plasmática, que se denominó "Modelo del mosaico fluido", se sentaron en 1972 (Singer y Nicolson, 1972) y a día de hoy, aunque se han introducido algunas modificaciones, siguen vigentes. Los

fosfolípidos constituyen los lípidos más abundantes de la membrana. El carácter anfipático de estos fosfolípidos determina la estructura de las membranas biológicas: los lípidos de ambas caras orientan sus colas alifáticas apolares hacia el centro de la membrana quedando aislados del medio acuoso por dos láminas formadas por las cabezas hidrofílicas. Las proteínas presentes en las membranas interactúan con los lípidos principalmente a través de fuerzas hidrofóbicas, y en menor medida por fuerzas hidrofílicas (entre las cabezas polares de los fosfolípidos y los grupos polares de las proteínas) (Nicolson, 2013). Existen distintas clases de proteínas que forman parte de las membranas biológicas (Singer y Nicolson, 1972):

- Proteínas integrales o intrínsecas: atraviesan la membrana una o varias veces y se unen a la misma por interacciones hidrofóbicas. Son importantes para la microestructura básica de la membrana.

- Proteínas periféricas o extrínsecas: unidas a la membrana de manera más débil por interacciones electrostáticas en las zonas hidrofílicas. Son importantes para promover actividades enzimáticas, sitios de anclaje de otras proteínas, actuar como andamio o preservar la curvatura (Nicolson, 2013).

- Proteínas asociadas: realmente no son proteínas de membrana en sí, ya que no forman parte de su microestructura ya que su unión a la membrana es reversible. Se trata de proteínas del citoesqueleto o de señalización situadas en la monocapa interna, y glicoproteínas en la monocapa externa. Podrían estabilizar la membrana e inmovilizar componentes en la matriz o en el citoesqueleto, donde actúan como estructuras de adhesión o puntos de movilidad (Nicolson, 1976).

A pesar de la alta movilidad de los elementos que componen las membranas biológicas, éstos deben estar perfectamente acoplados para evitar restricciones energéticas. Por ello lípidos y proteínas no se disponen al azar, sino que necesitan ajustarse mediante un emparejamiento hidrofóbico que sea estable desde el punto de vista energético, de manera que cada proteína se rodea de determinados lípidos y viceversa (Bagatolli et al., 2010).

Las membranas biológicas presentan una elevada variabilidad en su composición lipídica entre diferentes orgánulos, y también entre diferentes tipos celulares (Pomorski et al., 2001). En las células existen cientos de lípidos diferentes y casi todos son constituyentes de membranas. Se ha postulado que la composición lipídica podría intervenir en la función, estructura, topología y/o dinámica de la membrana plasmática (Nicolson, 2013). La deformación elástica de la membrana y la curvatura de la misma también dependen de su composición lipídica. Existen lípidos que proporcionan curvatura positiva (como el fosfoinositol-4,5-bisfosfato) y otros que generan curvatura negativa (diacilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, ergosterol, entre otros) por lo que estos son fundamentales para el mantenimiento de la forma de la membrana, que a su

vez puede ser importante en procesos de fusión, fisión y otras interacciones membrana-membrana (Karunakaran et al., 2012; Teissier and Pecheur, 2007). Por otro lado existen elementos, como los dominios BAR que generan curvatura, que modulan la deformación, curvatura y el estado de compresión-expansión de la membrana. También existen elementos, como las cubiertas de las vesículas, que al insertarse en la membrana sufren cambios conformacionales que les permiten actuar a modo de cuña dentro de la membrana, deformándola y generando curvatura (Antonny, 2006).

La estructura de bicapa impone una elevada barrera energética al movimiento transmembrana de lípidos, por lo que la translocación espontánea de lípidos entre ambas caras es extremadamente infrecuente, lo que favorece el mantenimiento de la asimetría. La hemimembrana interna está enriquecida en fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfoinosítidos, mientras que la hemimembrana externa lo está en fosfatidilcolina y en esfingolípidos; y estos últimos aumentan la afinidad de los esteroides por la monocapa interna. La modificación de esta asimetría está asociada a actividades celulares como adhesión, aglutinación, apoptosis, reconocimiento por células fagocíticas, así como a procesos patológicos (Daleke, 2003). Para el mantenimiento de esta asimetría existen transportadores específicos de lípidos, dependientes de ATP que se denominan "flipasas" (promueven el transporte del lípido hacia la cara citoplásmica de la membrana), "flopasas" (hacia la cara extracelular) y "scramblasas" (transporte bidireccional) (Pomorski et al., 2001). La asimetría de la membrana juega un papel importante en diversas funciones como son el transporte de nutrientes, la endocitosis, la señalización celular o la citocinesis (Sartorel et al., 2014).

4.2. Compartimentalización de la membrana

Los lípidos y proteínas no se distribuyen al azar en el seno de la membrana plasmática, ya que son incapaces de difundir libremente en el plano de la misma. Como consecuencia en la membrana se crean microdominios, que son regiones enriquecidas en un tipo particular de lípidos y/o proteínas, y que por tanto poseen características físicas distintas a las de las zonas contiguas de la membrana (Anderson and Jacobson, 2002). Algunos de los microdominios más estudiados son:

- **Balsas lipídicas (*lipid rafts*):** agrupaciones de esfingolípidos y colesterol que se asocian a proteínas específicas, como aquellas unidas covalentemente a glicosilfosfatidilinositol (GPI), formando una fase muy ordenada. Intervienen en transducción de señales y tráfico de membranas. Estos microdominios son muy dinámicos, presentando una vida muy breve, pero se pueden agrupar formando agregados de mayor tamaño generando así plataformas más estables (Simons and Ikonen, 1997). En *S. pombe*, estos microdominios están compuestos por esfingolípidos y ergosterol y se sitúan en los sitios de crecimiento polarizado de la célula (Wachtler et al., 2003).

- **Microdominios ricos en tetraspaninas (TEM, *tetraspanin enriched microdomain*)**: se trata de una familia de proteínas que comparten una estructura con 4 dominios transmembrana, con los extremos N y C terminales dispuesto hacia el interior celular, y en las que el segundo lazo extracelular tiene una mayor longitud que el primero. Las tetraspaninas forman homo-oligómeros que interactúan con otras proteínas de membrana. En función de las proteínas que las acompañen, intervienen en procesos de adhesión celular y señalización (Hemler, 2005). Las tetraspaninas aparecen en vertebrados, plantas y en algunos organismos inferiores como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, pero aún no se han encontrado en levaduras (Yanez-Mo et al., 2009).

- **Caveolas**: invaginaciones de la membrana plasmática de células epiteliales recubiertas de Caveolina-1 y con un alto contenido en colesterol. Tienen funciones en endocitosis y funcionan como reservorios de colesterol y como mecanosensores (Parton y Simons, 2007). Aunque en levaduras no se han encontrado, podrían estar relacionadas con los denominados MCC (*Membrane compartment containing Can1p*) que se organizan como surcos en la membrana plasmática y están enriquecidos en la proteína Can1p (arginina permeasa) y en esteroides (Olivera-Couto y Aguilar, 2012; Ziolkowska et al., 2012).

Por otro lado, existen nanodominios (de dimensiones mucho más pequeñas que los microdominios) que se forman por asociación pasiva de lípidos y/o proteínas con estructura, hidrofobicidad y/o carga compatible. Los nanodominios pueden fusionarse entre sí para crear unidades mayores, que se establecen como plataformas con funciones específicas (García-Parajo et al., 2014). La capacidad de las proteínas para oligomerizar es suficiente para generar nanodominios en la membrana plasmática (Sieber et al., 2007).

Además de en tamaño, estos dominios especializados de la membrana plasmática pueden diferir en su estabilidad, existiendo dominios muy dinámicos (con una vida media de 60-120 segundos) o ser estáticos y perdurar durante periodos prolongados de tiempo (Olivera-Couto and Aguilar, 2012).

La formación de dominios en la membrana plasmática en mamíferos y levaduras es similar (Ziolkowska et al., 2012). Los mecanismos mediante los cuales se compartimentaliza la membrana, y por tanto permiten la generación de microdominios, son muy diversos:

1. Mecanismos dependientes de energía:

- **Exocitosis y endocitosis focalizada**: la secreción focalizada hace que la membrana se enriquezca en determinados lípidos y proteínas. Estos lípidos y proteínas difunden de manera lateral a lo largo de la membrana, hasta llegar a una zona de endocitosis que se dispone alrededor de la zona de secreción y devuelve los lípidos al interior celular en la membrana de las vesículas endocíticas. De esta manera la endocitosis constituye una barrera que impide que esos lípidos y/o proteínas difundan al resto de la membrana (Trimble and Grinstein, 2015) (**figura 5A**).

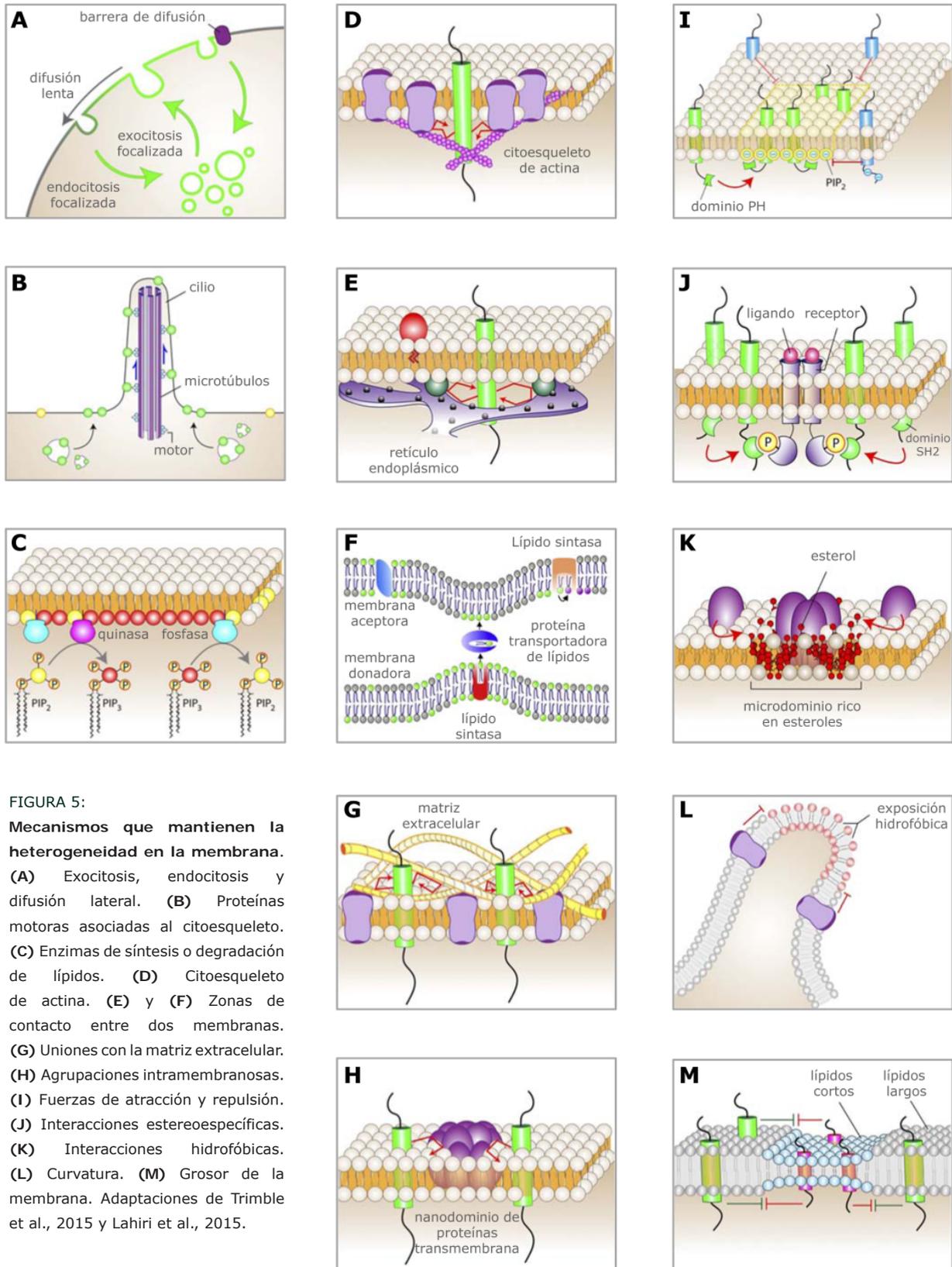


FIGURA 5:
Mecanismos que mantienen la heterogeneidad en la membrana.
(A) Exocitosis, endocitosis y difusión lateral. **(B)** Proteínas motoras asociadas al citoesqueleto. **(C)** Enzimas de síntesis o degradación de lípidos. **(D)** Citoesqueleto de actina. **(E)** y **(F)** Zonas de contacto entre dos membranas. **(G)** Uniones con la matriz extracelular. **(H)** Agrupaciones intramembranas. **(I)** Fuerzas de atracción y repulsión. **(J)** Interacciones estereoespecíficas. **(K)** Interacciones hidrofóbicas. **(L)** Curvatura. **(M)** Grosor de la membrana. Adaptaciones de Trimble et al., 2015 y Lahiri et al., 2015.

- Proteínas motoras asociadas a actina y tubulina: algunas isoformas de miosina (proteína motora asociada a actina) interactúan directamente con la cara interna de la membrana plasmática. Por otro lado, los microtúbulos a veces se disponen muy próximos a la

membrana, por lo que la dineína y/o kinesina (proteínas motoras asociadas a microtúbulos) pueden impulsar componentes de la membrana, incluidas proteínas transmembrana, para que se acumulen en una determinada región. Un claro ejemplo ocurre en cilios y flagelos (Qin et al., 2004) (**figura 5B**).

- Enzimas de síntesis o degradación de lípidos: las quinasas o fosfatasas que modifican fosfoinosítidos, convirtiéndolos en otras especies, permiten que se generen zonas enriquecidas en el producto resultante de la reacción que catalizan (Viaud et al., 2016) (**figura 5C**).

2. Barreras físicas:

- Citoesqueleto de actina: existen proteínas transmembrana que se unen al citoesqueleto de actina que discurre por debajo de la membrana, creando una especie de corralito que impide que otras proteínas transmembrana puedan salir de esa región (Fujiwara et al., 2002) (**figura 5D**).

- Uniones membrana-membrana: las uniones estrechas o uniones ocluyentes (*tight junction* o *zonula occludens*) y las uniones adherentes (*adherent junction*) crean contactos estables entre las membranas de dos células adyacentes, los cuales concentran o inmovilizan proteínas de membrana (van Meer y Simons, 1988; Gulino-Debrac, 2013) (ver más adelante). La misma situación se produce en las zonas de contacto de la membrana plasmática con la de los orgánulos intracelulares (Lahiri et al., 2015) (**figura 5E**). Además, en estas zonas de contacto entre diferentes orgánulos se localizan proteínas transportadoras que permiten el intercambio de lípidos de una membrana a la otra, provocando así un enriquecimiento en una especie determinada (Lahiri et al., 2015) (**figura 5F**).

- Uniones membrana-matriz extracelular: las integrinas y otros receptores se unen a la matriz extracelular; si estas proteínas se acumulan en una zona de la membrana pueden impedir la difusión de otras proteínas que tengan mayor movilidad (Paszek et al., 2014) (**figura 5G**).

- Agrupaciones intramembranas: los propios nano y microdominios pueden dificultar el movimiento de otros componentes de la membrana con una velocidad de difusión más rápida (Trimble y Grinstein, 2015) (**figura 5I**).

3. Agrupaciones específicas

- Impedimentos electrostáticos: los lípidos o proteínas se atraen si presentan cargas opuestas y se repelen cuando las cargas son similares. Por tanto, la presencia de componentes cargados podría inmovilizar proteínas con carga. Además, muchas proteínas

contienen aminoácidos básicos hidrofílicos que facilitan que la proteína se rodee de lípidos cargados negativamente, creando así un anillo de carga negativa alrededor de esa proteína (McLaughlin and Murray, 2005) (**figura 5I**).

- Interacciones estereoespecíficas: las proteínas o lípidos se reconocen a través de interacciones que requieren un plegamiento terciario particular. Algunos ejemplos son los dominios PH presentes en algunas proteínas que se unen a fosfolípidos (Lemmon, 2008), o los dominios SH2 que se unen a fosfotirosina (Pawson, 2004) (**figuras 5I y 5J**).

- Interacciones hidrofóbicas: determinadas proteínas presentan preferencia por dominios ricos en esteroides (Zajchowski y Robbins, 2002) (**figura 5K**).

- Curvatura: las cabezas polares de los lípidos que constituyen la monocapa cóncava de la membrana se deben situar muy próximos entre sí, lo que genera un empaquetamiento que estaría alterando la difusión. Por otro lado, los lípidos que se localizan en la monocapa convexa se disponen mucho más distendidos, por lo que el núcleo hidrofóbico se encuentra más expuesto y se promueve la unión de proteínas con residuos hidrofóbicos expuestos. Asimismo, los dominios BAR se asocian a regiones con elevada curvatura, de manera que el ensamblaje de muchas proteínas con este tipo de dominios podría generar barreras de difusión (Trimble y Grinstein, 2015) (**figura 5L**).

- Grosor de la membrana: está condicionado por la longitud de los ácidos grasos de los fosfolípidos que la integran. Regiones con una longitud corta constituyen un ambiente desfavorable para la inserción de proteínas y lípidos con mayor longitud, ya que las moléculas tratan de minimizar la exposición de sus grupos hidrofóbicos (Bigay y Antony, 2012) (**figura 5M**).

4.3. Las claudinas

Como se ha mencionado en el punto anterior, las uniones estrechas representan un mecanismo especial que permite la compartimentalización de la membrana plasmática. Estas estructuras son características de epitelios y endotelios. La membrana plasmática de las células epiteliales presenta una composición de lípidos y proteínas diferente en las caras apical y basolateral, siendo esta característica la responsable de su polaridad (Simons y Fuller, 1985). El mantenimiento de esta diferencia en la distribución de lípidos y proteínas se atribuye a la existencia de una barrera que impide la difusión lateral en la membrana plasmática. Las uniones estrechas constituyen dicha barrera al estar compuestas por un complejo multiproteico que forma contactos intercelulares y que limita la permeabilidad paracelular (Trimble y Grinstein, 2015) (**figura 6A**). Sin embargo, esta barrera parece estar limitada a la cara externa de la membrana, ya que los lípidos de la cara interna sí que son capaces de difundir libremente por toda la

membrana (Dragsten et al., 1981). Una hipótesis alternativa que se ha propuesto es que la hemimembrana externa entre dos células epiteliales permanece en estado de hemifusión, en el que únicamente se mezclan las capas externas de dos membranas adyacentes (ver sección 4.1.); este estado de hemifusión sería responsable de frenar la difusión en la monocapa externa (Kachar y Reese, 1982) (**figura 6B**). Existen trabajos en los que se ha demostrado la difusión de sondas lipídicas desde una célula a la adyacente, lo que estaría de acuerdo con el estado de hemifusión (Greibenkamper y Galla, 1994; Laffafian y Hallett, 2007). Sin embargo, también se ha postulado la incapacidad de otros lípidos de pasar de una célula a otra (van Meer et al., 1986). Dada esta discrepancia, se ha propuesto un modelo híbrido en el que la barrera de difusión proporcionada por las uniones estrechas está mediada tanto por lípidos como por proteínas (Lee et al., 2008).

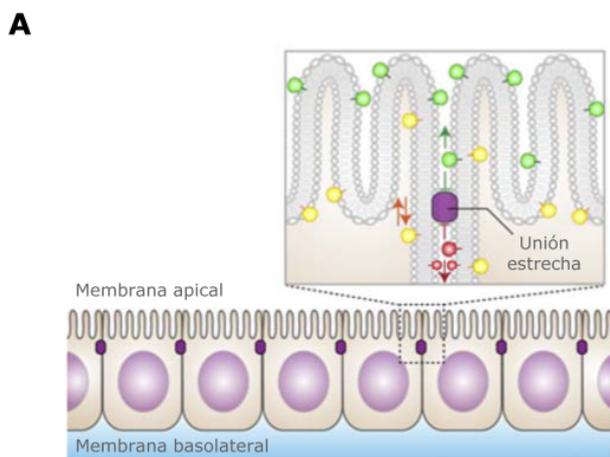
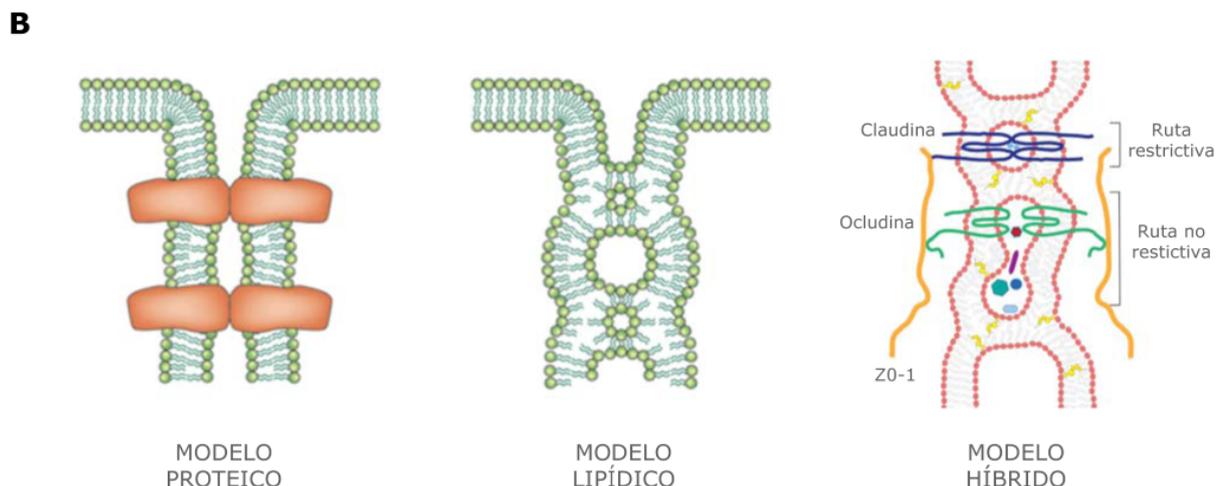


FIGURA 6:

Uniones estrechas como barreras de difusión en la membrana plasmática. (A) Unión estrecha en células epiteliales. En la ampliación se muestra que esta estructura impide el paso de lípidos desde la membrana apical (marcados en verde) a la basolateral (en rojo), y viceversa. Los lípidos presentes en la hemimembrana interna (amarillo) son capaces de difundir entre ambas regiones. **(B)** Diferentes modelos que explican la propiedad de barrera de las uniones estrechas. En el modelo proteico, son proteínas transmembrana quienes ejercen la restricción, mientras que en el modelo lipídico, es una consecuencia del establecimiento de un estado de hemifusión, en el que las monocapas externas se fusionan pero no así las internas. En el modelo híbrido, las proteínas organizan los lípidos para que se genere el estado de hemifusión. Las proteínas a su vez formarían un poro que permitiría el paso de pequeñas moléculas (ruta restrictiva), y el estado de hemifusión daría lugar a micelas invertidas que permitirían el paso de macromoléculas (ruta no restrictiva). Adaptaciones de Tsukita et al., 2001; Trimble et al., 2015; y Lingaraju et al., 2015.



Además de la función como barrera de difusión, las uniones estrechas actúan controlando la permeabilidad selectiva a través del espacio paracelular (entre dos células) determinando así las propiedades de permeabilidad del epitelio o endotelio que las contiene (Findley y Koval, 2009). Las uniones estrechas constituyen aposiciones de membrana entre dos células adyacentes y contienen varias clases de proteínas transmembrana como ocludinas, tricelulinas y claudinas, con 4 dominios transmembrana, o JAMs (*Junctional Adhesion Molecules*) con un paso transmembrana, así como proteínas de membrana periféricas como las ZO (*Zonula Occludens*) (Mitic et al., 2000).

Las claudinas se descubrieron en 1998 (Furuse et al., 1998) y constituyen el componente mayoritario de las uniones estrechas (Morita et al., 1999). Pertenecen a la superfamilia de proteínas tetraspán PMP22/EMP/MP20/claudinas (pfam0082) (Van Itallie y Anderson, 2006). Las claudinas conforman una familia multigénica: en mamíferos se han descrito 27 (aunque no todas aparecen en todas las especies) y son específicas de tejido. Parece que se han originado por duplicación génica: algunas se sitúan en el mismo cromosoma separadas por pocos pares de bases y son muy similares en su secuencia y en el ordenamiento intrón/exón (Lal-Nag y Morin, 2009). Todas ellas tienen un peso molecular entre 22-24 KDa (pudiendo llegar hasta 34 KDa), poseen 4 hélices transmembrana y presentan los extremos N y C terminales orientados hacia el interior celular (Krause et al., 2008). En la mayoría de las claudinas se repiten una serie de características estructurales (**figura 7**):

- El extremo N-terminal es corto, de unos 4-5 residuos.
- El primer lazo extracelular está compuesto por unos 60 residuos y contiene una secuencia consenso conservada en las claudinas. Dentro de esta secuencia conservada aparecen dos cisteínas que podrían formar un puente disulfuro intramolecular que aumentaría la estabilidad de la proteína y favorecería su correcto plegamiento, siendo por lo tanto estas cisteínas necesarias para su función. Parece ser que esta región forma el revestimiento del poro de las uniones estrechas y contiene algunos aminoácidos cargados que podrían ser responsables de la selectividad de la carga paracelular.
- El lazo intracelular contiene unos 15-20 residuos.
- El segundo lazo extracelular es más corto que el primero, consistiendo en unos 24 residuos. Interviene en la formación de dímeros con las claudinas de células adyacentes mediante interacciones hidrofóbicas entre residuos aromáticos conservados.
- El extremo C-terminal es la porción más variable, tanto en secuencia como en longitud. Normalmente está formado por entre 21 y 63 aminoácidos, pudiendo

llegar hasta 106. Contiene un dominio de unión a motivos PDZ que ayuda a anclar proteínas transmembrana al citoesqueleto y a mantener unidos los complejos de señalización. Los motivos PDZ (de PSD95, DlgA, ZO-1; primeras proteínas en las que se detectó) aparecen en diversos tipos de proteínas andamio. Antes de este motivo de unión a PDZ existe una región para dirigir las proteínas a las uniones estrechas. El extremo C-terminal también actúa como determinante de la estabilidad de la proteína y contiene sitios de palmitoilación y fosforilación (Gunzel y Yu, 2013; Lal-Nag y Morin, 2009).

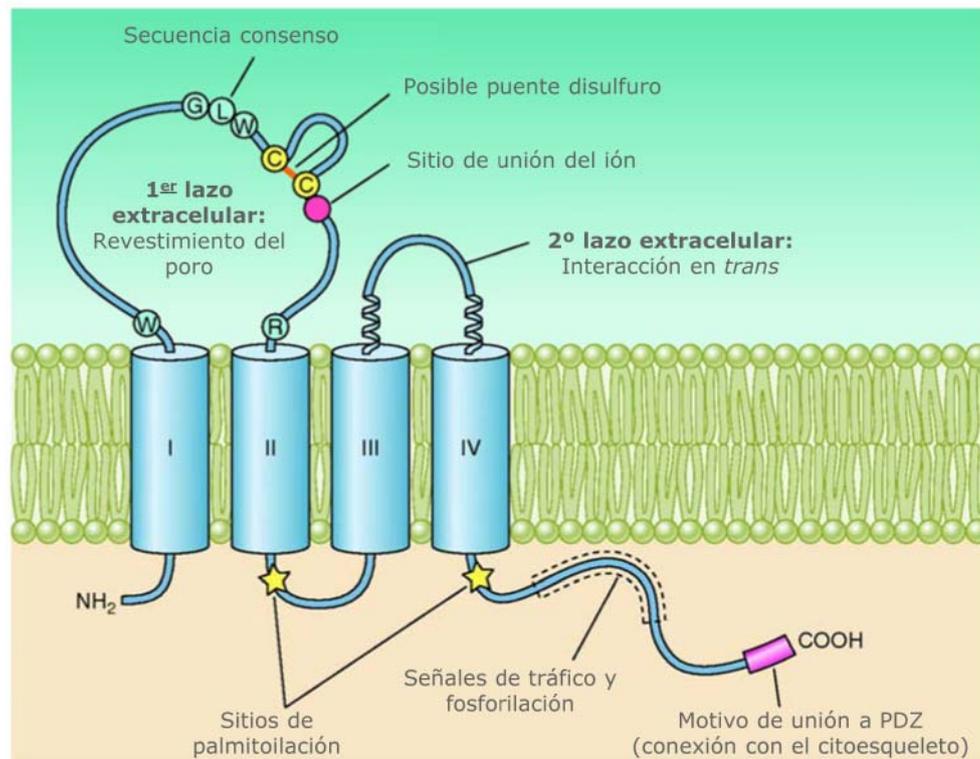


FIGURA 7:
Estructura típica de claudinas. El modelo muestra la topología y la estructura secundaria, así como los posibles dominios funcionales. Los números romanos indican los dominios de α -hélices transmembrana según predicciones informáticas. Adaptación de Gunzel et al., 2013.

Las claudinas muestran tendencia a insertarse en balsas lipídicas (Koval, 2013). Estas proteínas pueden establecer interacciones consigo mismas (interacciones homotípicas) pero también con otras claudinas diferentes (heterotípicas). también pueden interactuar con otras proteínas de las uniones estrechas que estén en la misma célula (interacciones *cis*) o con los componentes de la célula adyacente (interacciones *trans*). La interacción entre claudinas da lugar a complejos que varían en tamaño y estabilidad: dímeros estables, oligómeros que rodean el poro paracelular, y largos polímeros que parecen hebras (Koval, 2013). Algunas claudinas necesitan específicamente otra claudina para translocarse e insertarse en las uniones estrechas y/o para desarrollar su función (Hou et al., 2009). Las claudinas se pueden dividir funcionalmente en formadoras de poro o formadoras de barrera (Krause et al., 2008).

Las claudinas son las principales responsables de la permeabilidad paracelular de las uniones estrechas puesto que son capaces de formar el poro selectivo (Colegio et al., 2003). Algunas pueden formar el poro por sí mismas y otras necesitan interactuar de manera específica con otras claudinas para formarlo. Según qué claudinas lo integren, la especificidad del poro será diferente (Gunzel y Yu, 2013). La permeabilidad de las uniones estrechas depende de dos poblaciones de poros: un poro pequeño que constituye la ruta restrictiva, permeable a iones pequeños y solutos neutros, y otro mucho más grande denominado ruta no restrictiva (*leak pathway*) que es permeable a macromoléculas. Las claudinas parecen ser las principales responsables de la ruta del poro pequeño (unos 4Å) (Turner et al., 2014).

Las claudinas también aparecen frecuentemente fuera de las uniones estrechas. En este caso, son responsables de la formación de contactos celulares no convencionales, de interacción con receptores y otras moléculas de adhesión, y de procesos de señalización intracelular (Gunzel y Yu, 2013).

Esta familia de proteínas está íntimamente relacionada con multitud de enfermedades tales como cáncer, inflamación, esclerosis múltiple, enfermedades oculares, digestivas e infecciones víricas y bacterianas (Forster, 2008; Krug et al., 2014). Por esta razón ahondar en el conocimiento tanto de las claudinas en sí como de las funciones que regulan resulta de vital importancia, tanto desde un punto de vista biológico como médico.

5. FUSIÓN DE MEMBRANAS

5.1. Mecanismo general de fusión de membranas

La fusión de membranas es el proceso mediante el cual dos bicapas lipídicas independientes se mezclan para dar lugar a una sola (Martens y McMahon, 2008). A pesar de la variabilidad existente en su composición, se cree que la mayoría de las fusiones de las membranas biológicas (si no todas) ocurren mediante un mecanismo similar, que se desarrolla a través de un intermediario de hemifusión. Se trata de un estado en el que se produce mezcla de las monocapas proximales pero no de las más distales (Chernomordik y Zimmerberg, 1995) (**figura 8**). La formación del estado de hemifusión se favorece por la presencia en la hemimembrana externa de lípidos que generan curvatura negativa, y se puede inhibir a causa de lípidos que promuevan la curvatura positiva (Teissier y Pecheur, 2007). El modelo actualmente vigente para la fusión de las membranas lipídicas es el denominado "*stalk model*" (**figura 8**). Este modelo postula que inicialmente las dos bicapas que van a fusionarse deben aproximarse, para lo que han de vencerse las fuerzas electrostáticas repulsivas generadas entre las cabezas polares de los lípidos y las fuerzas de hidratación. A continuación tiene lugar una perturbación de los lípidos, que permite que una pequeña área de las monocapas proximales se curve produciendo una

estructura en forma de tallo o "stalk". Seguidamente se forma el estado de hemifusión, que evoluciona permitiendo la apertura de un pequeño poro acuoso (de unos 2 nm) que comunica los compartimientos delimitados por las membranas que van a fusionarse, y que debe expandirse para completar la fusión de las membranas. La formación del poro de fusión tiene lugar en microsegundos y es capaz de expandirse totalmente en 10-20 milisegundos (Jahn et al., 2003). El intermediario de hemifusión constituye un estado estable (Wong et al., 2007); sin embargo, el poro de fusión en algunos casos se expande de manera irreversible (Lindau y Almers, 1995), mientras que en otros se vuelve a cerrar (Ales et al., 1999). En el modelo de hemifusión el poro de fusión es lipídico, pero existe una hipótesis alternativa en la que se postula que el poro está formado por proteínas transmembrana (Jackson y Chapman, 2006).

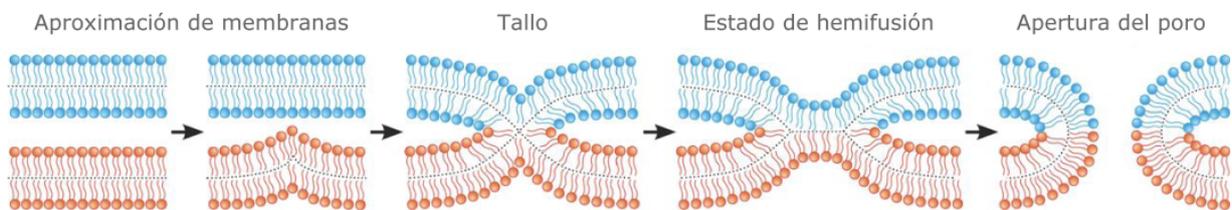


FIGURA 8:

Mecanismo universal de fusión de membranas. La fusión de todas las membranas se produce a través del intermediario de hemifusión en el que existe una mezcla de las monocapas externas proximales de cada membrana pero no así de las monocapas internas. Adaptación de Churchward et al, 2009.

Debido al gran gasto energético que conlleva la formación de los estados intermediarios en la fusión de membranas, generalmente la fusión no ocurre espontáneamente en membranas lipídicas libres de proteínas. Las funciones de las proteínas en el proceso son: aproximar las dos membranas, generar curvatura y remodelar la membrana y/o regular la composición de lípidos y proteínas. Aunque el estado de hemifusión parece estar conservado, las proteínas que intervienen en la fusión no lo están, de manera que pueden ser de naturaleza muy diferente y no estar relacionadas estructuralmente (Martens y McMahon, 2008).

Las proteínas que intervienen en la fusión de membranas, como las proteínas de fusión víricas o las SNAREs que intervienen en la fusión de vesículas, suelen tener un paso transmembrana. Además existen proteínas facilitadoras de la fusión con diferente número de dominios transmembrana: 7 en el caso del receptor de quimiocinas (que interviene en la fusión del virus del sida), 4 en el caso de CD9 (una tetraspanina necesaria para la fusión del óvulo y el espermatozoide) y 4 también, aunque con diferente orientación, en el caso de las SCAMPs (que intervienen en la exocitosis) (White y Rose, 2001).

Se denomina "fusógeno" o "fusasa" únicamente a aquellas proteínas que intervienen directamente en la fusión de membranas, de manera que son necesarias y suficientes

para que se produzca la fusión celular (Aguilar et al., 2013). La mayoría de los fusógenos contienen un único paso transmembrana. Tras la activación correspondiente sufren un cambio conformacional que deja expuesto el péptido de fusión, el cual interacciona con la membrana provocando la desestabilización de la misma y la fusión. A menudo presentan dominios *coiled-coil* (White y Rose, 2001), que son un motivo integrado por varias hélices con una distribución de residuos muy característica que hace que, para su estabilización, las hélices deban enrollándose a otra similar formando una superhélice (Phillips, 1992). A parte de las proteínas víricas y las SNARE (White y Rose, 2001; Podbilewicz, 2014) únicamente se han identificado fusógenos en *C. elegans* y en la placenta de mamíferos (Mohler et al., 2002; Blaise et al., 2003; Sapir et al., 2007). Dado que en otros organismos también se producen procesos de fusión de membranas, éstos deben poseer fusógenos que los faciliten.

Por su parte, los lípidos actúan como reguladores y facilitadores de la fusión de membranas reclutando subunidades de fusasa y permitiendo intermediarios con elevada curvatura en la membrana (Chernomordik y Kozlov, 2008). Es decir, la composición lipídica puede jugar un papel tanto directo como indirecto en la fusión de membranas. La fosfatidiletanolamina (PE) posee una forma cónica por lo que es capaz de incrementar la curvatura negativa en las membranas y facilitar la fusión celular. Las fosfolipasas pueden metabolizar los fosfolípidos en lisofosfolípidos, los cuales, además de intervenir en señalización, tienen forma de cono invertido, y por ello podrían inhibir la formación del estado de hemifusión cuando están presentes en la hemimembrana externa incrementando la curvatura positiva de la misma (Chernomordik y Kozlov, 2005). De esta forma, los lípidos podrían inducir cambios conformacionales en las proteínas o incluso crear un entorno local alrededor de los fusógenos que favoreciese sus propiedades de fusión (Teissier y Pecheur, 2007). Además, los lípidos también podrían influenciar la conformación óptima de proteínas con actividad catalítica modificando las propiedades biofísicas de la membrana. De esta forma se ha postulado que la reorganización de microdominios lipídicos podría modular la localización de proteínas de señalización y por tanto controlar sus cascadas intracelulares (Ibarguren et al., 2014). Por estas razones, es concebible la existencia de varias proteínas que pudieran regular diferentes aspectos de la composición lipídica de las zonas de la membrana a fusionar.

5.2. Importancia de la fusión de membranas

La fusión de dos o más células para formar un híbrido más grande es una reacción universal necesaria para infinidad de procesos biológicos como la reproducción sexual (fusión óvulo-espermatozoide) y el desarrollo de células multinucleadas incluyendo las fibras musculares, trofoblastos de la placenta y los osteoclastos. Asimismo la fusión

celular contribuye a la progresión de enfermedades como las infecciones víricas y algunos cánceres (Aguilar et al., 2013) Por otra parte, la fusión de membranas es esencial para la regeneración tisular por células madre y para el tráfico vesicular que ocurre en el interior celular (Chen et al., 2007). Este proceso, lejos de estar restringido a mamíferos, tiene lugar en toda la escala biológica. La fusión celular es parte del mecanismo de esporulación en algunas bacterias y de la formación de los nanotubos que conectan las bacterias individuales en biofilms. En nematodos más de un 30% de las células somáticas se fusionan para dar lugar a diversos órganos. En artrópodos se produce una fusión de mioblastos durante la formación del músculo, y la cicatrización de heridas en algunos insectos requiere la fusión de células epidérmicas. En plantas la fusión celular tiene lugar durante la doble fertilización necesaria para la formación del embrión y del endospermo, cuya función es la nutrición del embrión. Además la fusión celular constituye una herramienta utilizada por científicos para la creación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, así como para la clonación de organismos, como en el caso de la oveja Dolly (Podbilewicz, 2014).

En el caso de hongos y levaduras, la fusión celular es imprescindible para que la conjugación se desarrolle eficientemente (White y Rose, 2001). Por lo tanto, la caracterización del proceso de conjugación en levaduras constituye una herramienta muy útil para conocer los mecanismos por los que se lleva a cabo la fusión de membranas y su regulación, así como para la identificación de nuevas proteínas implicadas en dicho proceso.



Antecedentes y Objetivo



En un estudio sistemático del nivel de expresión génica, los genes de *S. pombe* se han agrupado en función del momento en el que alcanzan el pico de expresión máxima en respuesta a la falta de nitrógeno (Mata et al., 2002), una condición ambiental que induce el desarrollo sexual y la conjugación. El grupo de genes incluidos en el *cluster* denominado “*Genes induced in response to nitrogen starvation (delayed)*”, tiene su máximo nivel de expresión a las tres horas de incubación en estas condiciones. Aunque el estudio se llevó a cabo utilizando células diploides, el grupo de genes “*delayed*” se contiene la formina *fus1+* y algunos genes necesarios para el desarrollo sexual (incluyendo algunos genes necesarios para la producción de feromonas y sus receptores).

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar el proceso de fusión celular durante la conjugación. Con el fin de identificar nuevos genes que participen en este proceso se han estudiado algunos genes, de función desconocida, que se incluyeron en el grupo de genes “*delayed*”. Los genes caracterizados hasta el momento han sido:

- *map4+*: codifica la aglutinina específica del tipo sexual *h+* (Sharifmoghadam et al., 2006; Sharifmoghadam y Valdivieso, 2008).
- *dni1+*: codifica una proteína con cuatro dominios transmembrana que presenta cierta similitud con claudinas. Es necesaria para que las envueltas celulares se reorganicen de forma correcta durante la conjugación (Clemente-Ramos et al., 2009).
- *dni2+*: codifica una proteína similar a *Dni1*, con la que también comparte las características estructurales de las claudinas. La función de *Dni2* no se ha caracterizado en detalle. Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que los mutantes *dni1Δ*, *dni2Δ* y *dni1Δ dni2Δ* presentan fenotipos similares, caracterizados por un defecto en la fusión celular (Clemente-Ramos et al., 2009). Estudios genéticos han demostrado que los genes *dni1+*, *dni2+* y *fus1+* actúan en la misma ruta funcional, aunque no se sabe cómo se relacionan funcionalmente entre sí.

Por otro lado, el gen correspondiente a la ORF SPAP7G5.03 codifica una proteína similar a la proteína *Prm1p* de *S. cerevisiae*. En los estudios masivos llevados a cabo en *S. pombe* (Mata et al., 2002; Mata y Bahler, 2006), *prm1+* no se identificó como un gen cuya expresión aumentara significativamente en medio sin nitrógeno. Sin embargo el hecho de que presente similitud con una proteína que sí participa en la fusión celular durante la conjugación en otros organismos, hace que su estudio sea de nuestro interés.

El objetivo general de este trabajo es ampliar el conocimiento del proceso de fusión celular durante el proceso de conjugación. Los objetivos concretos han sido:

1. Investigar si la proteína Prm1p de *S. pombe* es necesaria para el proceso de conjugación.
2. Estudiar la relevancia funcional de los elementos estructurales que Dni1p y Dni2p comparten con las claudinas.
3. Estudiar con más detalle la relación funcional entre Dni1p y Dni2p.
4. Analizar la relación funcional entre las proteínas Dni1p, Dni2p y Prm1p.



Resultados

1. LA PROTEÍNA Prm1p ES NECESARIA PARA LA FUSIÓN CELULAR

1.1. La expresión de *prm1*⁺ aumenta durante conjugación

A pesar de que *prm1*⁺ no se había incluido en el *cluster* de los genes que se inducen en respuesta a la depleción de nitrógeno (Mata et al., 2002; Mata y Bahler, 2006), se decidió comprobar si su expresión aumentaba durante la conjugación. Un resultado positivo indicaría que Prm1p podría llevar a cabo alguna función durante este proceso, como sucede con las proteínas homólogas en otros organismos. Hay que tener en cuenta que el estudio llevado a cabo por Mata y colaboradores se realizó usando cepas diploides, por lo que era posible que este gen sí que se indujera durante la conjugación en una cepa haploide. En paralelo se analizó la expresión de *dni1*⁺ y de *dni2*⁺, que codifican dos proteínas necesarias durante la fusión de membranas durante conjugación (Clemente-Ramos et al., 2009), en las mismas condiciones. Se procedió a realizar una RT-PCR semicuantitativa utilizando ARNm de las estirpes WT y mutantes obtenido a partir de cultivos que o bien se encontraban creciendo exponencialmente, o bien estaban en los primeros momentos de la conjugación. En la **figura 9A** es posible observar cómo todos los genes se expresan durante el crecimiento vegetativo, aumentando su nivel de expresión en los momentos iniciales de la conjugación. Este resultado está de acuerdo con que todos ellos actúen durante la fusión celular. El incremento de la expresión de *dni2*⁺ (8,4 veces) es mayor que el de *dni1*⁺ (2,8 veces) y éste a su vez es mayor que el de *prm1*⁺ (1,4 veces) (**figura 9A**). Esta proporción se corresponde con los datos obtenidos en el análisis sistemático realizado con diploides que clasificó a *dni1*⁺ y *dni2*⁺ como genes de respuesta a la depleción de nitrógeno (Mata et al., 2002; Mata y Bahler, 2006).

A pesar de la existencia del ARNm de *dni1*⁺, *dni2*⁺ y *prm1*⁺ durante el crecimiento vegetativo, no fue posible detectar ninguna de las proteínas en esas condiciones mediante microscopía ni *Western-blot*.

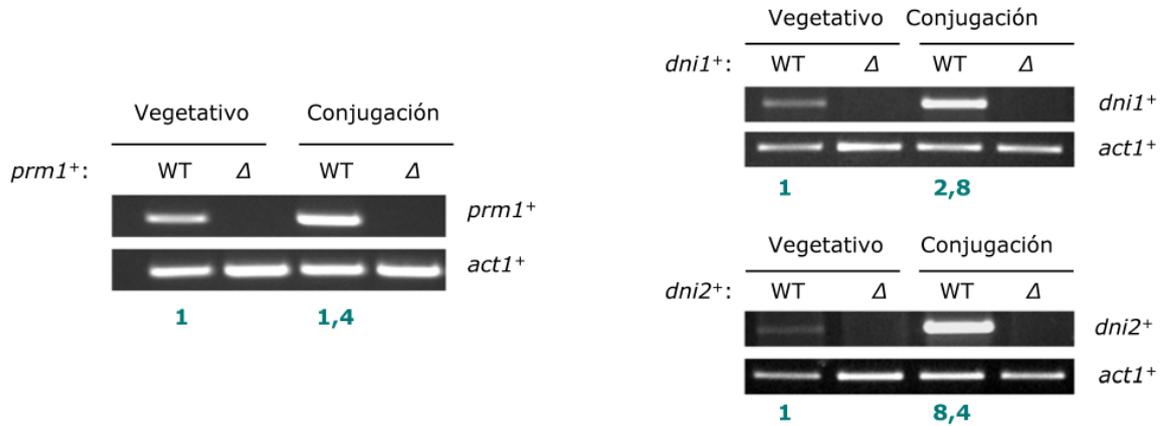
Los hechos de que la expresión de *prm1*⁺ se induzca en el mismo momento que otros genes necesarios para la fusión celular, y que la proteína Prm1 participe en dicho proceso en otros organismos, hacía presuponer que en *S. pombe* también podría participar en este proceso. Por esta razón se procedió a analizar su función y a estudiar la posible relación funcional con Dni1p y Dni2p.

1.2. Prm1p se localiza en la zona de contacto de los *shmoos*

Para delimitar el momento y lugar de actuación de Prm1p se estudió su localización durante la conjugación. Para ello se realizó el marcaje de la proteína con GFP tal y como se explica en la sección de "Materiales y Métodos". Como se puede observar en la **figura 9B**, Prm1p se localiza como un punto discreto de fluorescencia en la zona de contacto de dos

células que comienzan a conjugarse. Sin embargo, deja de detectarse en los *shmoos* que se han fusionado y han dado lugar a cigotos (no mostrado). Esta localización podría indicar que Prm1p pudiera ser importante durante la fusión celular.

A



B

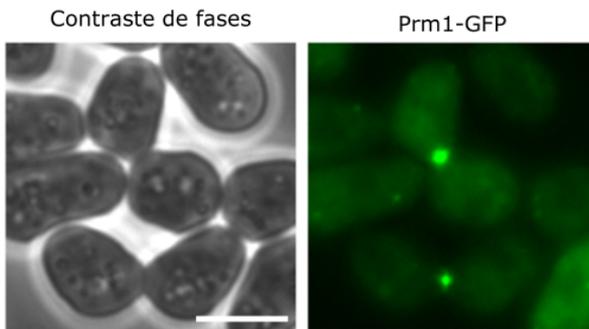


FIGURA 9:

Expresión y localización de Prm1p en condiciones de conjugación. (A) RT-PCR semicuantitativa de cepas que portan los genes *prn1+*, *dni1+* y *dni2+* (WT) o carecen de cada uno de ellos (Δ). Los datos se normalizaron con respecto al gen *act1+*. Los números indican el nivel de expresión en condiciones de conjugación con respecto al nivel durante el crecimiento vegetativo. (B) Fotografías de contraste de fases y de fluorescencia de células que expresan la proteína de fusión Prm1-GFP. Las fotografías, que corresponden a cigotos que se encuentran en los primeros estadios de conjugación, se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 5 μ m.

1.3. Prm1p es necesaria para la fusión celular

Con el fin de investigar si Prm1p intervenía en la conjugación, se analizó el fenotipo de una cepa que carecía de dicha proteína durante este proceso. Para ello se utilizó un mutante nulo para el gen *prn1+* (denominado *prn1 Δ*). La conjugación se indujo en distintos medios que de cultivo: MM de conjugación con y sin sorbitol, SPA y MEA. La incubación se realizó a 32°C durante 2 días. En todos los casos se observó que mientras que en una estirpe WT la conjugación había tenido lugar eficientemente, de manera que en el cultivo se observaba un elevado número de ascas, en el mutante nulo *prn1 Δ* se producía una acumulación de lo que se han denominado "prezigotos". Como se ha detallado en la sección "Introducción", el término prezigoto se refiere a dos *shmoos* que han establecido un contacto estable, pero que no han llegado a fusionarse. Se trata de un estadio anterior al de "zigoto", en el cual los dos *shmoos* ya se han fusionado pero todavía no han esporulado.

Para poder analizar en mayor detalle el proceso de conjugación en el mutante *prm1Δ*, las células se incubaron en medio mínimo sin nitrógeno (MM-N) líquido, que permite inducir la conjugación de una manera más sincrónica que el medio sólido. Se utilizaron las cepas, silvestre y mutante, que portaban la t-SNARE Psy1p fusionada a la GFP (para visualizar la membrana plasmática), y la histona Hht1p fusionada a proteína mCherry (para poder visualizar los núcleos). Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación en MM-N a 26°C y se contabilizó el número de los distintos tipos celulares, característicos del proceso de conjugación, presentes en ambos cultivos (**figura 10A**). Los tipos celulares que se distinguieron fueron:

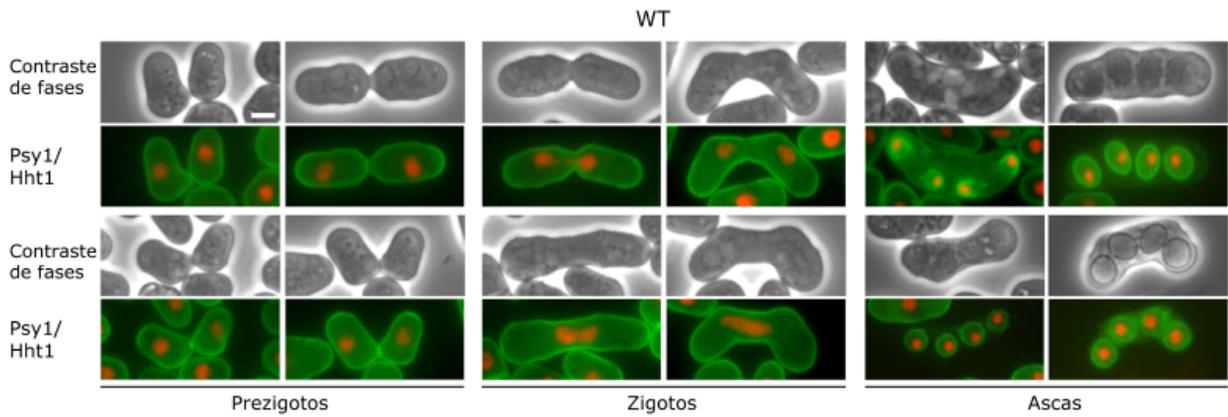
- **Prezigotos:** formados por dos *shmoos* que han contactado pero presentan membranas plasmáticas que los separan y núcleos sin fusionar.
- **Zigotos:** no se observa membrana plasmática entre los dos *shmoos*. Los núcleos pueden aparecer fusionados o sin fusionar.
- **Ascas:** contienen cuatro núcleos diferenciados. Pueden presentar o no membrana plasmática rodeando cada núcleo.

Además, para poder calcular el porcentaje de conjugación de cada cultivo (número de prezigotos + zigotos + ascas con respecto al número total de células), se contabilizaron las células en estado vegetativo y los *shmoos*.

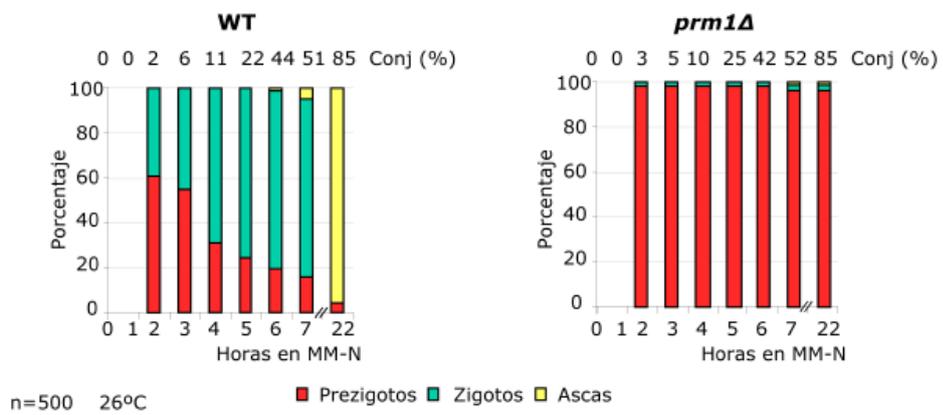
Como se puede observar en la **figura 10B**, *prm1Δ* no muestra defectos en la respuesta a feromona, ya que los porcentajes de conjugación a lo largo del tiempo son similares a los del WT. Al contabilizar los porcentajes de prezigotos, zigotos y ascas con respecto al número total de células que han entrado en el programa de conjugación, en la estirpe WT se observa que a las dos horas de incubación en MM-N aparece un elevado número de prezigotos y de zigotos. A medida que avanza el tiempo va disminuyendo la cantidad de prezigotos y aumentando la de zigotos. Esto refleja una progresión adecuada del proceso de fusión celular. A partir de las 6 horas es posible observar ascas, que son la mayoría de las formas conjugativas después de 22 horas en MM-N. Por el contrario, en el cultivo del mutante *prm1Δ* se observa una acumulación de prezigotos a las dos horas en MM-N. Estos prezigotos no llegan a resolverse a lo largo del tiempo con la producción de zigotos, y sólo dan lugar un pequeño número de ascas tras 22 horas de incubación. Este dato demuestra que el mutante *prm1Δ* presenta un defecto en la fusión celular. Curiosamente, en estos prezigotos se observaron diversas desorganizaciones de la membrana plasmática en la zona de contacto entre dos *shmoos* (**figura 10C**):

- Acumulación de membrana (ver las puntas de flecha en la figura 10C)
- Existencia de dos membranas paralelas en la zona de contacto de los dos *shmoos* (cruces en la figura 10C)

A



B



C

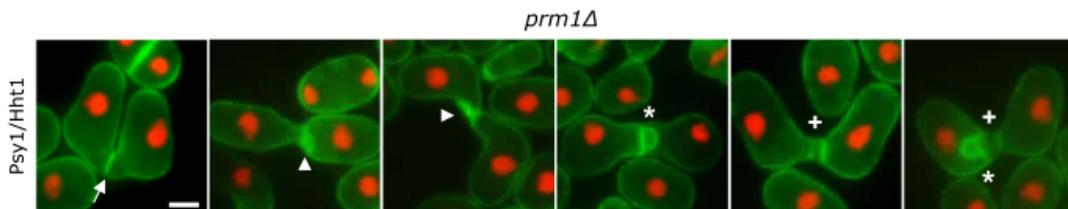


FIGURA 10:

Análisis del proceso de conjugación en el mutante *prm1Δ*. (A) Fotografías de una estirpe *h⁹⁰* silvestre que expresa Psy1-GFP y Hht1-mCherry como marcadores de membrana plasmática y de núcleo, respectivamente, incubadas en MM-N líquido para inducir la conjugación. Cada uno de los paneles corresponde a distintos ejemplos de los tipos celulares presentes durante el proceso de conjugación. El panel superior de cada serie muestra fotografías tomadas por microscopía de contraste de fases y el inferior con microscopía de fluorescencia. (B) Representación gráfica del porcentaje de cada uno de los tipos celulares presentes en cultivos en conjugación de una estirpe WT y otra *prm1Δ* a diferentes tiempos de incubación en MM-N líquido. Los números de la parte superior de la gráfica muestran el porcentaje de conjugación calculado como el número total de prezigotos + zigotos + ascas respecto al total de células presentes en el cultivo. (C) Fotografías de fluorescencia de prezigotos *prm1Δ*. La flecha señala la presencia de membrana plana que separando dos *shmoos*, el triángulo acumulaciones de membrana plasmática, los asteriscos señalan burbujas y las cruces denotan la existencia de dos membranas paralelas en la zona de contacto entre dos *shmoos*. Todas las fotografías se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 2,5 μ m.

- Formación de burbujas/ampollas de la membrana plasmática (asteriscos en la figura 10C)
- Presencia simultánea de varias de estas estructuras

El momento en el que estas desorganizaciones aparecían en un mayor porcentaje de prezigotos, llegando a detectarse hasta en un 40% de éstos, fue a las 3-4 horas de incubación en MM-N. Estas membranas desorganizadas en la zona de contacto de los dos *shmoo*s iban desapareciendo a lo largo del tiempo.

Para confirmar el defecto en fusión celular de *prm1Δ* se procedió a expresar, en la estirpe silvestre y en la mutante, una forma soluble de la GFP que se encontraba bajo el control del promotor del gen que codifica la aglutinina *map4+* (Clemente-Ramos et al., 2009). Este gen se expresa únicamente en el tipo sexual *h+* (Mata y Bahler, 2006), de manera que si tuviera lugar la fusión celular, la GFP soluble difundiría desde el parental *h+* hasta el *h-*, y todo el cigoto presentaría fluorescencia verde. Si la fusión se encontrara bloqueada, la señal de la GFP únicamente se detectaría en la mitad del cigoto correspondiente a la célula *h+*. Además se realizó una tinción con el colorante Hoechst 33258, que permitió visualizar tanto los núcleos como la pared celular. La inducción de la conjugación en este experimento se llevó a cabo en medio sólido, y como se puede observar en la **figura 11**, en la estirpe WT el 90% de los cigotos presentan todo el cuerpo fluorescente. Por su parte, en *prm1Δ* únicamente el 4% de los cigotos muestra este patrón de distribución de la fluorescencia. En la mayoría de los casos (el 85% de los cigotos *prm1Δ*), es posible detectar la GFP en la mitad del cigoto, un patrón que sólo aparece en el 10% de los cigotos silvestres. Estos datos confirman que en el mutante *prm1Δ* existe un defecto severo en el proceso de fusión celular. Curiosamente, en un 11% de los prezigotos *prm1Δ* se intuye que la fluorescencia de la GFP llega a marcar parte del *shmoo h-* (indicado por una punta de flecha en la **figura 11**), o bien que no marcaba totalmente el *shmoo h+* (no mostrado). Este hecho se podría explicar por la existencia de las desorganizaciones de la membrana plasmática que se han detallado anteriormente, las cuales podrían actuar como barrera física que impidiera la libre difusión de la GFP. Este fenotipo sería similar al descrito para los mutantes *prm1Δ* de *S. cerevisiae* (Heiman y Walter, 2000) y *N. crassa* (Fleissner et al., 2009). Sin embargo, la difusión parcial de la GFP desde el *shmoo h+* al *h-* también podría explicarse por una remodelación anómala de la pared celular en la zona de contacto entre estas células. De hecho, es posible apreciar cierto marcaje de dicha estructura en las zonas donde se genera la invasión parcial de la GFP en uno de los *shmoo*s (indicado por una flecha en la **figura 11**).

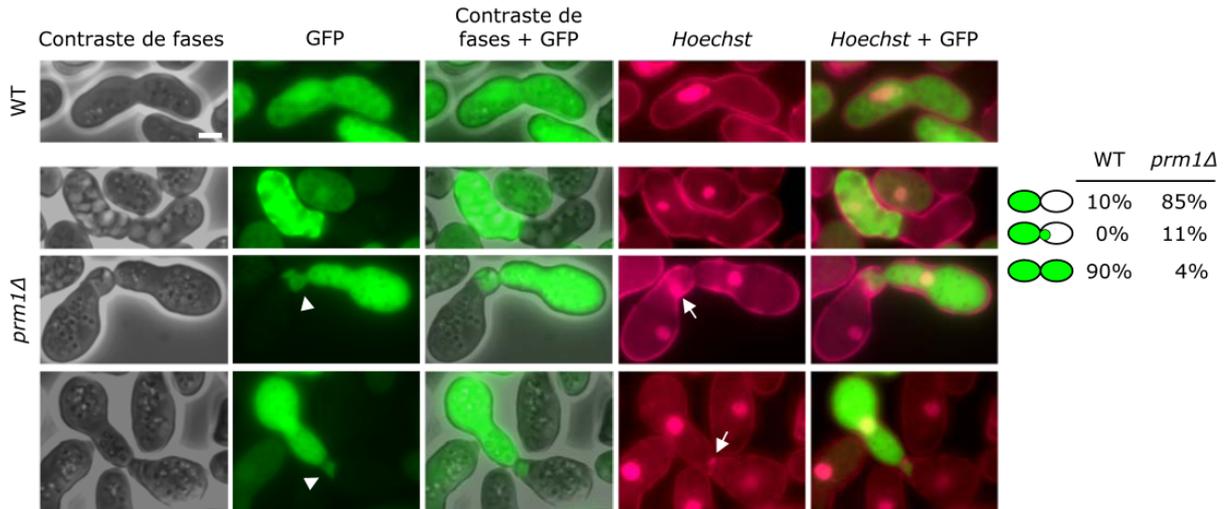


FIGURA 11:

***prm1Δ* presenta un defecto en fusión celular.** Fotografías de contraste de fases y de fluorescencia de células que expresan una GFP soluble bajo el control del promotor *map4⁺* específico de tipo sexual *h⁺*. Las células se tiñeron con Hoechst 3825 (coloreado en magenta) que marca la pared celular y los núcleos. La conjugación se indujo mediante incubación en placas de MM durante 12 horas. Se muestran las imágenes superpuestas de contraste de fases (CF)+GFP y Hoechst+GFP. Las puntas de flecha indican invasión parcial de la fluorescencia de un *shmoo* hacia el otro, y las flechas la existencia de pared celular sin degradar entre los dos *shmoos*. Las fotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 2,5 μm. Los números en el panel de la derecha denotan el porcentaje de los tipos de zigotos, indicados en los dibujos, con respecto al número total de zigotos.

1.4. El defecto en fusión celular de *prm1Δ* es más severo que el de *dni1Δ* y/o *dni2Δ*

Algunos mutantes incapaces de conjugarse correctamente muestran un defecto termosensible, como es el caso de *dni1Δ* y *dni2Δ*. Estos mutantes pueden conjugarse y esporular perfectamente a temperaturas bajas (20-22°C). Esta capacidad se ve reducida a temperaturas suaves (26-28°C) y presentan un defecto más fuerte a medida que aumenta la temperatura, detectándose ya una deficiencia significativa a 32°C (Clemente-Ramos et al., 2009), que es la temperatura de incubación habitual para los cultivos de *S. pombe*. Para caracterizar con más detalle el defecto en fusión celular del mutante *prm1Δ*, se comparó el proceso de conjugación de este mutante con el de cepas *dni1Δ*, *dni2Δ* y *dni1Δ dni2Δ* determinando el porcentaje de los distintos tipos celulares, presentes en el proceso de conjugación, a diferentes temperaturas. De esta forma se confirmó de una forma más detallada que, efectivamente, en los mutantes *dni1Δ*, *dni2Δ* y *dni1Δ dni2Δ* (a partir de este momento se empleará la forma "*dniΔ*" cuando se designe a todos ellos de forma general) se producía una acumulación de prezigotos (figura 12), de acuerdo con un defecto en fusión celular. Aunque en la figura sólo se representa el doble mutante *dni1Δ dni2Δ*, se obtuvieron resultados similares para cada uno de los mutantes simples. Cuando la temperatura es de 20°C un elevado porcentaje de prezigotos logra desarrollarse a escasas horas a tiempos largos de incubación. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 28°C se incrementa la cantidad de prezigotos que se acumulan a tiempos largos de incubación en MM-N. La acumulación de prezigotos es mayor a 32°C. Sin embargo, al comparar estas

gráficas con la que se obtuvo para *prm1Δ*, se puede comprobar que el defecto de éste último mutante es más drástico, ya que incluso a 20°C se observa una fuerte acumulación de prezigotos. Este defecto se mantiene a todas las temperaturas probadas.

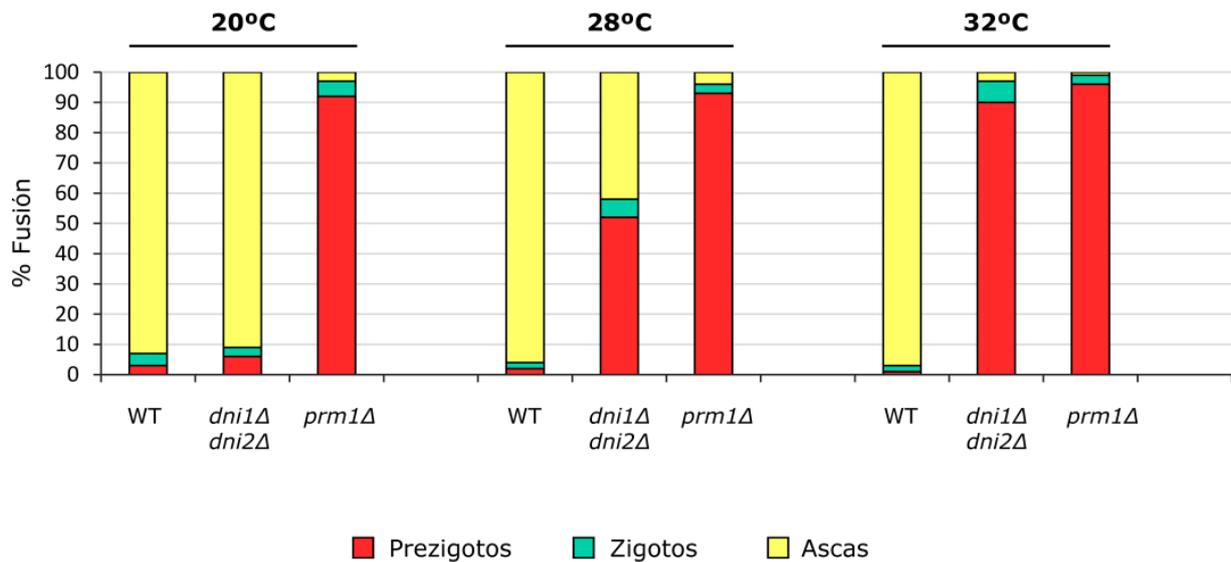


FIGURA 12:

El defecto de *prm1Δ* en fusión celular no es termosensible. Representación gráfica del porcentaje de cada una de las formas conjugativas presentes en las estirpes WT, *prm1Δ* y *dni1Δ dni2Δ*. La inducción de la conjugación se llevó a cabo en placas de MM incubadas durante 5 días a 20°C, 3 días a 28°C o 2 días a 32°C.

En *S. pombe* los zigotos son inestables de manera que esporulan rápidamente una vez que ha ocurrido la fusión celular. Debido a esto, y a que el experimento de la difusión de la GFP había demostrado que en todos estos mutantes existe un defecto en fusión celular (Clemente-Ramos et al., 2009) y figura 11), a partir de este momento se usará el término "porcentaje/eficiencia de fusión celular", aunque lo que se haya estimado haya sido la eficiencia de esporulación calculada como el porcentaje de zigotos + ascas respecto al número de prezigotos + zigotos + ascas. Así, en el experimento mostrado en la figura 12, para el mutante *prm1Δ* el porcentaje de fusión fue menor del 10% después de 2-5 días de incubación en placas de MM a distintas temperaturas. Por su parte, en los mutantes *dniΔ* esta situación únicamente se detectaba cuando la temperatura de incubación era superior a 32°C.

También se investigó la aparición de burbujas y/o ampollas membranosas, que originen la invasión parcial del citoplasma de uno de los *shmoos* en el cuerpo del otro *shmoos*. Para ello se utilizaron estirpes WT, *dniΔ*, y *prm1Δ* que expresaban el marcador de membrana plasmática Psy1-GFP. Las estructuras mencionadas jamás se visualizaron en la estirpe silvestre, lo que indica que son propias del defecto en fusión celular. Mientras que en *prm1Δ* las burbujas/ampollas presentaban una frecuencia de aparición máxima a las 3-4 horas de incubación en MM-N, en los mutantes *dniΔ* era posible detectarlas entre las 3 y las 6 horas. Sin embargo la frecuencia con que aparecían estas estructuras era

sustancialmente inferior en los mutante *dniΔ* respecto al mutante *prm1Δ* (menos del 5% de los prezigotos de los mutantes *dniΔ* frente a un 40% del mutante *prm1Δ*).

Por lo tanto, el defecto en fusión celular de *prm1Δ* es más drástico que el de los mutantes *dniΔ*, lo que a priori sugiere que la función de Prm1p pudiera ser más relevante para dicho proceso. Además el hecho de que el fenotipo de los mutantes presente características diferentes, podría indicar que la función de Prm1p fuera distinta de la de los genes *dni1+* y *dni2+*. Asimismo, el defecto de fusión celular del mutante *prm1Δ* de *S. pombe* es más fuerte que el del mutante *prm1Δ* de *S. cerevisiae*, el cual presenta un defecto de fusión celular del 45% (Heiman y Walter, 2000), lo que indica que su papel en la fusión celular pudiera ser más relevante en la levadura de fisión que en la de gemación.

1.5. La distribución de la pared celular y de la membrana plasmática en la zona de contacto de los *shmoos* es defectuosa en el mutante *prm1Δ*

Como se ha mencionado anteriormente, en el mutante *prm1Δ* la frecuencia de prezigotos con desorganizaciones de la membrana plasmática en la zona de contacto de los *shmoos* (**figura 10C**) presentaba un nivel máximo de aparición a las 3-4 horas de incubación en MM-N. Este es el momento en que Prm1-GFP se detectaba acumulada como un punto discreto de fluorescencia en dicha zona (**figura 9B**). Esta coincidencia temporal parecía sugerir que Prm1p pudiera intervenir en la correcta organización de la membrana plasmática de los *shmoos* durante el proceso de fusión celular. Para confirmar que las desorganizaciones de la membrana en los prezigotos del mutante se debían a la falta de Prm1p, y no a un comportamiento anómalo de la proteína de fusión Psy1-GFP en *shmoos* en los que la fusión celular no consigue proseguir, se utilizó un marcador de la membrana plasmática diferente. El marcador elegido fue LactC2-GFP, que se trata de una sonda capaz de unirse específicamente a la fosfatidilserina (PS). Por lo tanto, al expresar dicha sonda en el interior celular, ésta se unirá a la PS presente en la cara interna de la membrana plasmática (Yeung et al., 2008). En este experimento se incluyó el mutante *fus1Δ* como un control en el que la fusión celular permanece bloqueada en el estado de prezigoto con las paredes celulares sin degradar (Petersen et al., 1995). Por lo tanto, se indujo la conjugación, en MM-N a 26°C, de las cepas WT, *prm1Δ* y *fus1Δ* que expresan la sonda LactC2-GFP. Además, las células se tiñeron con Calcoflúor para analizar el comportamiento de la pared celular y de la membrana plasmática en los mismos prezigotos, y así poder determinar si la digestión de la pared celular era un prerequisite para la formación de las burbujas y el resto de anomalías en la membrana plasmática en los prezigotos *prm1Δ*.

En la **figura 13A** se muestran un prezigoto de la estirpe silvestre, en el que la pared celular aún no se ha degradado y las membranas permanecen próximas sin fusionarse (panel a), y un zigoto en el que la pared celular se ha digerido, las membranas plasmáticas se han fusionado, y el cuello de conjugación se ha ensanchado (panel b). En la

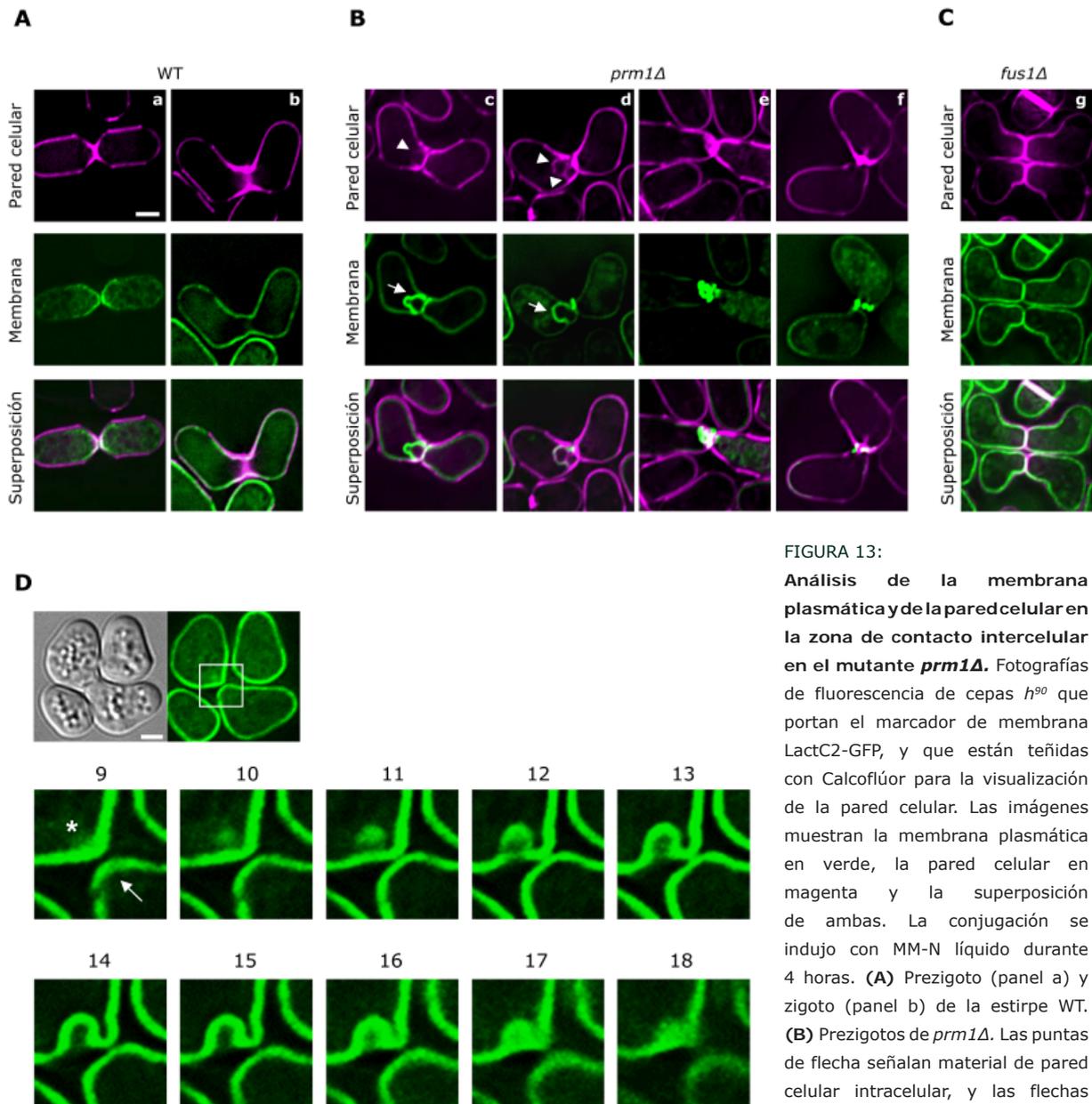


FIGURA 13:

Análisis de la membrana plasmática y de la pared celular en la zona de contacto intercelular en el mutante *prm1Δ*. Fotografías de fluorescencia de cepas *h⁹⁰* que portan el marcador de membrana LactC2-GFP, y que están teñidas con Calcoflúor para la visualización de la pared celular. Las imágenes muestran la membrana plasmática en verde, la pared celular en magenta y la superposición de ambas. La conjugación se indujo con MM-N líquido durante 4 horas. **(A)** Prezigoto (panel a) y zigoto (panel b) de la estirpe WT. **(B)** Prezigotos de *prm1Δ*. Las puntas de flecha señalan material de pared celular intracelular, y las flechas indican burbujas de membrana plasmática (paneles c y d). También se muestra la existencia de acumulaciones de membrana y pared celular (paneles e y f). **(C)** Zigotos de la estirpe *fus1Δ* usada como control de prezigotos en los que no hay fusión celular. **(D)** Imágenes de campo claro y de fluorescencia de un prezigoto *prm1Δ* entero (paneles de arriba). El cuadrado delimita el área que se ha aumentado abajo. El asterisco señala la célula cuya membrana se invagina y la flecha indica el *shmoo* cuya membrana permanece plana. Los números corresponden a las secciones en z. Todas las imágenes son planos centrales adquiridos con un sistema de microscopía DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 2,5 μ m.

figura 13B se exponen varios prezigotos del mutante *prm1Δ*. En todos los casos se observa cómo existe pared celular en la zona de unión entre los dos *shmoos*, aparentemente sin degradar, y aun así se siguen generando burbujas y desorganizaciones de la membrana plasmática. En algunas ocasiones se aprecia pared celular rodeando la burbuja de membrana plasmática (se indica con una punta de flecha en los paneles c y d), pero en otras no se observan burbujas de membrana plasmática evidentes pero sí se detecta acumulación de pared celular entre los dos *shmoos* (paneles e y f). Por su parte, en el

mutante *fus1Δ* (**figura 13C**) es posible apreciar cómo la pared celular permanece sin digerir y las membranas plasmáticas sin fusionarse, pero no se detectan desorganizaciones de las envueltas celulares, lo que indica que estas se deben a una consecuencia específica de la ausencia de Prm1p, y no una consecuencia indirecta del defecto de fusión celular. Al analizar las sucesivas secciones en z de una misma imagen (**figura 13D**) se puede comprobar que la invaginación de la membrana plasmática que forma la burbuja/ampolla se produce en uno de los *shmoos*, mientras que en el otro la membrana plasmática permanece firme. Este resultado demuestra que estas estructuras son de diferente naturaleza en el mutante *prm1Δ* de *S. pombe* respecto a las descritas en los mutantes *prm1Δ* de *S. cerevisiae* (Heiman y Walter, 2000) y *N. crassa* (Fleissner et al., 2009). En estos otros organismos, las estructuras aberrantes que se forman constituyen protrusiones delimitadas por las membranas de ambos *shmoos*, que permanecen muy próximas pero sin fusionarse (**figuras 4A y 4E**), y sin que exista material de pared celular entre ambas.

Con el fin de estudiar en mayor detalle el fenotipo de *prm1Δ*, se procedió a realizar fotografías mediante microscopía electrónica. En este caso se indujo la conjugación en placas de MM durante 12 horas a 32°C. En la **figura 14**, en los paneles correspondientes a la estirpe WT, se muestra la zona de fusión de dos *shmoos* que han establecido contacto a través de sus paredes celulares (panel a), de dos *shmoos* en los que las paredes celulares han comenzado a erosionarse (panel b) y de dos *shmoos* que ya se han fusionado y en los que el cuello de conjugación se ha ensanchado (panel c). Por su parte, en la cepa *prm1Δ* nunca se observaron regiones de contacto intercelular donde las paredes celulares se hubieran digerido totalmente y las membranas aparecieran yuxtapuestas, que es el fenotipo descrito para los mutantes *prm1Δ* de *S. cerevisiae* (Heiman and Walter, 2000) y *N. crassa* (Fleissner et al., 2009), y que explica la aparición de burbujas de membrana plasmática en esos mutantes. Lo que sí que se observan, en aproximadamente un 30% de los cigotos del mutante *prm1Δ* de *S. pombe*, son zonas en las que la pared celular se ha digerido parcialmente y regiones donde esta estructura se ha erosionado, siendo por tanto más estrecha de lo normal (ver las puntas de flecha en las ampliaciones de los paneles d y e). También es posible detectar estructuras que parecen pequeñas burbujas y otras formaciones anormales de la membrana plasmática (señaladas por flechas en las ampliaciones de los paneles e, f, g, h, i), cercanas a la zona de contacto celular. Estas estructuras peculiares podrían corresponderse con las que se habían detectado con los marcadores de membrana plasmática Psy-GFP y LactC2-GFP. La flecha negra gruesa en el panel g muestra estructuras que recuerdan a las descritas para el mutante doble *kex1Δ prm1Δ* de *S. cerevisiae* (**figura 4C**) (Heiman et al., 2007), que también acumula pequeñas burbujas de membrana en la zona de contacto intercelular cuando la pared celular que separa dos *shmoos* sigue presente. En más de un 80% de los cigotos *prm1Δ* era posible observar un crecimiento anormal de la pared celular que llegaba a englobar porciones de citoplasma (paneles d, g, h, i). Dado que las enzimas necesarias para la

síntesis de pared celular son proteínas transmembrana, este crecimiento aberrante de la pared celular pudiera ser consecuencia de un crecimiento previo anómalo de la membrana plasmática.

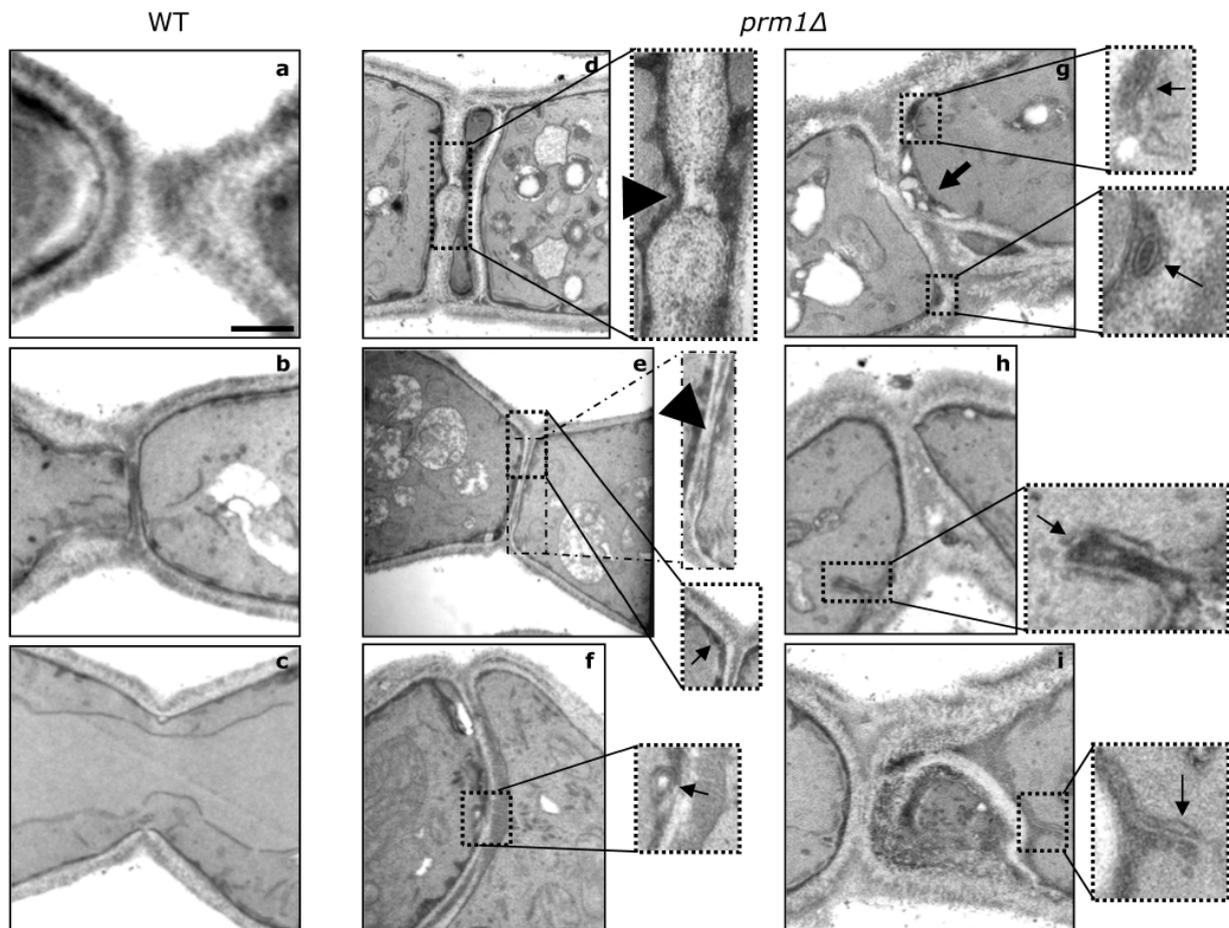


FIGURA 14:

Microscopía electrónica de las envueltas celulares en la zona de fusión. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de zigotos *h⁹⁰* en los que se indujo la conjugación en MM durante 12 horas. Se muestran tres zigotos diferentes de la estirpe WT, y seis de *prm1Δ*. Las puntas de flecha señalan zonas de erosión parcial de la pared celular, y las flechas estructuras anormales de la membrana plasmática. La flecha negra gruesa del panel g señala una acumulación de burbujas cuyo contenido tiene una apariencia diferente a la del citoplasma. Barra de escala 0,75 μ m.

1.6. Distribución de enzimas necesarias para la remodelación de la pared celular en prezigotos *prm1Δ*

Para que la fusión celular tenga lugar es necesario que la pared celular sufra procesos de degradación y de síntesis controlados. La diferencia de presión osmótica entre el citoplasma y el ambiente extracelular hace que la degradación de la pared celular y la fusión de las membranas sean procesos arriesgados para la célula. Errores en la remodelación de la pared celular durante la formación del cigoto podrían hacer que la membrana plasmática quedara expuesta al ambiente hipotónico, desencadenando la lisis celular (Aguilar et al., 2007; de Nobel et al., 2000; Jin et al., 2004; Philips y Herskowitz, 1997). En *S. pombe* se ha propuesto que la degradación del glucano no se debe a una glucanasa en

concreto, sino a la acción coordinada de varias de ellas. Además la degradación de la pared celular durante la conjugación no se produce por una secreción dirigida de glucanasas a la punta de los *shmoos*, sino que estas se secretan por toda la superficie celular. El contacto entre dos *shmoos* disminuye la tasa de difusión de estas enzimas, lo que permite que se concentren en esa zona para que actúen allí específicamente (Huberman y Murray, 2014; Dudin et al., 2015). Las enzimas de síntesis también están presentes en esa zona de crecimiento (Cortes, 2002 Cortes et al., 2005;), de manera que la acción coordinada de ambos tipos de enzimas garantizan la remodelación de la pared celular. El hecho de que en el mutante *prm1Δ* exista pared celular sin digerir entre los *shmoos*, y que dicha envuelta celular esté desorganizada (**figuras 13 y 14**), pudiera ser debido a una ausencia/deslocalización de las enzimas que participan en su remodelación. Para comprobar esta hipótesis, se analizó si la localización de la glucanasa Agn1p, que participa en la degradación de $\beta(1,3)$ glucano, era correcta. Este experimento se llevó a cabo induciendo la conjugación en MM-N líquido a 26°C. Como se muestra en la **figura 15A**, tanto en los prezigotos de la estirpe silvestre (WT) como en los de *prm1Δ*, Agn1-GFP se detecta en la zona de contacto intercelular (señalada por flechas). Esta localización permitiría explicar la erosión de la pared celular que se había observado en algunos prezigotos por microscopía electrónica (**figura 14**). Además la presencia de Agn1p en la zona de contacto intercelular sugiere que el defecto inicial del mutante *prm1Δ* de *S. pombe* no se debe a la ausencia de glucanasas en esa zona.

Por otra parte, la existencia de burbujas/ampollas rodeadas de pared celular pudiera ser debida a la producción de pared celular de nueva síntesis después de que la burbuja/ampolla se hubiera formado. Para comprobar si esto era así se analizó la localización de Bgs4p, enzima que participa en la síntesis de $\beta(1,3)$ glucano, en prezigotos de la estirpe *prm1Δ*. Como se puede apreciar en la **figura 15B**, la señal de mCherry-Bgs4p se superpone completamente con la señal de LactC2-GFP en la invaginación de la membrana plasmática que se forma en uno de los *shmoos*. La síntesis de nueva pared celular desde estas burbujas de la membrana plasmática podría contribuir a que la pared celular englobara porciones de citoplasma, generando las estructuras que se habían observado mediante microscopía electrónica. En este caso, deberían haberse generado poros en las invaginaciones de la membrana que permitieran la libre difusión del citoplasma.

Así, más que a una ausencia de las enzimas encargadas de la remodelación de la pared, el fenotipo del mutante parece deberse a una alteración del proceso. Aunque esta alteración en la organización de las envueltas celulares pudiera ser una consecuencia del defecto en fusión y no su causa. Hay que tener en cuenta que este tipo de fenotipo se observa en algunos mutantes con defecto en fusión celular (mutantes *dniΔ*. Clemente-Ramos et al., 2009), pero no en otros (mutantes *cfr1Δ* o *fus1Δ*. Cartagena-Lirola et al., 2006; Petersen et al., 1995). Por lo tanto, no puede descartarse que Prm1p juegue algún papel en la coordinación de la remodelación de la pared celular durante la conjugación.

1.7. Las envueltas celulares presentan un comportamiento erróneo durante la fusión celular en zigotos *prm1Δ*

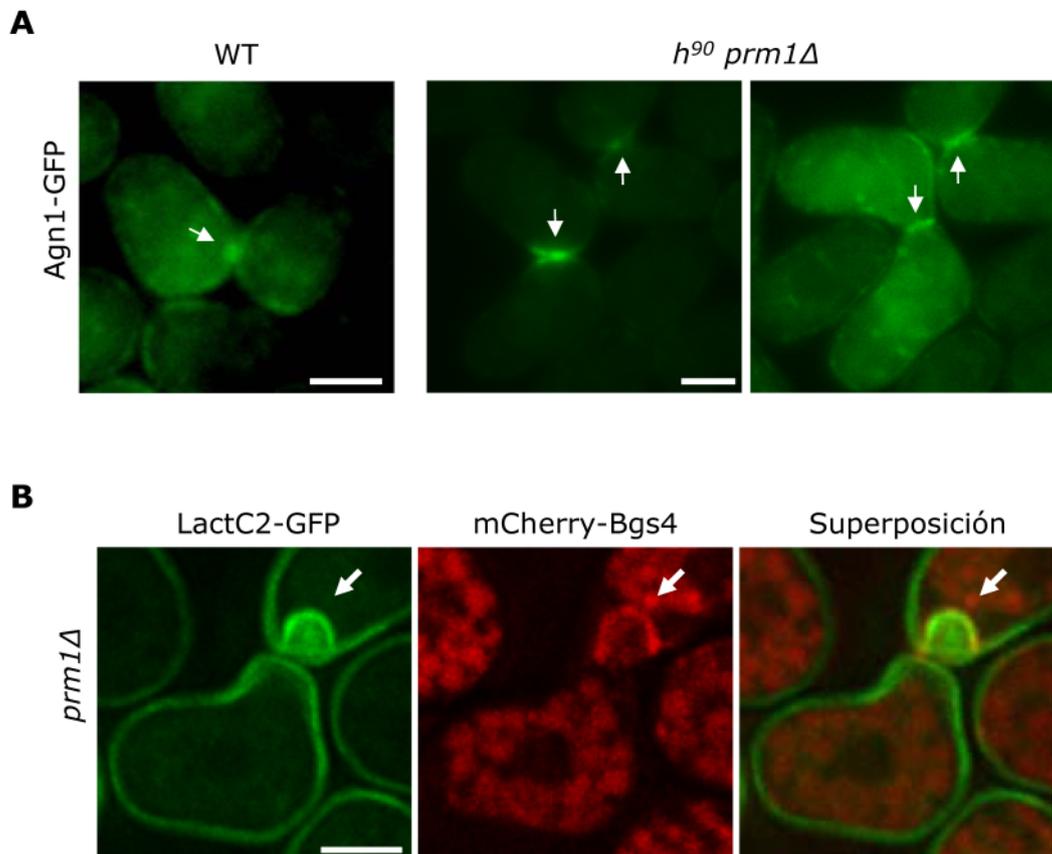


FIGURA 15:

Localización de enzimas implicadas en la remodelación de la pared celular en zigotos. Fotografías de fluorescencia de células *h⁹⁰ WT* y *prm1Δ* inducidas a conjugarse en MM-N que portan enzimas de degradación o síntesis de pared celular fusionadas a una proteína fluorescente. **(A)** Zigotos que expresan la proteína de fusión Agn1-GFP, enzima que participa en la degradación de la pared celular. Las flechas señalan acumulación de Agn1p en la zona de contacto intercelular. Las fotografías se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 2,5 μ m. **(B)** Zigotos que contienen la sonda LactC2-GFP que marca la membrana plasmática, y mCherry-Bgs4, enzima que participa en la síntesis de pared celular. Las flechas señalan burbujas de membrana plasmática. Las imágenes son proyecciones máximas de planos adquiridos en series z con un sistema de microscopía DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 2,5 μ m.

Con el fin de obtener una mayor información acerca de la cronología de los eventos que provocaban el defecto en fusión celular en ausencia *prm1⁺*, y así poder dilucidar la función de este gen, se realizaron estudios de *time-lapse*. Para ello se indujo la conjugación en MM-N a 26°C en cepas *h⁹⁰ WT*, *prm1Δ* y *fus1Δ* que portaban el marcador LactC2-GFP, para visualizar la fosfatidilserina (PS) en la monocapa interna de la membrana plasmática. Además, se realizó una tinción con Calcoflúor para observar la pared celular. Las fotografías se tomaron cada 5 minutos durante 90 minutos; en la **figura 16** se muestran las fotografías de mayor relevancia de cada película.

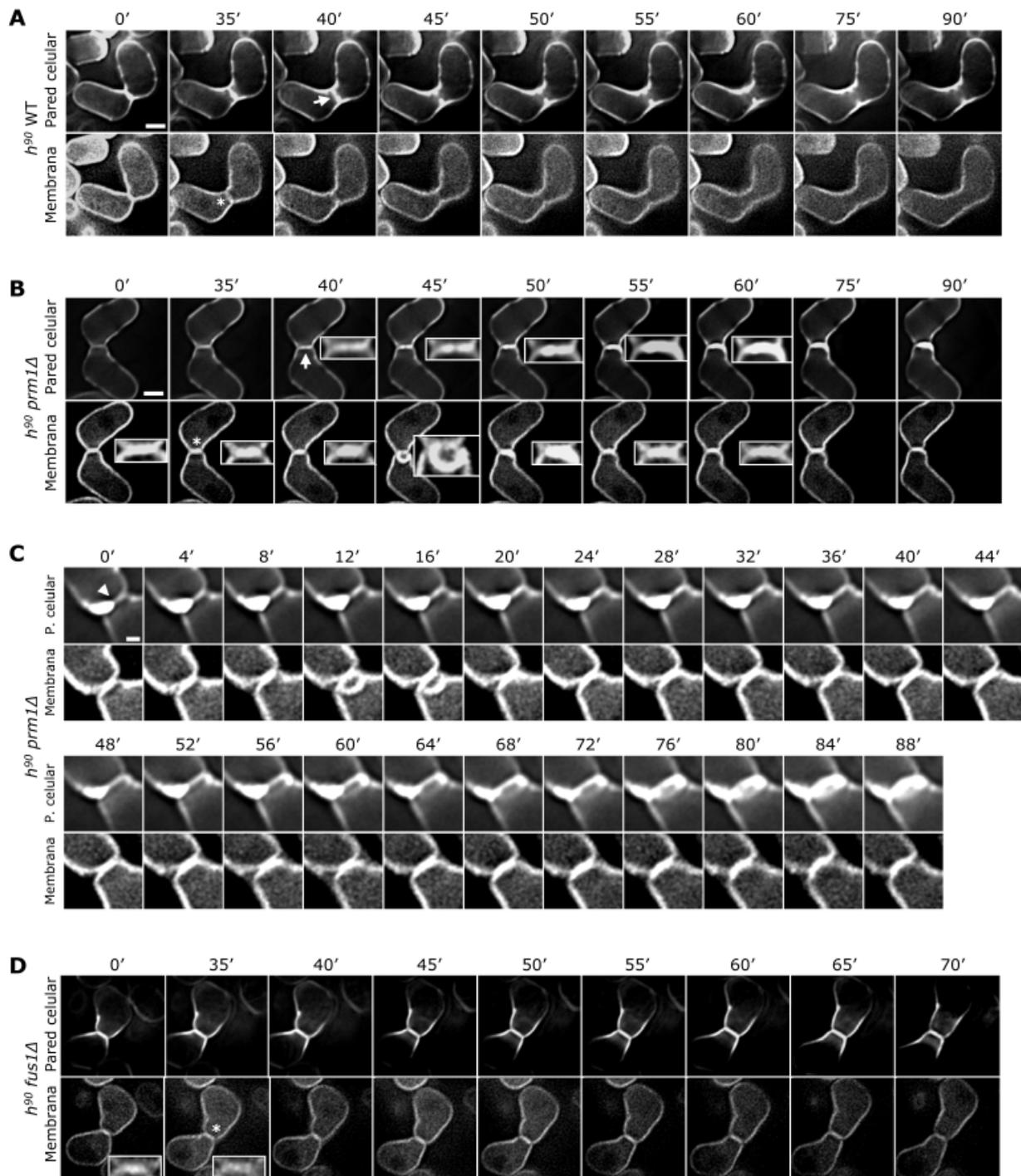


FIGURA 16:

Análisis del comportamiento de la pared celular y la membrana plasmática durante la fusión celular. Zigotos de las estirpes *h90* WT (A), *prm1Δ* (B) y (C), y *fus1Δ* (D) inducidos a conjugar en MM-N líquido. Todos expresan LactC2-GFP que marca la fosfadilserina de la cara interna de la membrana plasmática, y todos se tiñeron con Calcoflúor para la detección de la pared celular. Las imágenes se tomaron cada 5 minutos. El tiempo 0' indica el momento en que se realizó la primera fotografía. Dada la ausencia de un marcador temporal para ajustar la primera imagen, las imágenes de diferentes zigotos marcadas con el mismo tiempo (en minutos) no corresponden necesariamente al mismo momento después de que haya tenido lugar el contacto entre dos *shmoos*. Los asteriscos indican un cambio en la intensidad de la fluorescencia emitida por LactC2-GFP en la zona de fusión. Las flechas señalan zonas de erosión de la pared celular. Las ampliificaciones corresponden a la zona de fusión celular. Las imágenes son secciones medias obtenidas con un sistema DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 2,5 μ m.

En la **figura 16A** se puede observar cómo en los cigotos de la estirpe silvestre (h^{90} WT) la fluorescencia correspondiente a la PS de la cara interna de la membrana plasmática va perdiendo intensidad en la zona de contacto celular después del contacto entre los dos *shmoos* (se indica con un asterisco en el tiempo 35'). Sin embargo, en ese momento aún no se aprecia erosión en la pared celular. Es en el minuto 40 cuando comienza a detectarse un pequeño poro en la pared celular (indicado por una flecha). A tiempos posteriores, se puede apreciar cómo este pequeño poro se va ensanchando a la vez que lo hace el puente de conjugación, produciéndose la fusión celular.

En la **figura 16B** se muestra cómo en el mutante *prm1Δ* la fluorescencia de LactC2-GFP en la membrana no disminuye, sino que parece incluso intensificarse a lo largo del tiempo (se indica con un asterisco en el tiempo 35'). En el minuto 40 es posible detectar un poro en la pared celular (indicado con una flecha) que, aunque persiste durante los tiempos 45' y 50', no consigue expandirse y termina cerrándose en el minuto 55; a partir de este momento se produce una acumulación de material de pared celular en la zona de contacto entre los *shmoos*, según la fluorescencia del Calcoflúor. Durante el período de tiempo en el que el pequeño poro de la pared celular permanece abierto, es posible observar una invaginación de la membrana plasmática hacia el citoplasma de uno de los *shmoos*, generándose una burbuja/ampolla que desaparece a tiempo 55', momento en que el poro de la pared celular se aprecia totalmente cerrado. Aunque en este cigoto la invaginación de la membrana se produce poco después de que la pared celular hubiera sufrido una erosión parcial, en otros cigotos se observa un retraso entre el momento de erosión de la pared celular y la aparición de la invaginación de la membrana plasmática, como es el caso del cigoto mostrado en la **figura 16C**. En este cigoto se detecta una región de pared celular parcialmente erosionada al comienzo del experimento (tiempo 0', indicado por una punta de flecha) pero la invaginación de la membrana no se observa hasta el tiempo 12'. Por lo tanto, la formación de invaginaciones de la membrana plasmática aparentemente no parecía ser una consecuencia inmediata de la erosión parcial de la pared celular. En este cigoto también se observa una sobreproducción de pared celular en la zona de contacto de los dos *shmoos* que no logran fusionarse a lo largo del *time-lapse*. Las invaginaciones de membrana observadas en los cigotos mostrados en las **figuras 16B** y **16C** desaparecían con el tiempo, indicando que se trataba de estructuras transitorias y probablemente frágiles; seguramente por eso estas estructuras no se detectaron tras el tratamiento de las muestras para su observación al microscopio electrónico. Sin embargo, había ocasiones en que la burbuja lograba establecerse y llegaba a rodearse de material de pared celular de nueva síntesis, lo que seguramente le proporcionaba la resistencia suficiente para poder observarse por dicha técnica. En todos los cigotos *prm1Δ* analizados, la intensidad de fluorescencia correspondiente a la PS de la zona de contacto intercelular aumentaba a lo largo del tiempo.

En la **figura 16D** se muestra un cigoto de la cepa *fus1Δ*. En este caso no se observa aparición de burbujas/ampollas de membrana plasmática, confirmando que estas estructuras se generan como consecuencia de la falta de Prm1p, y no de la falta de progresión de la fusión celular. Tampoco se detecta apertura de pequeños poros en la pared celular. Lo que sí se aprecia nuevamente es una leve disminución de la fluorescencia de la sonda LactC2-GFP (indicado con un asterisco en el minuto 35), de manera similar a lo que ocurría en la estirpe WT.

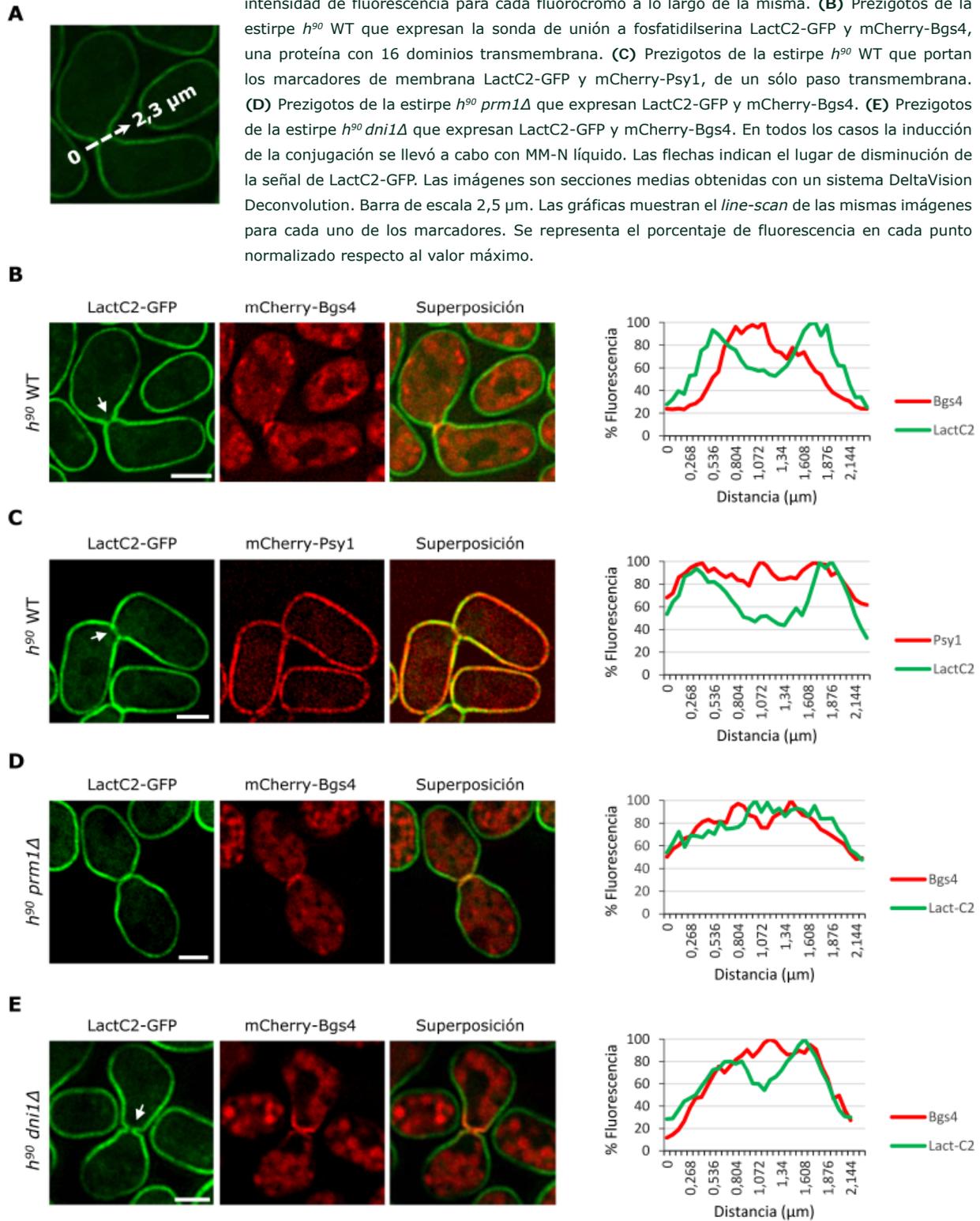
1.8. La distribución de la fosfatidilserina se modifica antes de la fusión celular

Todos los experimentos de *time-lapse* detallados en el punto 1.7 indicaban que la diferencia inicial entre las estirpes WT y *prm1Δ* parecía ser una variación de la intensidad de la fluorescencia de la sonda LactC2-GFP en un momento temprano después del contacto celular. Esta fluorescencia disminuía muy sutilmente en la estirpe silvestre (y en el mutante *fus1Δ*) pero no en el mutante *prm1Δ*, en el que de hecho esta fluorescencia aumentaba en momentos posteriores. Dado que la sonda LactC2-GFP marca la distribución de la PS en la cara interna de la membrana plasmática, el resultado parecía indicar que en la estirpe silvestre una variación en la distribución de este fosfolípido en la membrana plasmática constituía un paso previo a la fusión celular. Sin embargo también era posible que el cambio en el nivel de fluorescencia estuviera indicando una variación en la distribución/morfología de la membrana en la zona de contacto entre los *shmoos*. Para poder distinguir entre estas dos posibilidades, se procedió a comparar el comportamiento de la sonda LactC2-GFP con el de otros marcadores de la membrana plasmática en varios planos de una misma imagen. Para ello, se indujo la conjugación en cepas de la estirpe silvestre que expresaban LactC2-GFP y un marcador de membrana adicional. Además se realizó un *line-scan*; para ello se dibujó a mano alzada una línea de 2,3 μm que recorría longitudinalmente la zona de contacto intercelular, y se cuantificó la fluorescencia a lo largo de la misma (**figura 17A**). Los marcadores de membranas elegidos fueron mCherry-Bgs4 (proteína con 16 dominios transmembrana, **figura 17B**) y Psy1-Cherry (con 1 dominio transmembrana, **figura 17C**). En ambos casos es posible observar que la disminución en la intensidad de la señal de LactC2-GFP no va acompañada por una disminución en la señal del otro marcador, indicando que el cambio detectado es específico de la PS. Esta diferencia se puede apreciar gráficamente en el *line-scan* que se muestra a la derecha de cada figura.

Con el fin de averiguar si la falta de disminución de la señal de la PS expuesta hacia el interior celular era específica del mutante *prm1Δ*, o se producía en otros mutantes con defecto en fusión celular, se procedió a analizar el comportamiento de este fosfolípido en los mutantes *prm1Δ* y *dni1Δ*. De manera análoga a lo descrito para la estirpe WT, se usaron cepas *h⁹⁰* que expresaban la sonda LactC2-GFP mCherry-Bgs4. Se observó que, mientras

FIGURA 17:

Análisis de la distribución de la fosfatidilserina durante la fusión celular. (A) Diagrama explicativo del procedimiento seguido para la cuantificación del *line-scan*. Se trazó una línea de 2,3 μm sobre la zona de contacto intercelular en los prezigotos a estudiar, y se midió la intensidad de fluorescencia para cada fluorocromo a lo largo de la misma. (B) Prezigos de la estirpe h^{90} WT que expresan la sonda de unión a fosfatidilserina LactC2-GFP y mCherry-Bgs4, una proteína con 16 dominios transmembrana. (C) Prezigos de la estirpe h^{90} WT que portan los marcadores de membrana LactC2-GFP y mCherry-Psy1, de un sólo paso transmembrana. (D) Prezigos de la estirpe h^{90} *prm1* Δ que expresan LactC2-GFP y mCherry-Bgs4. (E) Prezigos de la estirpe h^{90} *dni1* Δ que expresan LactC2-GFP y mCherry-Bgs4. En todos los casos la inducción de la conjugación se llevó a cabo con MM-N líquido. Las flechas indican el lugar de disminución de la señal de LactC2-GFP. Las imágenes son secciones medias obtenidas con un sistema DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 2,5 μm . Las gráficas muestran el *line-scan* de las mismas imágenes para cada uno de los marcadores. Se representa el porcentaje de fluorescencia en cada punto normalizado respecto al valor máximo.



que en *prm1Δ*, la intensidad de fluorescencia de ambos marcadores se mantenía a unos niveles similares (**figura 17D**), en el mutante *dni1Δ*, al igual que se había apreciado en la estirpe WT, el marcaje de la PS se atenúa en la región central de la zona de contacto intercelular en los momentos posteriores al contacto entre los *shmoos* (**figura 17E**).

Los resultados descritos hasta aquí demuestran que la proteína Prm1p de *S. pombe* es esencial para el proceso de fusión celular durante la conjugación, e indican que su función es necesaria para que ocurra una modificación de la membrana plasmática, que resulta en una disminución de la cantidad de PS expuesta en la cara citoplásmica de la misma. Además sugieren que su función podría ser diferente de la de los genes *dni1*⁺ y/o *dni2*⁺.

2. RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS Dni1p Y Dni2p

2.1. Relación funcional entre Dni1p y Dni2p

En estudios anteriores llevados a cabo en el laboratorio se había demostrado que los genes *dni1⁺* y *dni2⁺* actúan en la misma ruta funcional, relacionada con el proceso de fusión celular durante la conjugación. Sin embargo, se desconocía si una de las proteínas codificadas por ellos regulaba a la otra, o si ambas funcionarían en paralelo formando un complejo, ya que sus localizaciones son similares (Clemente-Ramos, 2006; Clemente-Ramos et al., 2009) Uno de los objetivos de este trabajo fue establecer la relación funcional entre Dni1p y Dni2p. Para poder llevar a cabo este objetivo se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

2.1.1. Dni1p y Dni2p colocalizan en la zona de contacto celular

Las proteínas de fusión Dni1-GFP y Dni2-GFP se detectan como puntos fluorescentes discretos en la zona de contacto entre las dos células van a formar un cigoto (Clemente-Ramos, 2006; Clemente-Ramos et al., 2009). Con el fin de averiguar si ambas proteínas se localizan en la misma zona de la punta de los *shmoos* y en el mismo momento, Dni1p se fusionó a la RFP mCherry, y esta proteína de fusión se expresó en una cepa que portaba Dni2p marcada con GFP. Ambas proteínas se expresaron desde plásmidos integrados en el genoma y bajo el control de su propio promotor. Si al superponer la señal de ambas proteínas fluorescentes la señal detectada fuera amarilla, indicaría que ambas señales coinciden y, por lo tanto, que las proteínas colocalizan. En la **figura 18A** se puede observar que, efectivamente, Dni1-mCherry y Dni2-GFP colocalizan en la zona de contacto entre dos *shmoos*, detectándose ambas proteínas en el mismo punto discreto de fluorescencia (se señala con una punta de flecha). Dado que la punta del *shmoo* corresponde a una región de membrana plasmática enriquecida en cierto tipo de proteínas, a partir de este momento se designará como "microdominio de fusión" a la zona de contacto de las membranas plasmáticas de ambos *shmoos* en el cigoto.

2.1.2. La localización de Dni1p y Dni2p es interdependiente

Con el fin de obtener información acerca de si una de las dos proteínas actuaría antes que la otra dentro de la misma ruta funcional, se procedió a analizar la localización de cada una de ellas en ausencia de la otra. Para llevar a cabo este experimento se partió de cultivos a los que se había inducido la conjugación con MM-N a 26°C.

En la **figura 18B** se puede apreciar que en ausencia de Dni2p, Dni1p no permanece concentrada en el microdominio de fusión, sino que se detecta como una serie de nodos distribuidos a lo largo de toda la membrana plasmática.

Por otro lado, cuando se deletiona *dni1⁺*, la localización Dni2p también se altera. En una estirpe silvestre Dni2-GFP se observa en el retículo endoplásmico (RE) en las células que no están conjugando (indicado con flechas), mientras que en los zigotos se observa una acumulación de la proteína en la zona de contacto intercelular (señalado con punta de flecha); normalmente en los zigotos se sigue observando una señal residual en el retículo considerablemente más débil. En el mutante *dni1Δ*, Dni2-GFP no se detecta en el microdominio de fusión, sino únicamente en el RE (figura 18C).

De estos resultados se puede concluir que Dni1p y Dni2p dependen mutuamente para localizarse correctamente, lo que sugiere que podrían actuar formando un complejo.

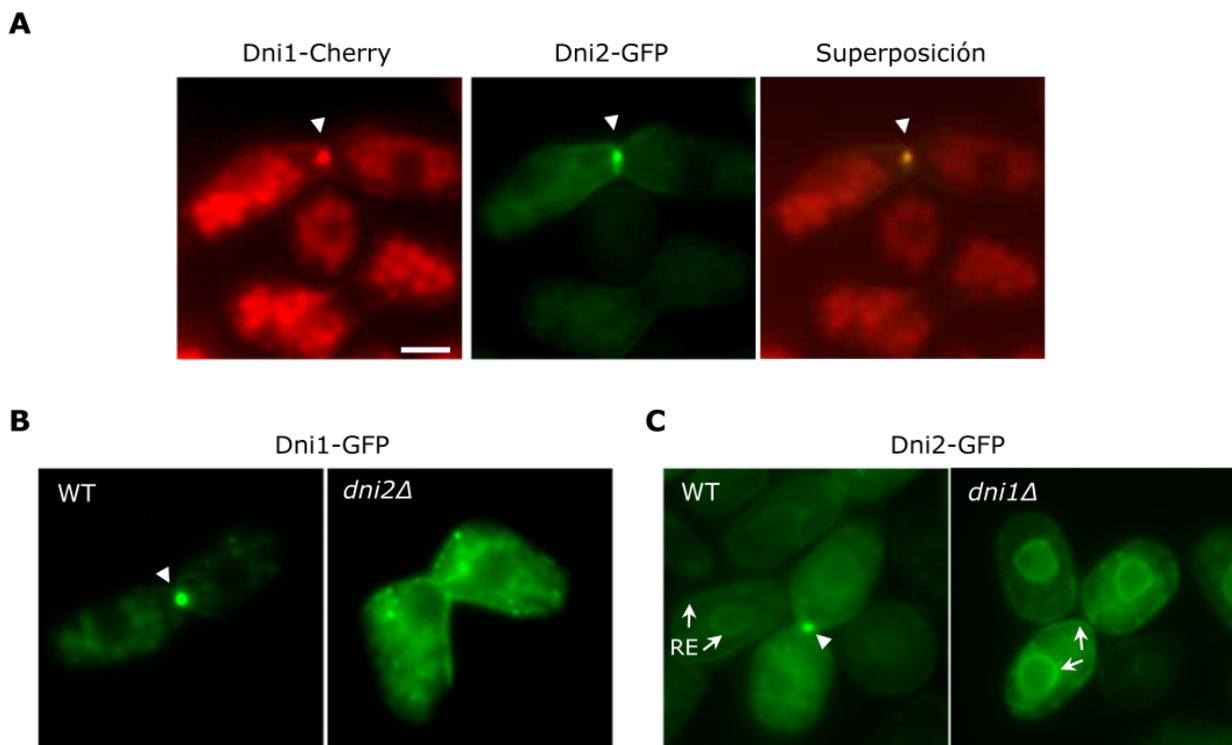


FIGURA 18:

Análisis de la localización de Dni1p y Dni2p. Fotografías de estipes *h⁹⁰* a las que se le ha inducido la conjugación con MM-N líquido. **(A)** Colocalización de las proteínas de fusión Dni1-mCherry (rojo) y Dni2-GFP (verde). Se muestra la superposición de ambas fluorescencias, donde el color amarillo indica la existencia de colocalización. **(B)** Análisis de la localización de Dni1-GFP en una estirpe control (WT) y en el mutante *dni2Δ*. **(C)** Comparación de la localización de Dni2-GFP en una cepa silvestre y en el mutante *dni1Δ*. Las puntas de flecha señalan el microdominio de fusión y las flechas el retículo endoplásmico (RE). Las fotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 2,5 μm.

2.1.3. Dni2p controla específicamente la localización de Dni1p

En *S. pombe* existen otras proteínas implicadas en conjugación que presentan una localización similar a la de Dni1p y Dni2p, como son Fus1p (Petersen et al., 1998b) y Prm1p (Curto et al., 2014). Para saber si Dni2p está implicada únicamente en concentrar de Dni1p como un punto discreto en el microdominio de fusión, o se trata de una organizadora

general de esta zona de la membrana plasmática, se analizó si Fus1p y Prm1p colocalizaban con Dni1p/Dni2p, y si su localización se alteraba en un mutante *dni2Δ*.

En la **figura 19A** se puede observar que, efectivamente, Fus1-GFP y Dni1-mCherry colocalizan en la zona de contacto entre dos *shmoos*. En la **figura 19B** se puede apreciar cómo Fus1-GFP no varía su localización cuando se ha delecionado *dni2⁺*, permaneciendo en ambos casos concentrada en el microdominio de fusión.

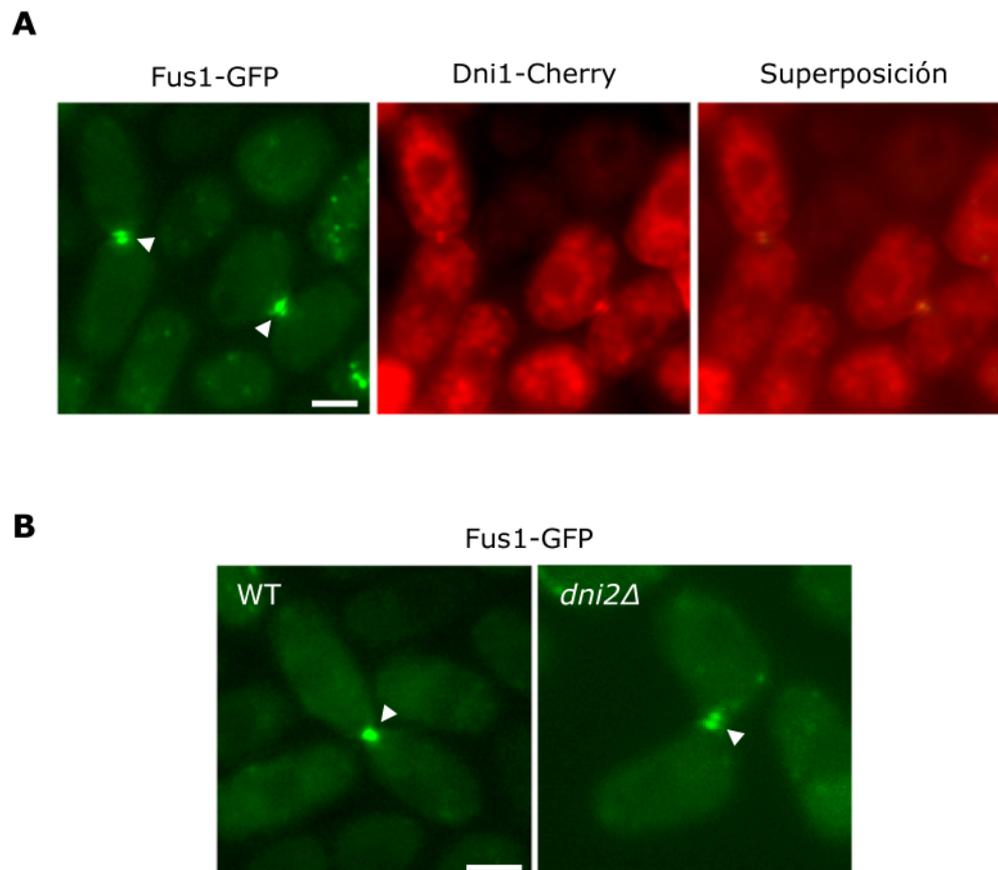


FIGURA 19:

Localización de Fus1p. Fotografías de zigotos de las estirpes indicadas. **(A)** Colocalización de las proteínas de fusión Dni1-mCherry y Fus1-GFP en una cepa silvestre. Se muestra la superposición de ambas fluorescencias, donde el color amarillo indica colocalización. **(B)** Análisis de la localización de Fus1-GFP en una estirpe WT y en el mutante *dni2Δ*. En ambos casos la conjugación se indujo con MM-N líquido. Las puntas de flecha señalan el microdominio de fusión. Las fotografías se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 2,5 μ m.

Con respecto a Prm1p, el análisis de colocalización con Dni1p se llevó a cabo en una estirpe homotática *h⁹⁰*, en la que se podían detectar zigotos, y también en una estirpe heterotática *cyr1Δ sxa2Δ* en la que se generan *shmoos* tras la adición de la feromona factor P, sin necesidad del compañero de tipo sexual opuesto. En la **figura 20A** se muestra que, efectivamente, Dni1p y Prm1p colocalizan espacio-temporalmente en el microdominio de fusión (se señala con una punta de flecha) tanto en la estirpe homotática como en la heterotática, indicando que esta colocalización no depende del contacto celular. Con el fin de determinar si la localización de Dni1p y/o Dni2p depende de Prm1p, y viceversa,

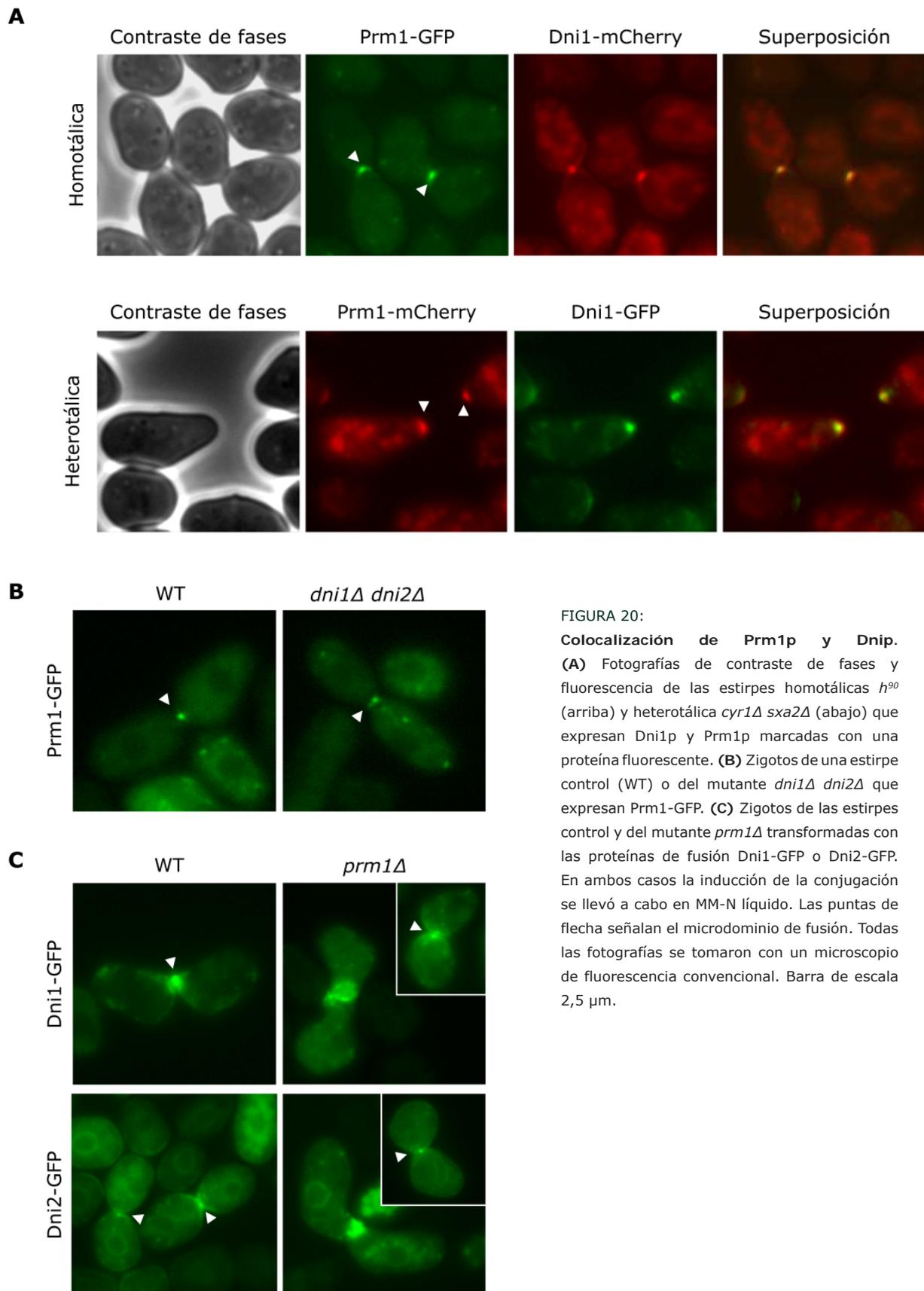


FIGURA 20:

Colocalización de Prm1p y Dni1p.

(A) Fotografías de contraste de fases y fluorescencia de las estirpes homotáticas *h⁹⁰* (arriba) y heterotática *cyr1Δ sxa2Δ* (abajo) que expresan Dni1p y Prm1p marcadas con una proteína fluorescente. (B) Zigotos de una estirpe control (WT) o del mutante *dni1Δ dni2Δ* que expresan Prm1-GFP. (C) Zigotos de las estirpes control y del mutante *prm1Δ* transformadas con las proteínas de fusión Dni1-GFP o Dni2-GFP. En ambos casos la inducción de la conjugación se llevó a cabo en MM-N líquido. Las puntas de flecha señalan el microdominio de fusión. Todas las fotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 2,5 μ m.

se comparó la distribución de estas proteínas en zigotos de una estirpe control y de los mutantes *prm1Δ*, *dni1Δ* y/o *dni2Δ*. En la **figura 20B** se observa cómo Prm1-GFP se sigue localizando en el microdominio de fusión en ausencia de Dni1p y/o Dni2p, al igual que lo hace en la cepa silvestre. Con respecto a Dni1p y Dni2p, es posible percibir que su distribución en el mutante *prm1Δ* es similar a la del WT, concentrándose en la zona de contacto entre los *shmoos* (**figura 20C**). Esto se aprecia claramente en zigotos tempranos (mostrados en los recuadros pequeños del panel correspondiente en la figura 20C). Sin embargo en una pequeña población de prezigotos, en los que el puente de conjugación ha crecido, se observa que tanto Dni1-GFP como Dni2-GFP se acumulan de forma difusa en una zona más amplia a la zona de contacto intercelular. Es posible que esto sea una consecuencia de la desorganización de la membrana plasmática descrita para el mutante *prm1Δ* (punto 1.5 y Curto et al., 2014) cuando los *shmoos* permanecen unidos sin fusionarse. En cualquier caso, no se observa una distribución a lo largo de toda la membrana plasmática, como es el caso de Dni1-GFP en el mutante *dni2Δ*.

Estos resultados indican que Dni2p no actúa como un regulador general de la localización de las proteínas necesarias para la fusión celular en la zona de contacto de los *shmoos*. Aunque no se pueda descartar la existencia de alguna otra proteína cuya localización en ese microdominio de la membrana plasmática dependa de Dni2p, podría intuirse que la función específica de Dni2p es concentrar a Dni1p en dicho microdominio para facilitar así la fusión celular.

2.1.4. La sobreexpresión de *dni1*⁺ o *dni2*⁺ no complementa la ausencia del otro gen

Una estrategia experimental que suele usarse para obtener información acerca del orden en el que intervienen dos genes de una misma ruta funcional, es averiguar si la sobreexpresión de uno de ellos es capaz de complementar un nivel reducido del otro gen. Se asume que si existe complementación es porque el gen sobreexpresado funciona después del gen mutado. Sin embargo esto tiene limitaciones, ya que si el gen sobreexpresado dependiera totalmente del producto del gen mutado para poder llevar a cabo su función, su presencia en un alto número de copias no sería capaz de complementar la delección del otro gen. En cualquier caso, con el fin de obtener más información acerca de la relación existente entre *dni1*⁺ y *dni2*⁺, se procedió a clonar ambos genes en plásmidos multicopia pREP3x que los expresarían bajo el control del promotor *nmt1*⁺ reprimible por tiamina (Maundrell, 1993). De acuerdo con la información disponible en PomBase, este promotor se reprime parcialmente durante la conjugación, por lo que la sobreexpresión de estos genes no fue excesivamente alta en dichas condiciones. En un mutante *dni1Δ* que expresaba el plásmido pREP3x*dni1*⁺ se observó que a 32°C la eficiencia de fusión aumentaba del 3% (eficiencia de fusión de la cepa que porta el vector vacío) al 54%. Por su

parte, si el mutante *dni2Δ* expresaba pREP3*dni2*⁺, la eficiencia de fusión se incrementaba hasta el 81%. Seguramente esta diferencia entre los valores obtenidos al sobreexpresar cada gen se debe a que la sobreexpresión de *dni1*⁺, pero no la de *dni2*⁺, es perjudicial para las células (ver punto 4). En cualquier caso, la sobreexpresión de cada gen complementa, al menos parcialmente, la delección del mismo.

En la **figura 21** se muestran fotografías de zigotos de los mutantes *dni1Δ* o *dni2Δ* transformados con el vector vacío, o bien con los plásmidos que sobreexpresan los genes objeto de estudio. Cuando cada uno de los mutantes porta el vector vacío, se observa una acumulación de prezigotos. En el caso de que cada mutante presente el plásmido que sobreexpresa el propio gen, se detectan ascas con cuatro ascosporas, debido a la complementación de la mutación. Sin embargo, cuando cada mutante se ha transformado con el plásmido que sobreexpresa el otro gen, no se detectan ascas, sino prezigotos, lo que demuestra que las cepas parentales no son capaces de fusionarse y que, por lo tanto, no existe complementación cruzada. Este resultado sugiere que ambos genes funcionarían en paralelo, de modo que cada una de las proteínas necesitaría a la otra para ser funcional. Además, estaría de acuerdo con que la localización de Dni1p y Dni2p fuera interdependiente, y nuevamente sugiere que ambas proteínas podrían formar un complejo.

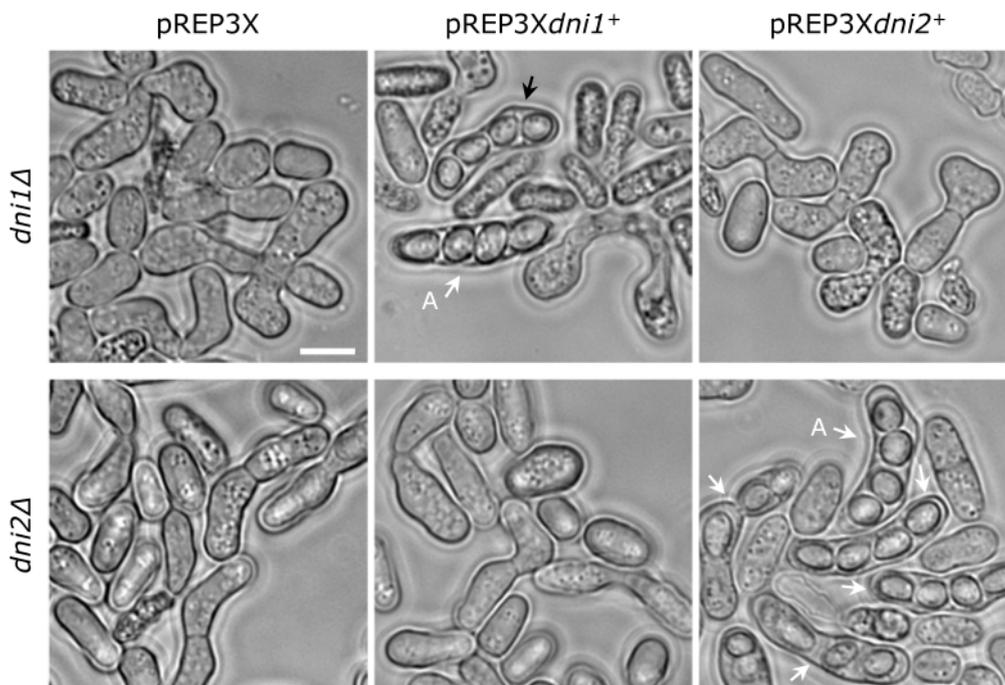


FIGURA 21:

Análisis de complementación por sobreexpresión. Fotografías de las cepas *h⁹⁰ dni1Δ* o *h⁹⁰ dni2Δ* a las que se les ha inducido la conjugación en placas de MM incubadas a 32°C durante dos días. Las estirpes portan plásmidos de sobreexpresión bajo el control del promotor *nmt1*⁺ reprimible por tiamina. La presencia de ascas (A, señaladas con una flecha) indica complementación del defecto de fusión por el plásmido correspondiente. Las fotografías se realizaron con un microscopio de contraste de fases. Barra de escala 5 μm.

2.1.5. Dni1p y Dni2p forman un complejo

Con el fin de averiguar si efectivamente Dni1p y Dni2p actuaban en el mismo nivel de la ruta funcional mediante la formación de un complejo, se llevó a cabo un ensayo de coimmunoprecipitación. Esta técnica se basa en la detección de una proteína a partir de un precipitado de la otra. Para llevarla a cabo se expresaron en una cepa *h⁹⁰* ambas proteínas marcadas con etiquetas diferentes (Dni1-HA y Dni2-GFP) bajo el control de sus propios promotores. Como controles del experimento se incluyeron dos cepas adicionales que únicamente portaban una de las proteínas marcadas. Para la realización de esta técnica se inmunoprecipitó Dni2-GFP y se procedió a la detección de Dni1-HA en el mismo inmunoprecipitado. El experimento se realizó partiendo de sobrenadantes de muestras de membranas extraídas con Digitonina y TritonX-100, y centrifugadas a 100.000 xg, como se ha indicado en el apartado de "Materiales y Métodos". En la **figura 22** se puede apreciar que en los extractos totales se detecta cada proteína en las cepas que la expresan. En el inmunoprecipitado revelado con anti-GFP se puede observar que Dni2-GFP se precipitó eficientemente. Por su parte al revelar este inmunoprecipitado con anti-HA, es posible detectar Dni1-HA en la cepa que porta simultáneamente Dni2-GFP, confirmando la interacción entre las proteínas Dni1p y Dni2p. Sin embargo, si la cepa expresaba Dni1-HA pero no Dni2-GFP, no se apreció nunca la presencia de Dni1-HA, indicando que la detección de Dni1-HA es específica por coimmunoprecipitación. Aunque no demuestra si la interacción entre ambas proteínas es directa, sí que demuestra que Dni1p y Dni2p forman parte de un complejo.

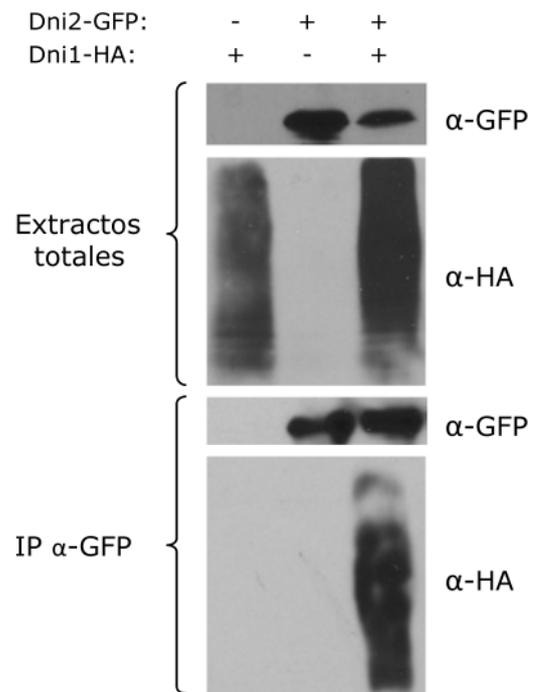


FIGURA 22:

Coinmunoprecipitación entre Dni1p y Dni2p. Extractos celulares de estirpes que expresan las proteínas de fusión Dni1-HA y/o Dni2-GFP que se analizaron mediante *Western-blot* empleando los anticuerpos monoclonales anti-GFP (α -GFP) o anti-HA (α -HA). Alícuotas de los extractos se inmunoprecipitaron con bolitas magnéticas recubiertas por un anticuerpo anti-GFP para la inmunoprecipitación (IP) y se analizaron por *Western-blot* con los anticuerpos anti-GFP y anti-HA. También se analizaron alícuotas antes de llevar a cabo la inmunoprecipitación (extractos totales).

2.2. Relación estructura-función de Dni1p y Dni2p

Según la base de datos PomBase, Dni1p y Dni2p contienen 4 dominios transmembrana y los extremos N y C orientados hacia el interior celular. El extremo N-terminal es muy corto (6 aa en Dni1p y 25 aa en Dni2p), mientras que el C-terminal presenta un mayor tamaño

(33 aa en Dni1p y 37 aa en Dni2p). El primer lazo extracelular es el más grande de todos los lazos que conectan las regiones transmembrana (68 aa en Dni1p y 64 en Dni2p) (**figura 23**). Esta topología se corresponde con la típica de las claudinas (Gunzel y Yu, 2013). El primer lazo extracelular de Dni1p y Dni2p contiene dos cisteínas formando parte de un motivo conservado en las "claudinas fúngicas" de la familia Fig1 (Clemente-Ramos et al., 2009). Ambas cisteínas están presentes en las claudinas de metazoos. Con el fin de averiguar si algunos de estos elementos estructurales pudieran ser importantes para la función de Dni1p y Dni2p, y por tanto si estas proteínas guardaran algún tipo de relación funcional con las claudinas de metazoos, se procedió a mutagenizar las cisteínas conservadas. Además se deletionó el extremo C-terminal de ambas proteínas, ya que en las claudinas éste es necesario para su localización y estabilidad, además de conectarlas con el citoesqueleto de actina (Gunzel y Yu, 2013). Con los mutantes obtenidos se realizaron diversos estudios, que se detallan a continuación.

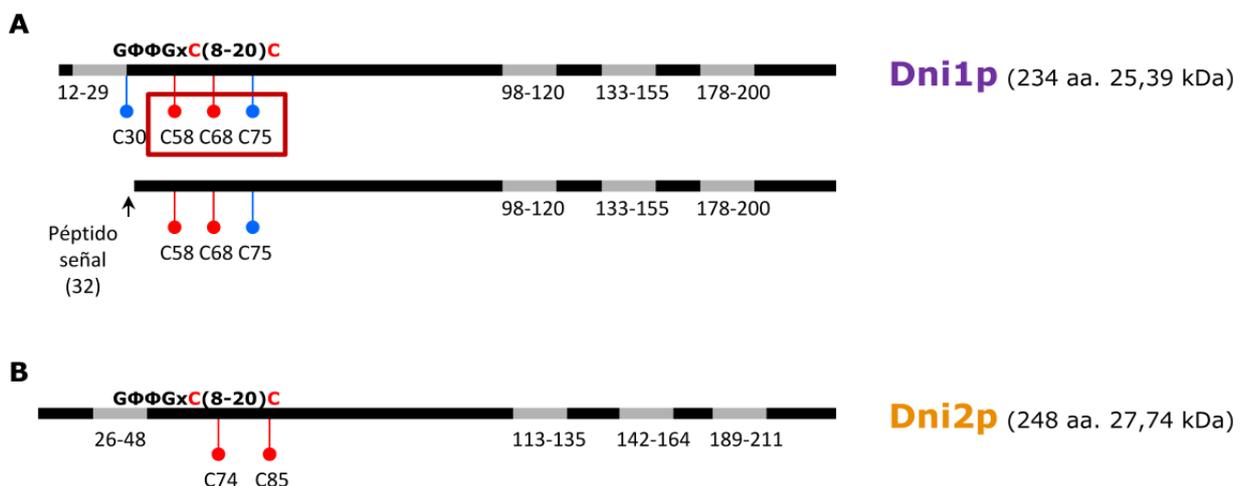


FIGURA 23:

Representación gráfica de la similitud estructural de Dni1p y Dni2p con las claudinas. Esquema de la predicción proporcionada por la aplicación TMHMM de la ubicación y extensión de los dominios transmembrana (representados en gris) en la secuencia de Dni1p (**A**) y de Dni2p (**B**). Se muestra la secuencia consenso de la familia Fig1p con similitud a la de claudinas, donde $\Phi = Y, F, L$ o M . Se señalan con un círculo azul las cisteínas presentes en el primer lazo que no están conservadas por alineamiento de secuencia, y con un círculo rojo las que sí lo están. El rectángulo granate indica las posibles cisteínas que podrían pertenecer a la secuencia consenso. La flecha señala el sitio de corte predicho para el péptido señal.

2.2.1. Los elementos estructurales que Dni1p comparte con las claudinas no son esenciales para su función

Consideraciones previas: topología de Dni1p.

Lo primero que hay que mencionar es que el número y la ubicación de los dominios transmembrana (DTM) de Dni1p no parecen estar demasiado claros, y varían según el modelo de predicción que se utilice. En este trabajo se han tomado como referencia los

datos que aparecen en la base de datos de *S. pombe* PomBase (**figura 23A**), que establecen la existencia de un péptido señal en el extremo N-terminal. Sin embargo, cuando se utilizan diversas aplicaciones específicas para la búsqueda del sitio de corte del péptidos señal en las proteínas, la presencia del mismo en Dni1p varía según el programa utilizado. Dependiendo de si el hipotético péptido señal se procese o no, Dni1p podría contener 3 o 4 dominios transmembrana, y por tanto podría diferir de la estructura típica de las claudinas. Por otro lado, a pesar de que Dni1p contiene la secuencia consenso de la familia Fig1, que es similar al motivo típico de claudinas (Clemente-Ramos et al., 2009), esta secuencia no aparece estrictamente conservada, ya que la segunda glicina se sustituye por una asparagina. Además, aunque las cisteínas C58 y C68 sean las conservadas por alineamiento de secuencia, dentro del rango de 8-20 aminoácidos que pueden estar separadas entre sí, aparece otra (C75), que perfectamente pudiera formar parte del motivo conservado. Por otro lado, existe una cisteína adicional, en la posición 30, que no formaría parte de la secuencia consenso, pero que se encuentra muy cercana y sería susceptible de formar puentes disulfuro. Su presencia en la proteína dependería de si hay o no escisión del péptido señal, puesto que está incluida en dicha región. A pesar de estas consideraciones, con el fin de averiguar si las cisteínas C58, C68 y C75 eran importantes para la función de Dni1p, se intercambiaron por serinas mediante mutagénesis dirigida. La serina es un aminoácido de un tamaño similar a la cisteína que carece del grupo -SH, y por tanto es incapaz de establecer puentes disulfuro. Asimismo se delecionaron los 31 últimos aminoácidos de extremo C-terminal. Estas proteínas mutadas se denominaron Dni1_{C58S}, Dni1_{C68S}, Dni1_{C75S} y Dni1_{ΔCT}, respectivamente.

Funcionalidad:

Para comprobar si alguna de las mutaciones generadas comprometían la función de Dni1p, se indujo la conjugación en cepas *h⁹⁰ dni1Δ* que expresaban los alelos mutantes o el alelo silvestre que codifica la proteína, y se calculó el porcentaje de fusión. El experimento se realizó en placas de MM incubadas a 32°C durante dos días. En la **figura 24A** se observa que cuando se elimina cualquiera de las cisteínas por separado, la proteína continúa siendo funcional. La capacidad de fusión desciende tan sólo sutilmente si se mutagenizan simultáneamente las cisteínas conservadas por alineamiento de secuencia (C58 y C68), y disminuye drásticamente en la proteína Dni1_{C58SC68SC75S}, carente de las tres cisteínas. Este resultado puede deberse a la eliminación de todas las posibilidades para la formación de puentes disulfuro intramoleculares, potencialmente necesarios para la función, o a que en la proteína con la triple mutación el plegamiento de la proteína se vea afectado y esto altere su estabilidad. Con respecto al extremo C-terminal, se puede observar que no es necesario para que Dni1p realice su función, puesto que la cepa que expresa la forma de Dni1 truncada (Dni1_{ΔCT}) es capaz de fusionarse y por tanto esporular a unos niveles similares a los de la estirpe WT.

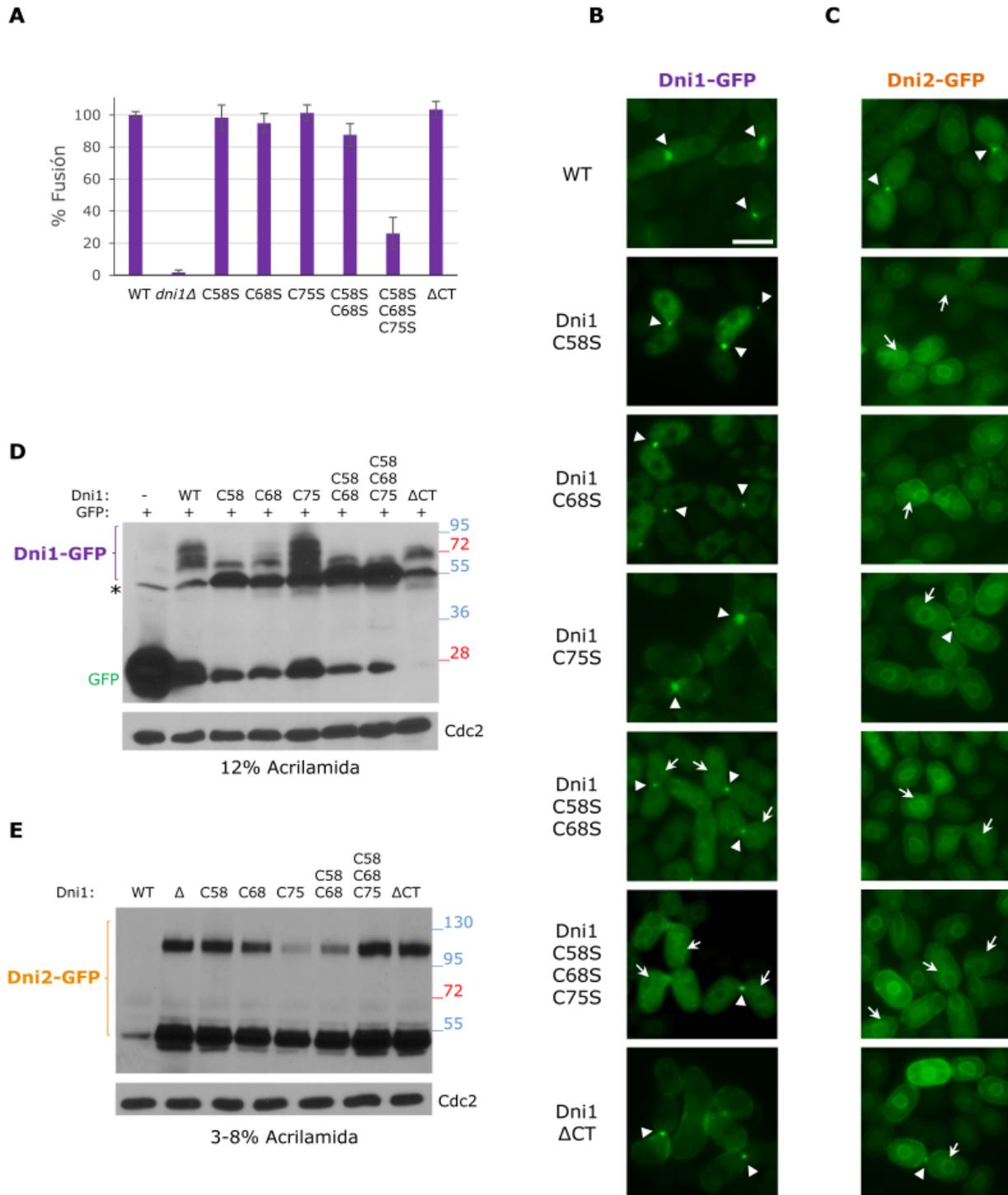


FIGURA 24:

Análisis de la funcionalidad de proteínas Dni1p carentes de los elementos que comparte con las claudinas. Diferentes estudios realizados con cepas *h⁹⁰* que expresan versiones mutantes de *dni1⁺* donde se han mutagenizado las cisteínas del primer lazo extracelular (Dni1_{C58S}, Dni1_{C68S}, Dni1_{C75S}, Dni1_{C58S C68S} y Dni1_{C58S C68S C75S}), o se ha eliminado el extremo C-terminal (Dni1_{ΔCT}). (A) Representación gráfica del porcentaje de fusión de cepas que expresan las distintas versiones mutantes para *dni1⁺*. La inducción de la conjugación se llevó a cabo en placas de MM durante 2 días a 32°C, n=500. (B) Zigotos que expresan las proteínas mutantes generadas para Dni1p fusionadas a la GFP. (C) Zigotos de los mutantes de *dni1⁺* que expresan la proteína de fusión Dni2-GFP. En ambos casos la inducción de la conjugación se llevó a cabo en MM-N líquido. Las puntas de flechas señalan el microdominio de fusión y las flechas zigotos en los que aparece marcaje en el retículo endoplásmico. Las fotografías se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 5 μm. (D) Western-blot de las mismas cepas y cultivadas en iguales condiciones que en B, empleando los anticuerpos anti-GFP y anti-Cdc2 (control de carga). El asterisco señala bandas inespecíficas. (E) Western-blot análogo a D, de cepas que expresan distintas versiones de *dni1⁺* y la proteína de fusión Dni2-GFP. Los cultivos se realizaron en condiciones similares a C.

Localización:

Para estudiar la ubicación intracelular de las versiones mutantes de Dni1p, se procedió a fusionarles una GFP en el extremo C-terminal. En la **figura 23B** se puede apreciar cómo los mutantes simples de cada una de las cisteínas presentan una localización correcta que, como se ha descrito anteriormente, consiste en un punto fluorescente en el microdominio de fusión (indicado con una punta de flecha). En los mutantes doble C58SC68S y triple C58SC68SC75S sólo se detecta señal fluorescente en la punta del *shmoo* en alrededor de un 50% de los cigotos, mientras que se aprecia cierto marcaje en el retículo endoplásmico (RE) (se señala con una flecha). Es posible que al modificar varias cisteínas simultáneamente, las proteínas Dni1 mutadas presenten problemas de plegamiento, y por ello queden parcialmente retenidas en dicho orgánulo. Aun así, cierta cantidad de proteína es capaz de llegar a su lugar de actuación, y por lo tanto la fusión celular puede proseguir con una eficiencia razonable en el mutante doble. En el caso del mutante triple, o bien la cantidad de proteína que llega a la punta de los *shmoos* es menor, o bien esta proteína es incapaz de llevar a cabo su función de una forma eficiente por la pérdida específica de esas tres cisteínas del primer lazo extracelular. Con respecto a la delección del extremo C-terminal, se puede observar una localización correcta de la proteína en la zona de fusión celular, pero también aparece fluorescencia a lo largo de toda la membrana plasmática. Además llama la atención que en este mutante se detecta menos señal en las vacuolas, que es el orgánulo donde se degradan las proteínas de membrana tras su endocitosis. Este resultado plantea la posibilidad de que el extremo C-terminal de Dni1p contenga alguna señal de endocitosis, y al eliminarlo la proteína permaneciera más tiempo en la membrana plasmática (ver más adelante, punto 3.1.3.).

Localización de Dni2p:

Como se ha comentado en el punto 2.1.2., Dni1p es necesaria para la localización de Dni2p en la punta del *shmoo*. Se quiso analizar si existía una correlación entre el nivel de funcionalidad de las formas mutadas de Dni1p con dicha localización. Para abordar esta cuestión se expresó la proteína de fusión Dni2-GFP en las cepas que portaban los alelos mutantes de *dni1*⁺. En la **figura 24C** se muestran las imágenes, y se puede observar que en los mutantes de *dni1*⁺, Dni2p se detecta exclusivamente en el RE (se señalan los cigotos con una flecha), sin observarse como un punto discreto de fluorescencia en la zona de contacto celular. Sólo en el caso del mutante Dni1_{C75S} se detecta una señal débil de Dni2-GFP en el microdominio de fusión (se señala con una punta de flecha). Estos resultados indicarían que tanto las cisteínas C58, C68 y C75, como el extremo C-terminal de Dni1p son necesarios para que Dni2p se localice correctamente en el microdominio de fusión. El hecho de que Dni2p permanezca en el RE, y aun así se siga produciendo la fusión celular, sugiere que la parte funcional del sistema podría ser Dni1p. Esta hipótesis también está de acuerdo con que aquellas versiones mutantes de Dni1p en las que una parte de la

señal fluorescente se detecta en el RE (las que tienen dos y tres cisteínas mutadas) pierdan parte de la funcionalidad. Por lo tanto, es posible establecer que la fusión celular depende de la presencia de Dni1p en la punta del *shmoo*.

Cantidad de proteína:

Para analizar si las versiones mutantes de Dni1p se estaban expresando en las células de *S. pombe*, y si lo hacían o no al mismo nivel que la proteína silvestre, se realizó un análisis de *Western-blot*. De esta manera se pudo comprobar que la proteína WT se encuentra altamente modificada, ya que se detecta como una serie de bandas de tamaño superior al esperado (25,4 kDa para Dni1 según lo especificado en la base de datos PomBase, más unos 28 kDa para la GFP) (**figura 24D**). Este patrón de modificación se mantiene sólo en el mutante C75S. Además se puede observar que la reducción en la funcionalidad asociada a las proteínas mutadas Dni1_{C58SC68S} y Dni1C_{58SC68SC75S} no se puede atribuir a una menor cantidad de proteína, ya que estas están presentes en los extractos celulares con unos niveles similares a los de las proteínas con las mutaciones simples C58S o C68S, que son funcionales. Con respecto al mutante con la delección del extremo C-terminal, prácticamente no se observa la banda de 28-30 KDa. Esta banda coincide en tamaño con el de la GFP, por lo que se asume que corresponde a la GFP de las proteínas de fusión que seguramente se escinde tras su degradación en la vacuola, y que podría considerarse un indicador del nivel de degradación de las mismas. Por esta razón, aunque no se detecte una mayor cantidad de proteína Dni1_{ΔCT}-GFP, el mutante con la delección del extremo C-terminal parecía ser más estable. Esto estaría de acuerdo con la hipótesis de que Dni1_{ΔCT} no se estuviera endocitando para su degradación, y como consecuencia permaneciera más tiempo en la membrana y difundiera fuera del microdominio de fusión, lo que permite su observación a lo largo de la membrana plasmática del cigoto (**figura 24B**).

Cantidad de Dni2p:

Para comprobar si las mutaciones generadas en Dni1p influían en la cantidad de proteína de Dni2p, se llevó a cabo nuevamente un *Western-blot*. De esta forma se percibió que en todos los mutantes de *dni1*⁺ (incluido el mutante nulo *dni1Δ*) aumentaba la cantidad de Dni2p (**figura 24E**). Esto podría deberse a que Dni2p se estaba quedando retenida en el RE. Es posible que Dni1p pudiera actuar como una chaperona que contribuya al correcto plegamiento de Dni2p en el RE, permitiendo su salida de este orgánulo y su transporte a la membrana plasmática. De esta forma, las cisteínas de Dni1p, en lugar de formar puentes disulfuro intramoleculares, es posible que pudieran establecer puentes disulfuro con las cisteínas de Dni2p, interviniendo en el proceso de plegamiento de la misma.

Todos estos resultados demostraron que ninguna de las cisteínas del motivo conservado por sí sola, ni el extremo C-terminal de Dni1p, son vitales para que la proteína realice su función. Asimismo, los hechos de que Dni1p pudiera no contener 4 hélices transmembrana, y de que presente más de dos cisteínas en el motivo conservado permitirían concluir que Dni1p no se comporta como una claudina en cuanto a su relación estructura-función.

2.2.2. Los elementos estructurales que Dni2p comparte con las claudinas son esenciales para su función

Estudios similares a los realizados con Dni1p se llevaron a cabo para Dni2p. El objetivo era averiguar si los elementos estructurales conservados en las dos proteínas, y que comparten con las claudinas de metazoos, juegan algún papel en la funcionalidad de Dni2. En este caso se mutagenizaron las dos cisteínas conservadas del primer lazo extracelular (C74 y C85), siendo las únicas presentes en toda su secuencia, y se eliminaron los últimos 37 aa del extremo C-terminal. Las proteínas mutadas se denominaron Dni2_{C74S}, Dni2_{C85S} y Dni2_{ΔCT}.

Funcionalidad:

Al analizar la eficiencia de fusión de los mutantes generados para *dni2*⁺, se observó que en los mutantes simples de cada una de las cisteínas se producía un descenso drástico en la funcionalidad (**figura 25A**). De igual manera, cuando se deleccionaba el extremo C-terminal, la funcionalidad de la proteína descendía considerablemente.

Localización:

En la **figura 25B** se puede percibir que todas las versiones mutantes de Dni2p se detectan tanto en el RE (se señalan los zigotos con una flecha) como en el microdominio de fusión (se indica con una punta de flecha). Aunque a priori pudiera parecer una localización correcta, no lo es, ya que en una estirpe silvestre Dni2-GFP emite una señal fuerte en el RE sólo en el caso de células que no han comenzado a conjugarse. Una vez que se forma el *shmoo* y éste contacta con otro del tipo sexual opuesto, la señal del RE se reduce y la proteína se detecta mayoritariamente como un punto discreto en la zona de contacto celular. En los mutantes de Dni2p, aunque se aprecia cierta señal en el microdominio de fusión en un 35% de los zigotos, la fluorescencia del RE no se atenúa. Este resultado podría indicar una retención en el RE de las proteínas mutadas por varias razones, como podrían ser fallos en una posible oligomerización mediada por puentes disulfuro intermoleculares con ella misma o con otras proteínas, como Dni1p. Sin embargo también podría deberse a fallos en su plegamiento al no poderse formar puentes disulfuro intramoleculares que estabilicen la proteína, como se asume que sucede en las claudinas.

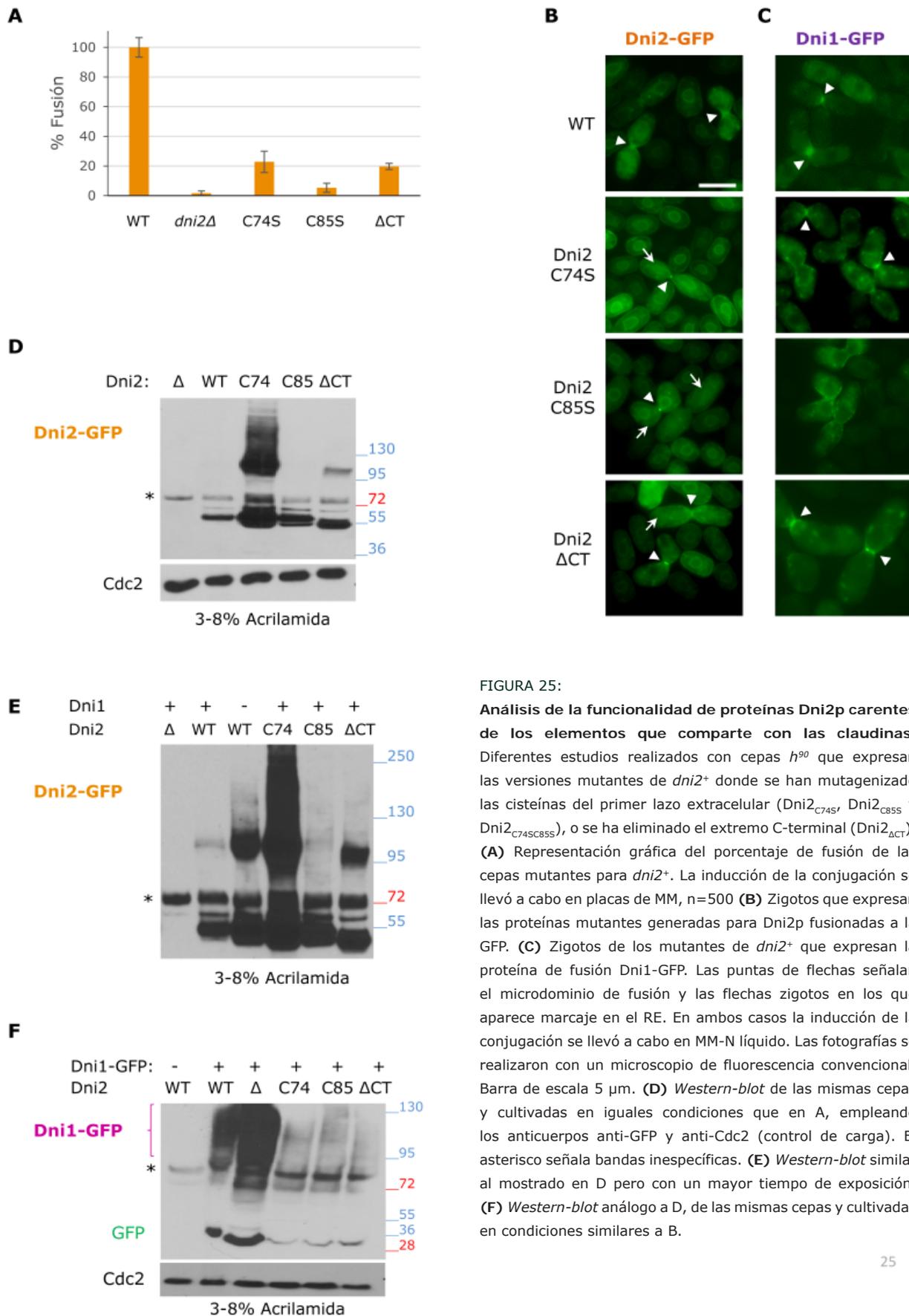


FIGURA 25:

Análisis de la funcionalidad de proteínas Dni2p carentes de los elementos que comparte con las claudinas.

Diferentes estudios realizados con cepas *h⁹⁰* que expresan las versiones mutantes de *dni2⁺* donde se han mutagenizado las cisteínas del primer lazo extracelular (Dni2_{C74S}, Dni2_{C85S} y Dni2_{C74SC85S}), o se ha eliminado el extremo C-terminal (Dni2_{ΔCT}). (A) Representación gráfica del porcentaje de fusión de las cepas mutantes para *dni2⁺*. La inducción de la conjugación se llevó a cabo en placas de MM, n=500 (B) Zigotos que expresan las proteínas mutantes generadas para Dni2p fusionadas a la GFP. (C) Zigotos de los mutantes de *dni2⁺* que expresan la proteína de fusión Dni1-GFP. Las puntas de flechas señalan el microdominio de fusión y las flechas zigotos en los que aparece marcaje en el RE. En ambos casos la inducción de la conjugación se llevó a cabo en MM-N líquido. Las fotografías se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 5 μm. (D) *Western-blot* de las mismas cepas y cultivadas en iguales condiciones que en A, empleando los anticuerpos anti-GFP y anti-Cdc2 (control de carga). El asterisco señala bandas inespecíficas. (E) *Western-blot* similar al mostrado en D pero con un mayor tiempo de exposición. (F) *Western-blot* análogo a D, de las mismas cepas y cultivadas en condiciones similares a B.

Localización de Dni1p:

Para comprobar si la falta de funcionalidad de las proteínas Dni2 mutadas era consecuencia de una localización incorrecta de Dni1p, se analizó la ubicación intracelular de Dni1-GFP en cepas *dni2Δ* que expresan diversas formas de Dni2. Se observó que en los mutantes carentes de las cisteínas (Dni2_{C74S} y Dni2_{C85S}), Dni1-GFP aparece localizada de forma discontinua a lo largo de la membrana plasmática (**figura 25C**), de manera similar a como lo hace en el mutante nulo *dni2Δ* (**figura 18B**). En el caso de la cepa que expresa la proteína con la mutación C74S, sí que es posible detectar cierto incremento de la intensidad de Dni1p en la zona intercelular en un 25% de los zigotos. Esto se correlaciona con el hecho de que esta proteína mutante sea capaz de promover la fusión celular con cierta eficiencia (ligeramente superior al 20% con respecto a la estirpe control). Sin embargo, si la cisteína que se mutageniza en Dni2p es la C85, Dni1-GFP jamás se localiza en la punta del *shmoo*, lo que se correlaciona con una falta total de funcionalidad. Por su parte, en el caso de la estirpe que expresa la proteína mutante Dni2_{ΔCT}, Dni1-GFP se observa en el microdominio de fusión en un 56% de los *shmoos*. Además parte de la proteína se detecta en puntos citoplasmáticos cuya naturaleza se desconoce, aunque podrían indicar una retención parcial de la proteína en algún orgánulo implicado en su transporte intracelular. Nuevamente se puede apreciar cierta correspondencia entre un pequeño nivel de funcionalidad y cierta detección de Dni1p en la punta del *shmoo*. En cualquier caso, en los mutantes que expresan Dni2_{C74S} y Dni2_{ΔCT}, la señal de Dni1-GFP no consiste en un punto nítido e intenso como en la estirpe WT, sino que parece más dispersa y débil.

En conjunto todos estos datos señalan que para que se produzca la fusión celular, Dni1p necesita permanecer concentrada en el microdominio de fusión, indicando de nuevo que la parte funcional del complejo Dni1/Dni2 sería Dni1p. En las cepas que expresan las proteínas mutantes Dni2C74S y Dni2ΔCT, Dni1p se detecta concentrada en un porcentaje de los zigotos, no en todos. Además, esta concentración no es tan eficiente como en el WT, lo que permitiría explicar el descenso de la funcionalidad.

Cantidad de proteína:

Al analizar los niveles de las versiones mutantes de Dni2p mediante *Western-blot*, se puede observar en todos los casos un aumento significativo con respecto al nivel de la cepa que expresa la proteína Dni2 silvestre (**figura 25D**). Esto podría deberse a que continúe la síntesis de las proteínas mutadas, pero al quedar estas retenidas en el RE y no llegar suficiente cantidad a la zona de actuación, no se degradaría posteriormente en las vacuolas. Además estas moléculas tampoco estarían siendo eliminadas por el sistema ERAD, que degrada las proteínas mal plegadas que quedan retenidas en el RE. En el

caso de algunas de las proteínas mutantes, en particular en la forma C74S, se observa una acumulación de formas de baja movilidad electroforética, que podrían corresponderse con modificaciones postraduccionales. Al exponer la película más tiempo, también se observaron estas modificaciones en la proteína (**figura 25E**). Por lo tanto, parece que el poder observarlas en las proteínas mutadas se debe exclusivamente a que estas se encuentran en mayor cantidad en los extractos celulares. En ausencia de *dni1⁺*, situación en que Dni2p se localiza únicamente en el RE, también se produce una acumulación de estas formas de mayor peso molecular (**figura 25E**, tercer carril desde la izquierda).

Cantidad de Dni1p:

Con respecto a los niveles de proteína de Dni1p en estos mutantes, en la **figura 25F** se muestra cómo la cantidad de Dni1p se incrementa en el mutante nulo *dni2Δ*, y disminuye marcadamente en las cepas que portan las proteínas mutantes Dni2_{C74S}, Dni2_{C85S} y Dni2_{ΔCT}. Este hecho podría contribuir al descenso de la funcionalidad observado en dichos mutantes, siempre que fuera necesario que una cantidad mínima de Dni1p tuviera que estar presente en la zona de contacto entre los *shmoos* para que se promoviera su concentración y/o su capacidad de mediar la fusión celular.

Coinmunoprecipitación:

Para analizar si la incapacidad de las versiones mutadas de Dni2p para concentrar una cantidad adecuada de Dni1p en el microdominio de fusión se debía a que la interacción entre las dos proteínas estaba comprometida, se llevó a cabo un ensayo de coinmunoprecipitación. El resultado se muestra en la **figura 26**. Aunque en los extractos totales revelados con el anticuerpo α-GFP se observa que existen variaciones entre los niveles de Dni2-GFP, Dni2_{C74S}-GFP, Dni2_{C85S}-GFP y Dni2_{ΔCT}-GFP, la cantidad que se inmunoprecipita es bastante eficiente. Esta variabilidad en el nivel de las proteínas no guarda correspondencia con lo que se había observado anteriormente (análisis *Western-blot* de la **figura 25D**) y pudiera deberse a que los protocolos utilizados para obtener los extractos fueron diferentes en ambos experimentos. Mientras que en el ensayo de *Western-blot* anterior las muestras correspondían a extractos totales obtenidos por precipitación con TCA, para realizar la inmunoprecipitación fue necesario mantener las proteínas en su estado nativo y extraerlas de la membrana con la ayuda de detergentes. Por tanto, es posible que la proteína carente de las cisteína C85 se estuviera extrayendo peor de la membrana, o que fuera más inestable una vez extraída. No obstante, en el laboratorio se ha observado experimentalmente que los niveles de ciertas proteínas pueden alterarse cuando la célula expresa a la vez otra proteína que interacciona con ella y que también se encuentra etiquetada, lo que podría explicar esta diferencia. Con respecto a Dni1p, en los extractos totales se observa que la cantidad de proteína es inferior en los mutantes de Dni2p, de manera análoga a los resultados obtenidos mediante *Western-blot*. Aunque la cantidad de partida de Dni1p

no fuera exactamente la misma a la del control, tras la coimmunoprecipitación se observa claramente que la interacción de la proteína con las versiones mutadas de Dni2p disminuye drásticamente. Además se obtuvo un resultado similar realizando la coimmunoprecipitación de manera inversa, es decir, al inmunoprecipitar Dni1-HA, la cantidad de Dni2_{C74S}-GFP, Dni2_{C85S}-GFP y Dni2_{ΔCT}-GFP que se detectó en los inmunoprecipitados era sustancialmente inferior a la que se obtuvo con Dni2-GFP (no mostrado).

Todos estos resultados indican que tanto las cisteínas del motivo conservado como el extremo C-terminal de Dni2p deben mantenerse para que la proteína pueda realizar eficientemente su función: concentrar a Dni1p en el microdominio de fusión de la membrana plasmática. Por lo tanto, las características estructurales que Dni2p comparte con las claudinas son esenciales para su función. Esto implica que, al menos estructuralmente, Dni2p es una claudina de levaduras.

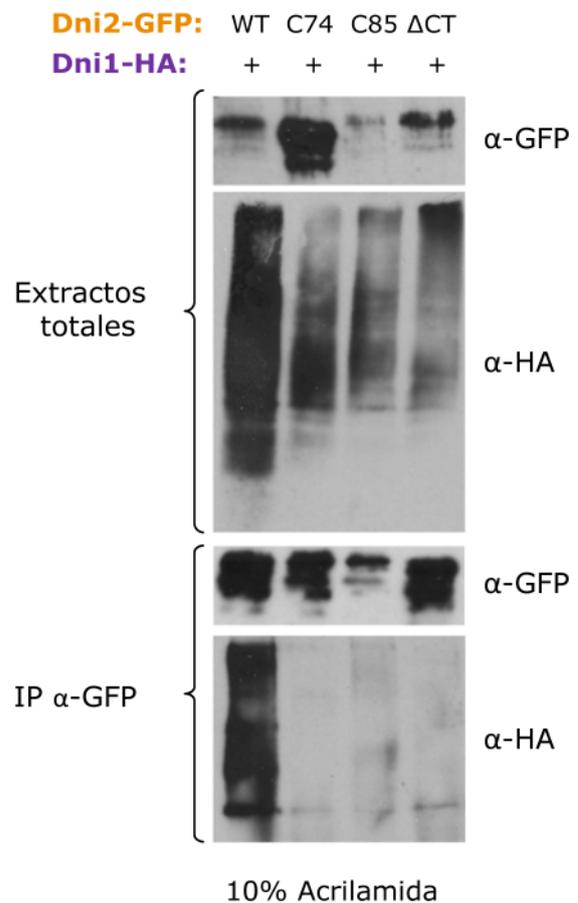


FIGURA 26:

Coinmunoprecipitación entre Dni1p y las versiones mutadas de Dni2p. Extractos celulares de estirpes que expresan las proteínas de fusión Dni1-HA y/o las formas mutadas generadas para Dni2 fusionadas a la GFP se analizaron mediante *Western-blot* empleando los anticuerpos monoclonales anti-GFP o anti-HA. Alícuotas de los mismos extractos se inmunoprecipitaron con bolitas magnéticas recubiertas por un anticuerpo anti-GFP para la inmunoprecipitación (IP) y se analizaron por *Western-blot* con los anticuerpos anti-GFP y anti-HA. También se analizaron alícuotas antes de llevar a cabo la inmunoprecipitación (extractos totales).

2.2.3. Otros elementos estructurales en Dni1 y Dni2: motivos *small-xxx-small*

Al analizar la secuencia de aminoácidos de Dni1p y Dni2p se detectó la presencia de motivos *small-xxx-small* en varios de los dominios transmembrana (DTM) predichos para cada una de ellas. Estos motivos están compuestos por dos aminoácidos de pequeño tamaño (glicina, serina o alanina), separados por tres aminoácidos cualesquiera. Estos motivos generan una estructura especial que promueve la interacción entre dos hélices transmembrana, y por tanto favorece la oligomerización de las proteínas que los portan (Lock et al., 2014). En las uniones estrechas las claudinas suelen disponerse a modo de filamentos, formados por oligomerización (Koval, 2013). Aunque la interacción

entre claudinas habitualmente se produce a través del segundo lazo extracelular (Lal-Nag y Morin, 2009), recientemente se han descubierto algunos ejemplos en los que tiene lugar a través de regiones transmembrana (Rossa et al., 2014; Gong et al., 2015). Dada la relación demostrada de Dni2 con las claudinas (apartado 2.2.2), se procedió a investigar *in silico* la existencia y conservación de motivos *small-xxx-small* en los dominios transmembrana de las claudinas. Para ello se utilizó el programa de alineación de secuencias CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). En la **tabla I** se muestran las secuencias alineadas de los DTMs de las claudinas humanas, de Dni1p y de Dni2p, resaltándose los aminoácidos pequeños de cada motivo *small-xxx-small*. Se señalan en diferentes colores los motivos en distintas posiciones, o los casos en que aparece más de un motivo en un mismo DTM pero que no está “en fase” con el anterior. De esta forma, es posible apreciar la existencia de motivos *small-xxx-small* en todos los miembros de la familia. El DTM1 de las claudinas humanas presenta un motivo *small-xxx-small* al principio de la secuencia que permanece conservado en la mayoría de los miembros. Este motivo no está presente ni en Dni1p ni en Dni2p. En el DTM2 llama la atención la presencia de dos motivos no encadenados conservados en varios miembros de la familia. Dni1p presenta un motivo doble (*small-xxx-small-xxx-small*) en esta hélice, que se alinea con el segundo motivo conservado en la mayor parte de las claudinas. Con respecto al DTM3 no se detecta un patrón conservado de distribución de estos dominios. Lo que sí se observa es la presencia de un aminoácido pequeño, que no forma parte de ningún motivo *small-xxx-small*, y que se mantiene en todas las claudinas humanas, así como en Dni1p y Dni2p. Dni2p presenta en esta tercera hélice un motivo *small-xxx-small* que no parece alinearse con ninguno de los presentes en otras claudinas. Con respecto al DTM4 es posible observar la presencia de motivos *small-xxx-small* en todas las claudinas alineadas, así como en Dni1p y Dni2p. En la mayoría de las proteínas se conserva un motivo doble al principio de la hélice y este motivo se mantiene en Dni2p. En Dni1p aparece también un motivo *small-xxx-small*, pero posicionado hacia el final de la hélice y conservado únicamente en una claudina humana, y que al contrario que Dni1p también presenta el motivo presente en la mayoría de los miembros de la familia en humanos. El hecho de que varios motivos *small-xxx-small* se conserven en la misma posición en distintas claudinas podría indicar que la presencia de estos motivos pudiera constituir una nueva característica que definiera a esta clase de proteínas. Dni2p mantiene el motivo *small-xxx-small* de la hélice 4, y dado que se ha demostrado que otros elementos estructurales de las claudinas influyen directamente en su función, sería posible que dicho motivo también lo hiciera. Por esta razón, se decidió estudiar con mayor detalle esta característica estructural.

Con el fin de averiguar si el motivo *small-xxx-small* del cuarto dominio transmembrana también estaba conservado en las claudinas de otros organismos, se analizó su presencia en las proteínas homólogas, o en las proteínas anotadas como “proteínas con similitud a claudinas”, en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Danio rerio*, así

TMD1		TMD2	
Cld11	-VATCLQVVG FVTS FVGWIGVI-----	Cld8	-----GLMCAASVMS FLAFMMAILGM--
Cld18	-----QVVAFLLSILGL GC IAATGM--	Cld10	-----GLMIAAPVSLG FFGSIFALFGM--
Dni1	-----VVQGTGTLCTLAAWILLALVMT--	Cld11	-----ALMIAASVLCGLPAILLLLTLV--
CLDND2	-----LQSGGILLSLVANVLMVLSA-----	Cld16	-----LMITADILAGFGFLLTLLGLD--
Cld7	-----LLGFSMALLGWVGLVACTAIP--	Cld1	-----ALMVVGILLGVIAIFVAVTGM--
Cld19	-----LLGYFLALG GW GIASALP--	Cld7	-----ALMVVSLVLCGLAMFVATMGM--
Cld1	-----LLGFILAFLLG W ICAIVSTALP--	Cld19	-----ALMVVAVLLG FVAMVLSVVG--
Cld3	-----GTALAVLGLWLTIVCCALPMW	Cld2	-----AMMVTSSAISGLACIISVVG--
Cld4	-----VMGIALAVLGLAVMLCCALP--	Cld14	-----ALMVISCLLSGLIACCAVIG--
Cld9	-----LLGMTLAVLGLWLTIVSCALP--	Cld20	-----ATMVLACVLSALGICTSTVGM--
Cld6	-----ILGVVLTLLG WV NGLVSCALP--	CLDND2	-----LAVTVACMVLAVGVGVVGMVM
Cld5	-----ILGLVLCLVGVGGLILACGLP--	Cld17	-----ALMCVAVALSLIALLIGICGM--
Cld2	-----LVGYILG LL GLLCTLVMLLP--	Cld6	-----ALCVIALLVLFGLLVYLAGA--
Cld20	-----LLAFILALG V SGVLTATLLP--	Cld9	-----ALCVIALLLALLGLLVAITGA--
Cld8	-----IAGLFLGGVMVGTVAVTVMP--	Cld3	-----ALIVVAILLA A FGLLVALVGA--
Cld17	-----IAGLVLCFLGMVGTLATLLP--	Cld5	-----ALTVSAVLLAFVALFVTLAGA--
Cld14	-----LLGFLLSFLGMVGTLTITILP--	Cld15	IQACRALMITAILLGLFGLLLGIAG--
Cld22	-----LAGVSLSLG W VLSCLTNYL--	Cld18	-----ALMIVGIVLCAIGLLVSIFAL--
Cld25	-----LGGLLLSLG W VCSCVTTILP--	Cld4	-----ALVVISIIVVALGVLLSVVG--
Cld24	-----SVGLLLSLG W ILSIITTYLP--	Cld22	-----ILMFLSNGLGLFGLLVSGFGL--
Cld15	--SMAVETFGFFMATVGLMLLGVTL----	Cld24	-----ILMFLSNGLGLFGLLVSGFGL--
Cld23	---PVVMTLGMVLAPCGLLN-LTG----	Cld25	-----ILMVASHGLGLLGLLCSFGS--
Cld34	-----FSVFALTTIC W ILSSTSTLV--	Cld23	-----ALMVTSLAA T VLGLLLASLGV--
Cld10	MASTASEIIAFMVISIGWVLV-----	CLDND1	-----FLLPFVSLGLMCFGALIGLCA--
Cld12	-----VLSFLCGIA S VGLFGLTLLP--	Dni2	-----VLLAIVVVFSTLSIVLTLKYLAA
Dni2	-----IFSNAILGIAWLFIFLCCSCLT-	Cld12	-----FLPLSMLIA M AGALLCLIGM--
CLDND1	-----FATAFVIACVLSLISTIYMAA----	Cld34	-----FLPFEISMAQRFLLT S IF F --
Cld16	-----LLQYIACFFA F FSAGFLIVAT--	Dni1	-----WMIVFSFCVCGV S FLMGVVSLLP
TMD3		TMD4	
Cld8	-ILLT--AGIIFIITGMVVLIPVS-----	Cld18	----LFGVWVAGGLTLIGVMMCIA--
Cld9	-IVLT--AGVILLLAGILVLPVC-----	Cld4	-GASLYVGWAASGLLLGGGLL-----
Cld6	-LVLT--SGIVFVISGVLTLPVC-----	Cld6	-GASLYLWGAASGLLLGGGLL-----
Cld23	-FVLAGLSGVVLFVAGLLGLIP-----	Cld3	-GAGLYVGWAAALQQLGGALL-----
Cld22	LLILG---GILSWASCVTALVPVS-----	Cld5	LGAALYIGWAATALLMVGGCL-----
Cld24	LLILG---GILSWASGITALVPVS-----	Cld9	LGASLYLWGAAAALMLGGGL-----
Cld34	SFVVS---GILNIAAGVFNLIAVL-----	Cld22	---ALFLGWFAGLSLLGGCLLHC---
Cld12	-----AGLFFLAGTVSLSPGIWVIF--	Cld24	FGEALFLGWFAGLSLLGGCL-----
Cld20	-----FAGGVCFMSAGISSLISTVWY--	Cld25	---ALYLWGAAGIFIALGGLLIF---
Cld16	---ICFVAGATLLIAGTPGIIGSV-----	Cld2	---ALYLGIISSLSFLIAGIILCF---
Cld1	-MRMAVICGAIFFLAGLAILVA-----	Cld14	---ALYLGFISSLSLIGTLLCL---
Cld7	---IAMGGGIIIFIVGLAALVACS-----	Cld15	--PALYLWWSASLISILGSLCLCSA--
Cld14	---TFAILGGLTFILAGLLCMVAV-----	Cld8	-----LGWTTALVLIIVGGALFCCVFC
Cld19	---VAIAGGALFILAGLCTLTAVS-----	Cld17	---LFLGWASA A AVLFI G GLL C GF--
Cld2	---VAVAGGVFFILGGLGFIPVA-----	Cld1	---ALFTGWAAASLCLLGGALLCC---
Cld10	---IACLAGIVFILGSLCSMTGCS-----	Cld10	---ALFTGWAGASLCIIGGVIFCF---
Cld18	-----IMFIVGLCAIAGVSVFANML-	Cld7	FGPAIFIGWAGSALVILGGAL-----
Cld3	---ITIVAGVLFLLAALLTLVPVS-----	Cld19	FGPALFVGWASAGLAVLGGSF-----
Cld4	---MIVAGVVFLLAGLMVIVPVSW-----	Cld11	---LYAGWIGAVLCLVGGCVILCC---
Cld15	---LANTAGLHLILGICGMVAISWYAF--	Cld23	---VLGYLGSCLLLLGGFSLALS S F-
CLDND1	-----ILHLLAGLCTLGSVSCYVAGI-	Cld34	--AIQVAGIGVLPMLLTGMFSLF----
Cld17	-----LFILTGIFVLIPVSWTANIII	Cld16	--MAGSLCCFLAGAVLTCCLYLF---
Cld25	-----LEASASATLLPVSVAHATI	Cld20	-GGAIYGFISAMLLFISGMIF-----
Cld5	-----VLYLFCGLLALVPLCWFANIV-	Dni2	---LAVFVWISGGFLLFSLIHLGLW-
Cld11	-----AGVLLILLALCALVATIWFVP--	Dni1	---MIFLWCSMGLVTLITDITILL
CLDND2	-----TSAFLFLGGLLLLTALIGYTV--	Cld12	---VVVTI S AG L FMFTSLILFIW--
Dni1	-ISLSFFSFFSILVTALFAHVAVS-----	CLDND2	-WLALPFSILAGFCFLADMIM-----
Dni2	-----WSISCLTTSTAACLLLLALQMALA--	CLDND1	---FCLACVSAPIQFMASALFIWA--

TABLA I:

Alineamiento de las secuencias de las hélices transmembrana de Dni1p, Dni2p y de las claudinas humanas. Se señalan en distintos colores los motivos *small-xxx-small* en diferentes posiciones del dominio transmembrana (DTM). En la hélice 3 se resalta en gris la presencia de un aminoácido pequeño conservado en todas las secuencias alineadas. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTALW.

como en distintas proteínas fúngicas que comparten las características estructurales de las claudinas. En la **tabla II** se puede apreciar que el motivo *small-xxx-small* que permanece altamente conservado en la hélice 4 de las claudinas humanas, sólo aparece conservado en algunas de las proteínas similares de otras especies, pero no en la mayoría. De hecho, de todas las posibles claudinas fúngicas, únicamente Dni2p lo conserva. Asimismo, todas las proteínas alineadas contienen en el DTM4 un aminoácido hidrofóbico conservado.

Con el objetivo de estudiar si los motivos *small-xxx-small* funcionan como tales en Dni1p y Dni2p, y no aparecen al azar (ya que glicina, serina y alanina son aminoácidos habituales en las regiones transmembrana), se procedió a realizar una serie de experimentos, cuyos resultados se detallan a continuación.

2.2.4. Los motivos *small-xxx-small* son necesarios para la función de Dni2p pero no para la de Dni1p

Con el propósito de conocer la influencia de los motivos *small-xxx-small* en la funcionalidad de Dni1p y Dni2p, se procedió a eliminarlos del DTM correspondiente mediante mutagénesis dirigida. Para ello se intercambiaron los dos/tres aminoácidos pequeños por leucinas, que es un aminoácido voluminoso. Las versiones mutadas de las proteínas se expresaron en cepas que carecían de los genes *dni1+* o *dni2+* respectivamente, y se analizó el porcentaje de fusión como medida de su funcionalidad. Si los motivos fueran dispensables para la función de la proteína, la eficiencia de fusión sería similar a la de la estirpe silvestre, ya que la forma mutada del gen complementaría la delección del mismo. En caso contrario, se detectaría una disminución en dicha eficiencia. Como se puede observar en la **figura 27A**, los motivos *small-xxx-small* no son esenciales para la función de Dni1p. Por el contrario,

TMD4	
Dr7B	---AAIFIAWAGAFDIDMCGMLA-----
Dr7A	---AAIFIAWGGSFIDVLDGAMLA-----
DrZF-A9	-FGAAIFICWGAAVLLVIGGGL-----
DrZF-A89	-LGASLFIWCASGLLLGGAL-----
Dni2	----AVFVWISGFFLLFSLIHLGLW----
ScFig1	-----VMAWFSFAFLLLDSVVLWLIF---
CaSur7	-----IMWAAFACLLICWLLIFAGTI---
CaFmp45	----AFGLIWTAVACLLISFVSLVVLTC---
CeNSY-4	-VGTAFFLQMAAFCHLISFLIAMLFYF---
CeCLC-1	----FWLAVGLLISAADVILGALTVC---
CeCLC-4	----AFWMAVGAWCLVVIDTILASFIFF---
DmSINUOUS	WFGWSEFILACVGTVLTLLVASTLFL-----
DmKUNE	---WSFALGVVGVLLPSGVLYLV-----
CeCLC-3	---WSFWMVSTGILLCSAFLLCV-----
DmMEGA	---GWSYALAVVTFMMLGLAALIL-----
CeVAB-9	-----GIAWGATLFTIGATIMLIC-----
ScECM-7	----LGVTWFALLWCFGLISVSCL-----
ScYNL194C	-----LIWTTVFLIVNAICCTIMVA---
ScFmp45	----FAFIWTSVFLMLVNAIWTSTIF----
ScSur7	----MGMAWASVFLCIVEFILLVFW----
CeCLC-5	----YYLAGLAFVISVITVLFALV-----
ScPun1	----QGLMWGAVVGCALLNFILWCSV----
CaFig1	----AMTWTAFSIFLMMFLSACLSSWM---
CeCLC-2	-----IALTGFVYLVAILLSVVHVL-----
Dni1	----MIFLWCSMGLVTLTITDIIILL----
CeHPO-30	--MFGSMLLIAAFISIFCAVFLI-----

TABLA II:

Alineamiento de la cuarta hélice transmembrana de distintas claudinas y proteínas con similitud a claudinas. Las proteínas analizadas proceden de las especies *Danio rerio* (Dr), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Candida albicans* (Ca) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Se señalan en distintos colores los motivos *small-xxx-small* en diferentes posiciones del dominio transmembrana (DTM). Se resalta en gris la presencia de un aminoácido hidrofóbico conservado.

cuando se mutageniza el motivo presente en el DTM3 de Dni2p el porcentaje de fusión disminuye un 30% respecto al valor del WT, y este porcentaje desciende drásticamente cuando se elimina el motivo presente en el DTM4. Para averiguar si esta disminución en la funcionalidad era consecuencia de una inestabilidad de las proteínas mutadas, se fusionó la GFP a las versiones mutadas y se analizó su nivel mediante *Western-blot*. Como se observa en la **figura 27B** el nivel de expresión de las proteínas mutadas es mayor que el de Dni2-GFP. Además no se observa una mayor acumulación de la banda correspondiente a la GFP, lo que indica que las proteínas mutadas no son más inestables que la silvestre.

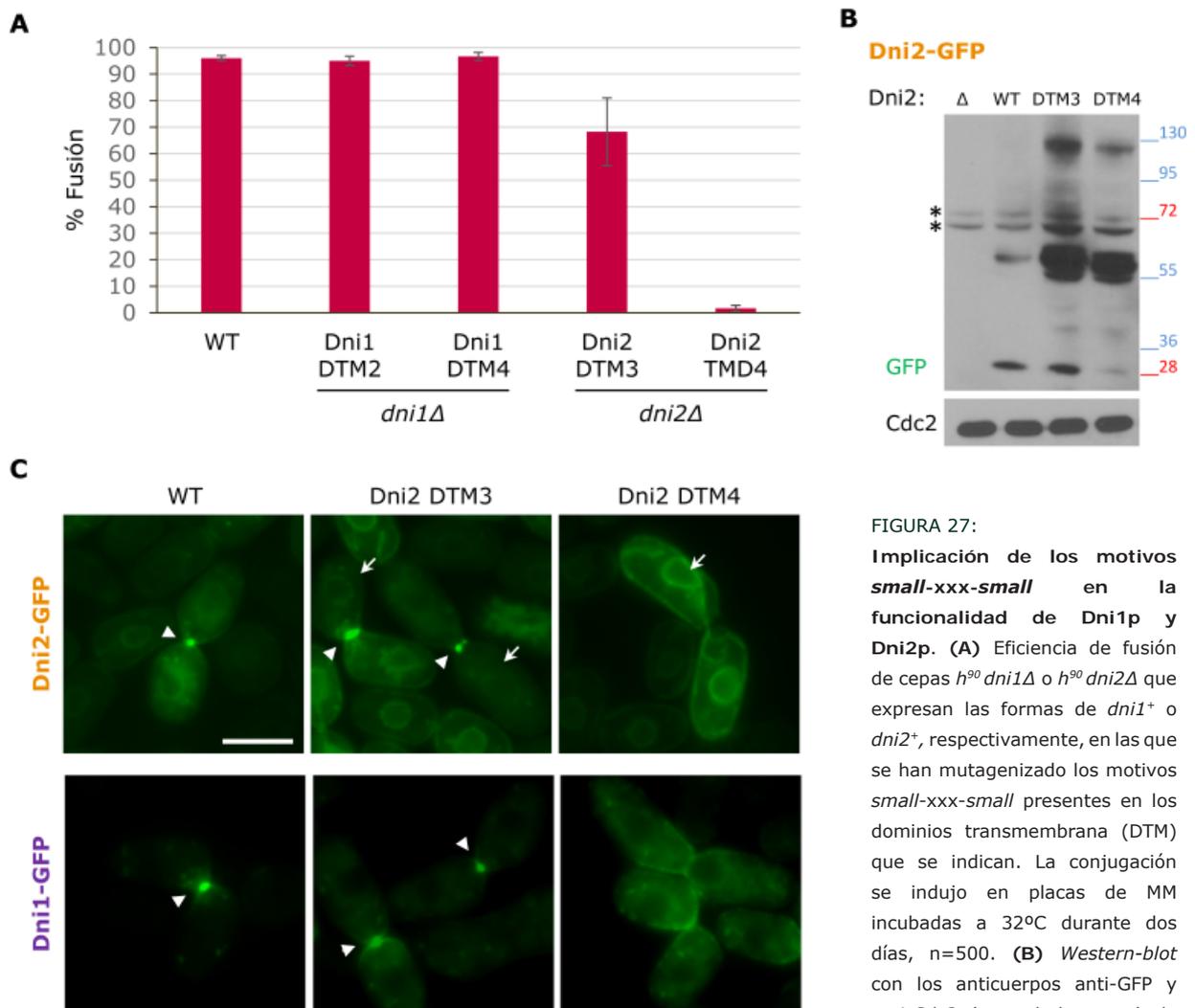


FIGURA 27:

Implicación de los motivos *small-xxx-small* en la funcionalidad de Dni1p y Dni2p. (A) Eficiencia de fusión de cepas $h^{90} dni1\Delta$ o $h^{90} dni2\Delta$ que expresan las formas de $dni1^+$ o $dni2^+$, respectivamente, en las que se han mutagenizado los motivos *small-xxx-small* presentes en los dominios transmembrana (DTM) que se indican. La conjugación se indujo en placas de MM incubadas a 32°C durante dos días, $n=500$. (B) *Western-blot* con los anticuerpos anti-GFP y anti-Cdc2 (control de carga) de extractos totales procedentes de cepas $h^{90} dni2\Delta$ (Δ), $h^{90} dni2\Delta$

que expresa la proteína Dni2-GFP (WT) y cepas $h^{90} dni2\Delta$ que portan las proteínas de Dni2p con motivos *small-xxx-small* mutados marcadas con GFP. Los asteriscos señalan bandas inespecíficas. La conjugación se indujo en MM-N líquido. (C) En los paneles superiores se muestran zigotos que portan las versiones mutadas de Dni2 fusionadas a la GFP. En los paneles inferiores se presentan zigotos de estirpes h^{90} que expresan las proteínas mutadas de Dni2p y la proteína de fusión Dni1-GFP. Las puntas de flecha señalan el microdominio de fusión y las flechas zigotos con marcaje en el RE. La inducción de la conjugación se llevó a cabo en MM-N líquido. Las fotografías se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 5 μ m.

Estos resultados estarían indicando que Dni2p pudiera oligomerizar a través del DTM4, y que esa oligomerización fuera esencial para su función. Además, el defecto que se produce en el mutante de la hélice 4 no se recupera completamente a bajas temperaturas, como sucede cuando se deleta *dni2⁺* (datos no mostrados). Una posible explicación para este hecho es que esta proteína mutada actúe como dominante negativa, interfiriendo con la funcionalidad de otras proteínas que participan en la fusión celular.

Viendo que los motivos *small-xxx-small* en Dni2p podrían tener relevancia funcional, se procedió a analizar la localización de las proteínas mutadas fusionadas a la GFP. En los paneles superiores de la **figura 27C** se puede observar que en el caso del mutante del DTM3, la proteína sí que se acumula en el microdominio de fusión (se indica con una punta de flecha), aunque hay una parte que se queda retenida en el RE (se señalan los zigotos con una flecha), lo que podría explicar el descenso en la eficiencia de fusión. La proteína mutante del DTM4 se observa únicamente en el RE, lo que explicaría la pérdida total de funcionalidad. Este resultado podría indicar que la oligomerización a través de dicha hélice pudiera tener lugar en este orgánulo. De hecho se ha propuesto que la oligomerización de las claudinas pudiera tener lugar tanto a lo largo de la ruta secretora como una vez que se insertan en las uniones estrechas (Koval, 2013). El primer caso podría ser equiparable al de Dni2p.

Para averiguar si los motivos *small-xxx-small* de Dni2p influirían en su relación con Dni1p, se analizó la localización de Dni1-GFP en los mutantes de *dni2⁺*. En el caso del mutante del DTM3, Dni1p se observaba concentrada en el microdominio de fusión, localización que no se observa cuando el motivo mutagenizado es el de la hélice 4 (**figura 27C**, paneles inferiores). En este último caso Dni1p se localiza como un conjunto de puntos a lo largo de la membrana plasmática, de manera similar a como lo hacía en ausencia de *dni2⁺* (**figura 18B**). De este modo, nuevamente se detectó correspondencia entre la ausencia de Dni1p concentrado en el microdominio de fusión y un defecto en fusión celular.

2.2.5. Dni2p interacciona consigo misma a través del motivo *small-xxx-small* de la cuarta hélice transmembrana (DTM4)

Una técnica utilizada habitualmente para evaluar cuantitativamente la tendencia de un DTM a asociarse consigo mismo dentro de una membrana biológica es el ensayo TOXCAT. En la **figura 28A** se representa un esquema del principio en el que se basa este ensayo. Consiste en la expresión del DTM de interés como parte de una proteína de fusión en la bacteria *E. coli*. Esta proteína de fusión contiene en el extremo N-terminal el factor de transcripción dependiente de dimerización ToxR de *Vibrio cholerae*, de manera que si el dominio transmembrana es capaz de asociarse, el factor de transcripción dimerizará y activará la expresión de un gen reportero. Además, la proteína de fusión contiene en su

extremo C-terminal la proteína de unión a maltosa (MBP) MalE de *E. coli*, que permitirá detectar su expresión mediante *Western-blot*.

Para realizar el ensayo TOXCAT, la proteína de fusión que incluye el DTM objeto de estudio se expresó en la cepa de *E. coli* MM39. Esta cepa presenta una mutación en el gen *malE*, que provoca un defecto en la toma de maltosa, y por lo tanto es incapaz de consumir este azúcar desde el medio de cultivo. MalE es una proteína monomérica del espacio periplásmico de *E. coli* que forma parte del sistema de toma de maltosa, actuando en el reconocimiento de este disacárido y de maltodextrinas. De esta forma, sólo los clones en los que la proteína de fusión se inserte en la membrana plasmática en la orientación correcta (MalE hacia el espacio periplásmico y ToxR hacia el citoplasma) serán capaces de crecer cuando la única fuente de carbono disponible sea maltosa. Por esta razón, el primer control del experimento que se realizó, fue comprobar el crecimiento de las cepas con las que se haría en el ensayo TOXCAT en medio M9+maltosa. Se seleccionaron solamente los clones capaces de crecer en este medio que contenía maltosa como única fuente de carbono. Otro control que se llevó a cabo fue la detección de la proteína de fusión correspondiente mediante *Western-blot* utilizando un anticuerpo anti-MBP, que reconoce específicamente MalE. Se detectó expresión de la proteína de fusión en todos los casos (resultado no mostrado).

El gen reportero que se expresa como resultado de la dimerización del factor de transcripción ToxR codifica la enzima claranfenicol acetil transferasa (CAT). Consecuentemente, el ensayo TOXCAT se llevó a cabo mediante la valoración de la actividad CAT, tal y como se ha detallado en el punto 6 de "Materiales y Métodos". Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 28B**. Los controles estándar del experimento contienen el DTM de la glicoforina A, una proteína transmembrana presente en la membrana de los eritrocitos. El control positivo (GpA) porta el DTM silvestre, mientras que el control negativo contiene una versión en la que se ha mutagenizado el motivo *small-xxx-small* (G83I) (Russ y Engelman, 1999). En la gráfica se asigna un valor del 100% a la interacción detectada en el caso del control positivo. Este nivel de interacción disminuye drásticamente en el control negativo. Los resultados se muestran como porcentaje de interacción con respecto al del control positivo.

En la figura se observa cómo hay cierto nivel de interacción en el DTM2 de Dni1p, y una interacción mucho más fuerte en el caso del DTM4. La asociación de la hélice 4 presenta unos niveles similares a los del control positivo; por esta razón se decidió comprobar si la interacción tenía lugar a través del motivo *small-xxx-small* presente en dicho DTM. Para ello se llevó a cabo el ensayo TOXCAT con el DTM4 de Dni1p en el que el motivo *small-xxx-small* se había mutagenizado. Sorprendentemente, la eliminación de dicho motivo provocaba un aumento en la fuerza de interacción de la hélice 4 de Dni1p. Con respecto a Dni2p, se observó interacción tanto en el DTM3 como en el DTM4, siendo la de este último mucho más

fuerte y alcanzando unos niveles similares a los del control positivo. Al analizar los datos del ensayo TOXCAT que se obtuvieron para las hélices mutadas de Dni2p, se detectó que para el DTM3 el nivel de interacción no variaba significativamente con respecto a los datos obtenidos para el DTM3 silvestre, lo que indica que el motivo *small-xxx-small* presente en la hélice 3 de Dni2p no es necesario para su interacción. Sin embargo, cuando se mutageniza en DTM4 de Dni2p, la fuerza de interacción desciende de manera significativa al compararse con el valor obtenido para el DTM4 silvestre de Dni2p. No obstante, la hélice 4 mutada de Dni2p presenta un nivel de interacción significativamente superior al del control negativo, pero similar al del DTM2 de Dni1p y a los del DTM3 silvestre y mutante de Dni2p.

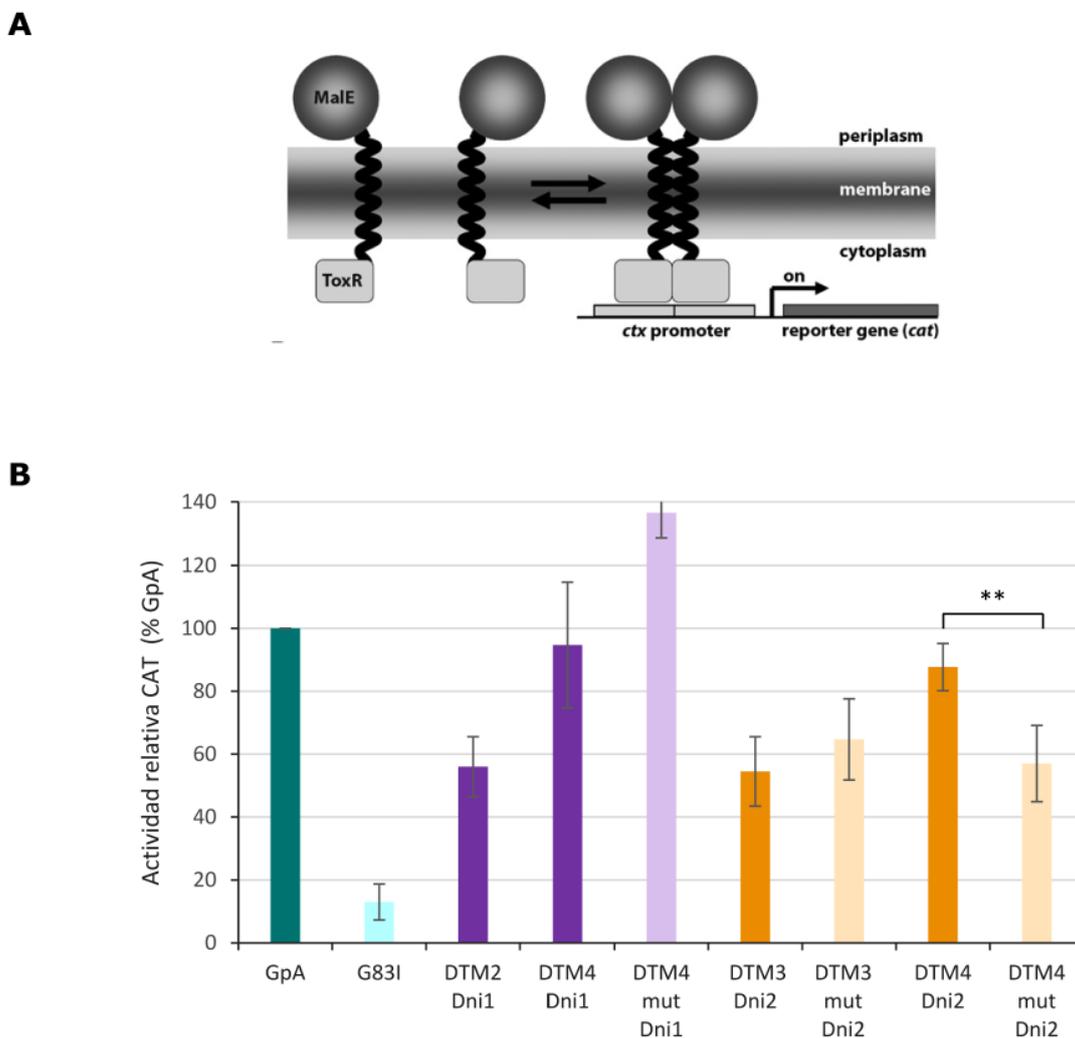


FIGURA 28:

Cuantificación de la interacción entre dominios transmembrana mediante el ensayo TOXCAT. (A) Esquema del fundamento del ensayo TOXCAT, realizado *in vivo* en células de *E. coli*. El método se basa en la expresión de una proteína de fusión que contiene el dominio transmembrana (DTM) objeto de estudio, la proteína de unión a maltosa MaIE y el activador transcripcional ToxR. La interacción entre los DTM promueve la expresión de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (*cat*), cuya actividad enzimática puede valorarse por espectrofotometría (Finger et al., 2009). (B) Datos del ensayo TOXCAT para varios DTM de Dni1p y Dni2p. Se presentan como el porcentaje de la actividad CAT respecto a la de GpA, un DTM susceptible de dimerización fuerte. El control negativo corresponde a valores obtenidos para una forma mutada de GpA que carece del motivo *small-xxx-small*. Los datos corresponden a la media de tres replicados biológicos. Se representa la desviación estándar y la significación estadística (**= $p < 0,01$, *t-student*).

En el ensayo TOXCAT las hélices deben orientarse con el extremo N hacia el citoplasma y el extremo C hacia el espacio periplásmico. Cuando las proteínas Dni1p y Dni2p se encuentran en la membrana de *S. pombe*, las hélices 2 y 4 de cada una de ellas se disponen con el extremo N hacia el exterior y el C hacia el citoplasma. Aunque en el ensayo TOXCAT se ha cambiado esta orientación, los propios controles positivo y negativo que se utilizan rutinariamente presentan este mismo cambio (Schneider et al., 2007). Además de los ensayos que se han descrito anteriormente, también se llevó a cabo el ensayo TOXCAT variando la orientación de la hélice 4 de Dni2p, de manera que se dispusiera en la membrana de *E. coli* en la misma orientación que en la membrana de *S. pombe*. En este caso se obtuvo un nivel de interacción próximo a cero. Esto pudiera ser debido a que las proteínas comienzan a sintetizarse por el extremo N-terminal, y por ello el orden en el que se insertan los aminoácidos en la cadena polipeptídica sería el inverso al que se sigue en condiciones normales. De esta forma es probable que el plegamiento que adquiriera esta hélice fuera diferente al que toma cuando se sigue el orden de secuencia natural. Además, mediante el ensayo TOXCAT lo que se mide es el nivel de interacción de dos hélices en el seno de una membrana biológica, y partiendo del hecho de que esta no es la membrana en la que la hélice se inserta en condiciones naturales, el cambio de orientación de la misma no resulta de vital importancia.

Estos resultados parecen indicar que los DTMs de Dni1p y Dni2p que se han estudiado mediante la técnica TOXCAT presentan un nivel de interacción basal de aproximadamente un 60% con respecto al control positivo. Sin embargo, la interacción del DTM4 de Dni2p es superior al 80% y esta interacción se ve favorecida por el motivo *small-xxx-small*, ya que al mutarlo el nivel de actividad CAT se reduce significativamente. Con respecto al DTM4 de Dni1p, su capacidad de interacción produce una actividad CAT superior al 90%; sin embargo en este caso su capacidad interacción no se ve debilitada, sino que curiosamente se hace más fuerte al eliminar el motivo *small-xxx-small*. Estos resultados permiten concluir que ambas proteínas interactúan consigo mismas a través del DTM4, ejerciendo el motivo *small-xxx-small* una acción positiva para dicha interacción en el caso de Dni2p, pero no así en el de Dni1p. Dado que la falta de funcionalidad de la proteína Dni2p con este dominio mutado es similar a la de la ausencia de la proteína (mutante nulo *dni2Δ*), parece que la oligomerización de Dni2p es necesaria para la fusión celular. El hecho de que la proteína Dni2p mutada en la hélice 4 se localice únicamente en el RE podría indicar que la estructura de la misma está alterada de manera que no puede salir de este orgánulo, o que su oligomerización podría tener lugar en el RE y esto sería un requisito para su función.

3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CONCENTRACIÓN DE Dni1p Y Dni2p EN EL MICRODOMINIO DE FUSIÓN

Como se ha mencionado en algunos de los apartados anteriores, durante el proceso de conjugación tanto Dni1-GFP como Dni2-GFP se observan concentradas en la zona de contacto entre los dos *shmoo*s que entran en conjugación, zona que se ha denominado "microdominio de fusión" por entender que se trata de una región especializada de la membrana plasmática, enriquecida en ciertas proteínas necesarias para la fusión celular. Además parece ser que para que la fusión de dos *shmoo*s tenga lugar es absolutamente necesario que Dni1p mantenga esa ubicación. Por su parte, Dni2p juega un papel importante en promover y/o estabilizar esa localización de Dni1p. Con el fin de obtener información adicional acerca de la función de estas proteínas, se analizó qué procesos y/o componentes celulares son necesarios para que Dni1p y Dni2p se concentren en el microdominio de fusión.

3.1. Papel de la endocitosis en la concentración de Dni1p en el microdominio de fusión

Se sabe que la localización polarizada de muchas proteínas transmembrana se debe a un equilibrio entre su secreción, su difusión lateral y su endocitosis (Marco et al., 2007; Trimble y Grinstein, 2015). En el apartado 2.2.1. se ha descrito cómo la proteína mutante Dni1_{ΔCT}-GFP se detecta concentrada en la punta del *shmoo*, pero también se observa distribuida a lo largo de la membrana plasmática, y se ha sugerido que el extremo C-terminal de Dni1p pudiera estar relacionado con la endocitosis de dicha proteína. Dado que Dni1p necesita permanecer eficientemente concentrada para que se produzca la fusión celular, se estudió la influencia de la endocitosis en la creación del microdominio de membrana enriquecido en Dni1p.

3.1.1. La endocitosis es necesaria para una fusión celular eficiente

Como punto de partida para contestar a la pregunta planteada, se analizó si mutantes defectivos en el proceso de endocitosis presentan un defecto de fusión celular durante la conjugación. Se sabe que End4p (Sla2p en *S. cerevisiae*) es esencial para el proceso de endocitosis en *S. pombe*. Además, se ha descrito que la ausencia de *end4*⁺ provoca defectos en la aglutinación, y que la eficiencia de esporulación disminuye hasta un 35% con respecto a la de la estirpe WT (Iwaki et al., 2004). Para comprobar si este descenso se debía, al menos en parte, a una incapacidad de las células para fusionarse, se caracterizó este defecto con más detalle. Para ello se contabilizó el porcentaje de los distintos tipos celulares que se pueden observar durante la conjugación. El experimento se llevó a cabo a

diferentes temperaturas, ya que el mutante *end4Δ* es termosensible (Iwaki et al., 2004). Una acumulación de *shmoos* sin aparear indicaría defectos en aglutinación; una acumulación de prezigotos sería consecuencia de problemas en fusión celular (como se ha comentado en secciones anteriores), y la presencia de ascas aberrantes (es decir, con tres o más de cuatro ascosporas) indicaría defectos en meiosis. En la **figura 29A** se puede apreciar que a medida que se aumenta la temperatura de incubación, en el mutante *end4Δ* se produce una acumulación tanto de *shmoos*, como de prezigotos y ascas aberrantes, indicando que el problema en conjugación de *end4Δ* responde a diferentes factores. Como el objeto del presente trabajo era el estudio de la fusión celular, se calculó dicho parámetro como el número de cigotos + ascas (especies en las que ha tenido lugar la fusión) respecto al número total de células en conjugación (prezigotos + cigotos + ascas). En la **figura 29B** se observa que efectivamente *end4Δ* manifiesta un defecto en fusión celular. Además, y al igual que sucede con los mutantes *dniΔ*, este defecto se agrava al aumentar la temperatura. Este hecho podría ser indicativo de que End4p pudiera estar ayudando a concentrar a Dni1p en la punta del *shmoo*.

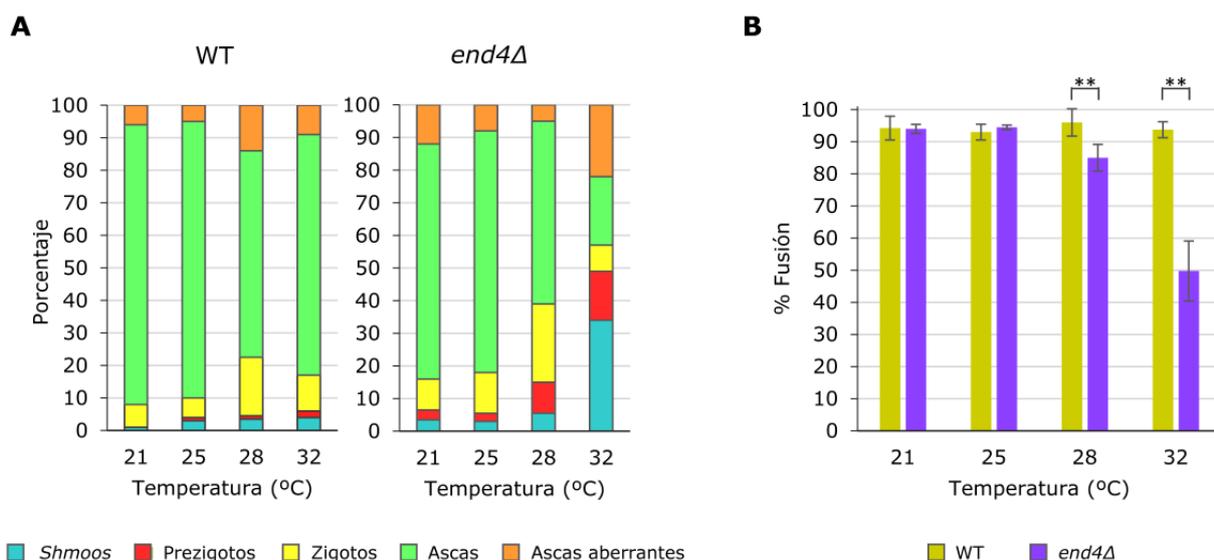


FIGURA 29:

Caracterización del defecto en conjugación del mutante *end4Δ*. (A) Representación gráfica del porcentaje de los distintos tipos celulares que se observan durante el proceso de conjugación en las estirpes *h⁹⁰* WT y *end4Δ* incubadas a diferentes temperaturas. (B) Porcentaje de fusión de las mismas cepas que en A, cuantificado como el número de cigotos + ascas respecto al número total de prezigotos + cigotos + ascas, a distintas temperaturas. En ambos casos la inducción de la conjugación se llevó a cabo en placas de MM, n=500.

3.1.2. La endocitosis contribuye ligeramente a concentrar a Dni1p en la punta de los *shmoos*

Con el fin de conocer si realmente el proceso de endocitosis influiría en la concentración de Dni1p en la zona de contacto intercelular, se analizó la localización de dicha proteína fusionada a la GFP cuando se deletionaba *end4⁺*. En la **figura 30** se observa

que en el mutante *end4Δ*, Dni1-GFP se detecta concentrada en el microdominio de fusión (se indica con una punta de flecha), aunque también se aprecia cierta señal fluorescente a lo largo de la membrana plasmática. Esta localización recuerda a la que se había observado para la proteína mutante Dni1_{ΔCT}-GFP (figuras 24B y 30).

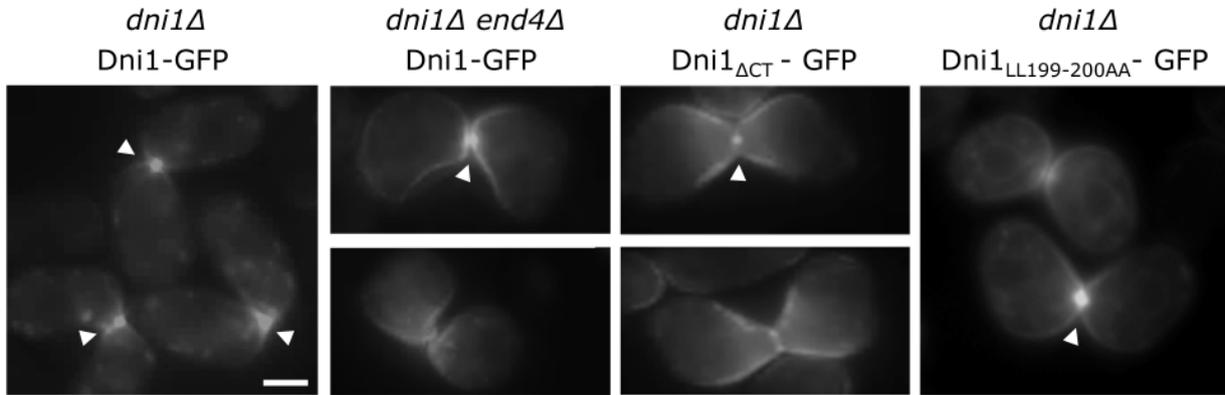


FIGURA 30:

Localización de Dni1-GFP en condiciones que comprometen su endocitosis. Fotografías de zigotos que expresan las versiones de Dni1p WT, ΔCT o con el motivo di-leucina mutagenizado (LL199-200AA) fusionadas a la GFP en las estirpes *h⁹⁰ dni1Δ* o *h⁹⁰ end4Δ*. Las puntas de flecha señalan el microdominio de fusión. Las fotografías se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 2,5 μm.

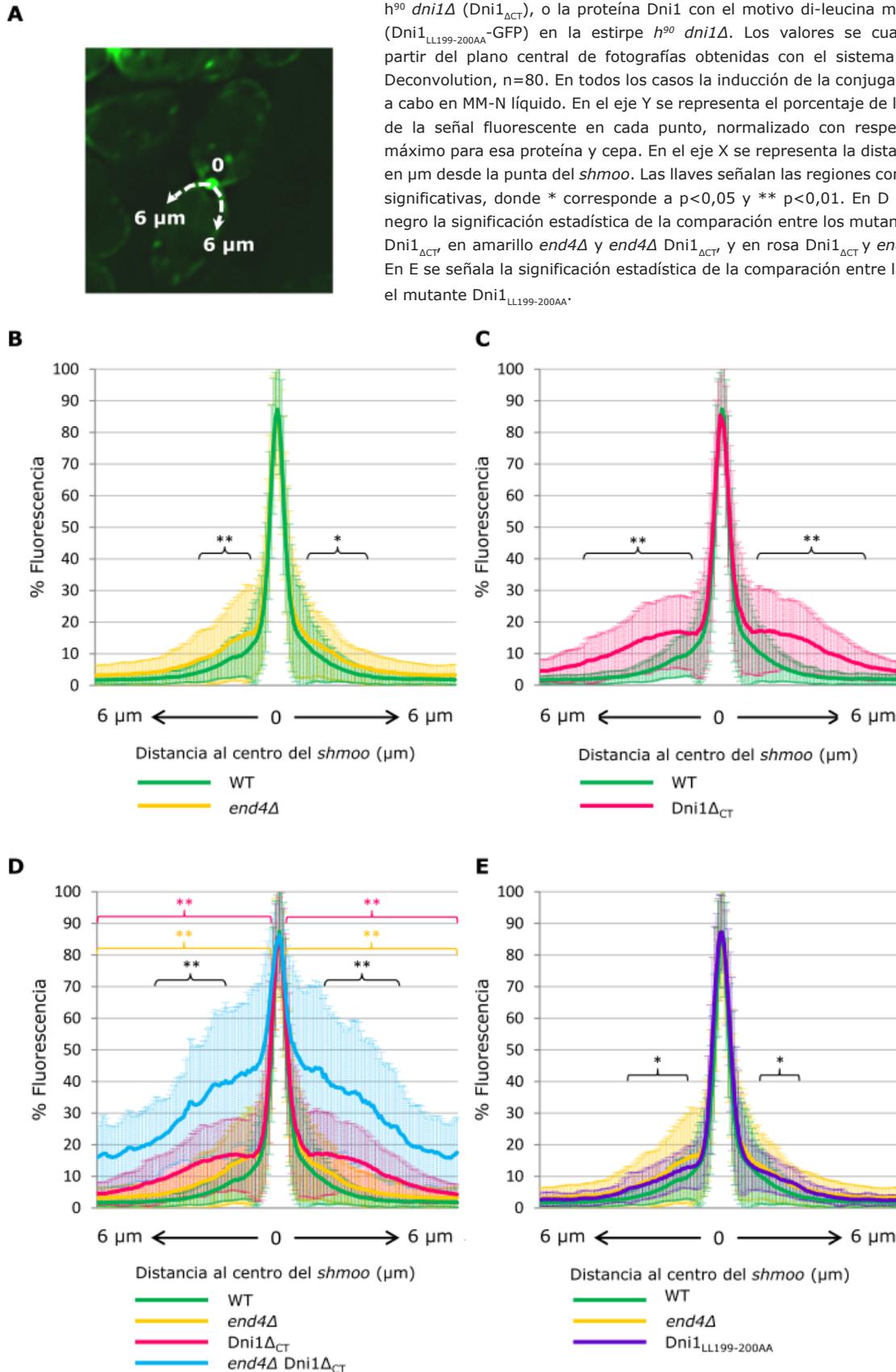
Para poder disponer de una información más exacta de la concentración de Dni1-GFP en la zona de contacto entre los *shmoos*, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia asociada a Dni1-GFP en las distintas cepas mediante un análisis por *line-scan*. Para ello se trazó una línea a lo largo de la prolongación del *shmoo* de una longitud de 12 μm. Se tomó como valor 0 la punta del *shmoo*, y se cuantificaron 6 μm a ambos lados de esta zona (figura 31A). En cada gráfica se representa la media de los valores obtenidos para 80 *shmoos*. Como se puede observar en la figura 31B, en el mutante *end4Δ*, Dni1p se extiende muy ligeramente por la zona de la membrana plasmática adyacente a la zona de contacto intercelular, situación que no se observa en el control WT. Esta diferencia, aunque pequeña, es estadísticamente significativa, lo que demuestra que la endocitosis contribuye a la concentración de Dni1p, aunque lo hace de manera muy moderada. Además estaría de acuerdo con el hecho de que el defecto específico en fusión celular de *end4Δ* no sea tan drástico como el de *dni1Δ* (mutante en el que no hay proteína Dni1p en el microdominio de fusión) o *dni2Δ* (mutante en el que Dni1p se extiende totalmente a lo largo de la membrana plasmática, sin que se observe nunca concentrada en el citado microdominio).

3.1.3. Dni1p contiene en su extremo C-terminal un motivo di-leucina que participa en su endocitosis

Como por microscopía la localización de Dni1-GFP en el mutante *end4Δ* parecía similar a la que se había observado para Dni1_{ΔCT}-GFP en una estirpe silvestre para *end4⁺* (figura 30),

FIGURA 31:

Contribución de la endocitosis a la concentración de Dni1p en el microdominio de fusión. (A) Diagrama explicativo del procedimiento seguido para la cuantificación del *line-scan*. Se trazó una línea de 12 μm que recorría la prolongación de cada uno de los dos *shmoos* que forman cada prezigoto, y se midió la intensidad de fluorescencia de la GFP a lo largo de esa línea. Se tomó como valor 0 la punta del *shmoos*, y se cuantificaron 6 μm a cada lado de esta zona. (B) (C) (D) y (E) Representación gráfica del *line-scan* de zigotos que expresan Dni1-GFP en las estirpes *h⁹⁰ dni1 Δ* (WT) o *end4 Δ* , Dni1 Δ_{CT} -GFP en la estirpe *h⁹⁰ dni1 Δ* (Dni1 Δ_{CT}), o la proteína Dni1 con el motivo di-leucina mutagenizado (Dni1 $_{LL199-200AA}$ -GFP) en la estirpe *h⁹⁰ dni1 Δ* . Los valores se cuantificaron a partir del plano central de fotografías obtenidas con el sistema DeltaVision Deconvolution, n=80. En todos los casos la inducción de la conjugación se llevó a cabo en MM-N líquido. En el eje Y se representa el porcentaje de la intensidad de la señal fluorescente en cada punto, normalizado con respecto al valor máximo para esa proteína y cepa. En el eje X se representa la distancia medida en μm desde la punta del *shmoos*. Las llaves señalan las regiones con diferencias significativas, donde * corresponde a $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. En D se indica en negro la significación estadística de la comparación entre los mutantes *end4 Δ* y Dni1 Δ_{CT} en amarillo *end4 Δ* y *end4 Δ* Dni1 Δ_{CT} y en rosa Dni1 Δ_{CT} y *end4 Δ* Dni1 Δ_{CT} . En E se señala la significación estadística de la comparación entre la cepa WT y el mutante Dni1 $_{LL199-200AA}$.



se decidió evaluar el nivel de difusión de la proteína truncada a lo largo de la membrana plasmática. En el *line-scan* de la **figura 31C** se percibe que efectivamente Dni1_{ΔCT} se extiende levemente por la membrana, de manera que se aprecia cierta fluorescencia en las zonas de la membrana plasmática adyacentes al microdominio de fusión, situación que no se da en el caso del control silvestre Dni1-GFP. Sin embargo, al combinar la delección del extremo C-terminal de Dni1p con la falta de endocitosis (proteína Dni1_{ΔCT}-GFP en el mutante *end4Δ*), se puede ver cómo la proteína mutante se extiende aún más por la membrana (línea azul en la **figura 31D**). Este resultado estaría indicando la existencia de una señal en el extremo C-terminal de Dni1p que contribuye a la concentración de Dni1p por un mecanismo diferente o adicional a la endocitosis, o al menos a la función de End4p en la endocitosis.

Al analizar la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de Dni1p, se encontró un motivo di-leucina adyacente a la porción que se había delecionado en la versión mutante Dni1_{ΔCT}. Estos motivos son reconocidos por los complejos adaptadores de clatrina tipo AP, que regulan tanto la endocitosis como la secreción de proteínas de membrana. Los dos residuos de leucina habitualmente están precedidos por un aminoácido con carga negativa y otro polar (Pandey, 2010). En la secuencia de Dni1p, aparecen antes de este motivo di-leucina (LL) un ácido aspártico y una serina, aminoácido con carga negativa y polar, respectivamente. Es posible que al delecionar el extremo C-terminal de Dni1p, se hubiera modificado la configuración de esta región, impidiendo así el acceso de las proteínas que reconocerían el motivo LL. Sin embargo, atendiendo a la topología que se predice para Dni1p en la base de datos PomBase, este motivo LL formaría parte del DTM4, y por ello no sería factible que actuara como señal de reconocimiento para el complejo AP-2 durante la endocitosis. No obstante, como se ha discutido en el punto 2.2.1., la veracidad de dicha predicción es cuestionable, y sería posible que el motivo di-leucina sí que se localizara en la porción citoplásmica del extremo C-terminal de Dni1p. Por otro lado, también cabe la posibilidad de que este motivo pudiera actuar formando parte de la hélice transmembrana mediante un mecanismo desconocido. De hecho, se ha descrito que la localización de determinadas proteínas con un paso transmembrana depende de determinados aminoácidos que integran el DTM. Este reconocimiento tiene lugar tanto en levaduras como en mamíferos (Quiroga et al., 2013).

Por ello se procedió a mutagenizar el motivo DSIILL para así analizar si realmente actúa como una señal para la internalización de Dni1p. Se reemplazaron las dos leucinas por dos alaninas y se generó la proteína mutante Dni1_{LL199-200AA}. Al analizar la eficiencia de esporulación de una estirpe *h⁹⁰ dni1Δ* que portaba dicha proteína, se pudo comprobar que ésta continuaba siendo funcional (no mostrado). En la **figura 30** se muestra que esta proteína mutada, fusionada a la GFP, se observa como un punto discreto en la zona de contacto entre dos *shmoos*. Sin embargo, también se aprecia cierto nivel de fluorescencia

a lo largo de la membrana plasmática, indicando cierta difusión de la proteína. El patrón de localización observado por microscopía es parecido al que presenta la proteína Dni1_{ΔCT}-GFP, y también al de Dni1-GFP en el mutante *end4Δ*. Dado que si existiera alguna diferencia con el control silvestre Dni1-GFP se apreciaría mejor mediante una cuantificación por *line-scan*, se llevó a cabo este procedimiento. Como se puede observar en la **figura 31E**, efectivamente al mutagenizar el motivo LL, Dni1p se extiende levemente por la membrana, siendo la gráfica similar a la obtenida para la proteína Dni1-GFP silvestre expresada en el mutante *end4Δ*. Este resultado sugiere que el motivo di-leucina del extremo C-terminal de Dni1p pudiera actuar como una señal para la endocitosis de la proteína. Por otro lado, este resultado también está de acuerdo con la hipótesis de que el dominio C-terminal contribuya a la concentración de Dni1p por un mecanismo adicional a la endocitosis, o al papel que End4p juega en la endocitosis.

3.1.4. El mutante *dni1Δ* no presenta defectos en endocitosis

Puesto que se había observado que tanto la ausencia de endocitosis como la ausencia de Dni1p producen defectos en la fusión celular, se procedió a investigar si el defecto en fusión del mutante *dni1Δ* se debía, al menos en parte, a una alteración de la endocitosis en dicho mutante. Para abordar esta cuestión se analizó dicho proceso en cepas que carecían del gen *dni1*⁺ mediante tres estrategias:

- Toma de FM4-64: compuesto orgánico lipofílico que marca la internalización de vesículas de membrana plasmática, y de las proteínas transmembrana asociadas a ella (Vida y Emr, 1995).
- Localización de Map3-GFP: se trata del receptor de la feromona en las células *h*, y se utiliza como marcador de la endocitosis de proteínas de membrana (Iwaki et al., 2004).
- Toma de Lucifer yellow: permite el estudio de la endocitosis de fase fluida; se toma por endocitosis y se almacena en el lumen vacuolar (Aghamohammadzadeh y Ayscough, 2009).

Todos estos análisis se realizaron a 25°C en *shmoos* generados en cepas *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ* tratadas con feromona, que permiten llevar a cabo estos experimentos de una manera más sincronizada. En todos los casos, la estirpe *dni1Δ* se comportó de manera similar al WT (datos no mostrados). Este resultado constituye una indicación de que la ausencia de *dni1*⁺ no provoca defectos aparentes en endocitosis, y que el defecto en fusión celular de este mutante se debe a la alteración de algún otro proceso.

3.2. Papel de la actina en la concentración de Dni1p en el microdominio de fusión

En la sección 2.1.2. se ha descrito que Dni2p es esencial para que Dni1p se concentre en la zona de contacto intercelular. Por otro lado, se sabía que el tratamiento con latrunculina A (sustancia que promueve la despolimerización de las estructuras de actina) influye en la localización de Dni1p, de manera que Dni1-GFP se detecta a lo largo de toda la proyección del *shmoo* sin permanecer concentrada en el microdominio de fusión (Clemente-Ramos et al., 2009). Una hipótesis que permitiría integrar ambos resultados sería que Dni2p estuviera anclando a Dni1p al citoesqueleto de actina en la zona de contacto entre los *shmoos*. A continuación se detallan una serie de experimentos llevados a cabo para abordar esta cuestión.

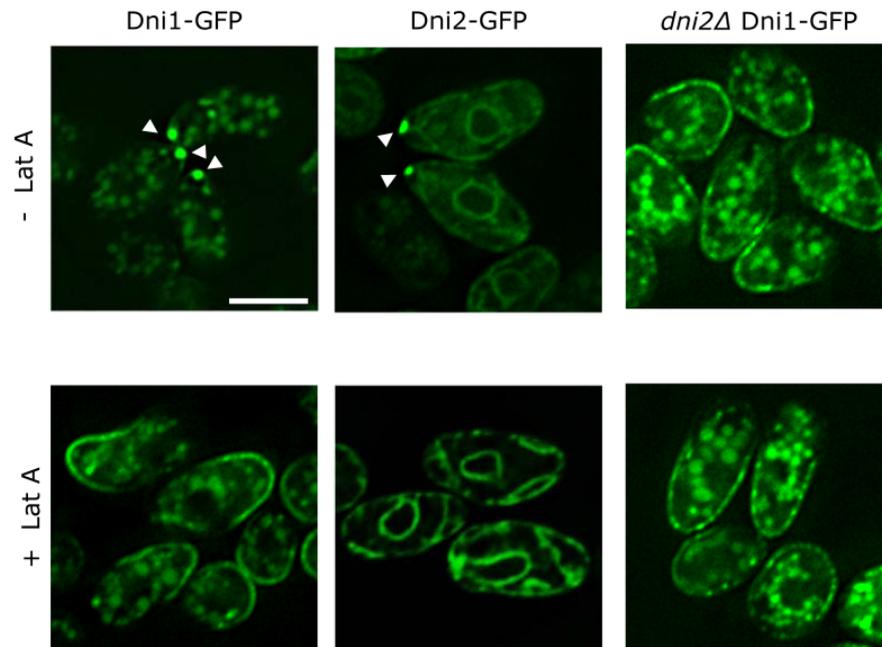
3.2.1. La localización de Dni2p en el microdominio de fusión requiere la integridad del citoesqueleto de actina

En la sección 2.1.1. se ha descrito que Dni1p y Dni2p colocalizan como un punto discreto en el microdominio de fusión. Para comprobar si la actina, además de contribuir a la localización correcta de Dni1p, realizaba la misma función para Dni2p, se procedió a analizar la ubicación de Dni2p cuando las células se sometían a un tratamiento con latrunculina A. El experimento se realizó en una estirpe *cyr1Δ sxa2Δ* a la que se había añadido la feromona factor P para inducir la formación de *shmoos*. En la **figura 32** se muestra que tanto Dni1-GFP como Dni2-GFP dejan de detectarse concentradas en la punta de los *shmoos* tras la despolimerización de las estructuras de actina. Este resultado indica que el citoesqueleto de actina deber permanecer en perfectas condiciones para que complejo Dni1p-Dni2p se localice correctamente. Además, se puede observar que la localización de Dni1p en el cultivo tratado con la droga recuerda a su localización en el mutante *dni2Δ*. Este resultado podría indicar que quizá Dni2p actúe anclando a Dni1p a la actina, y que el efecto de la latrunculina A en la localización de Dni1p podría deberse a que Dni2p deja de estar concentrado en la punta de los *shmoos* cuando no hay actina.

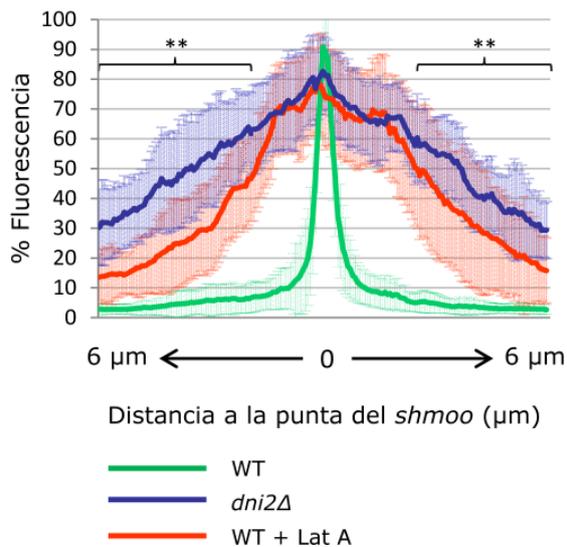
Para analizar si la presencia de Dni1-GFP a lo largo de la membrana que se detectaba en ausencia de actina y en ausencia de *dni2⁺* eran similares, se procedió a realizar una cuantificación mediante line-scan. En la **figura 32B** se muestra que en ambos casos Dni1-GFP se extiende por la membrana desde la punta del *shmoo*, pero que la difusión alcanza unos niveles significativamente superiores en el mutante *dni2Δ*. Esto podría indicar a priori que si Dni2p anclara a Dni1p a la actina, debe hacerlo, además, a otro elemento.

Al combinar la ausencia de *dni2⁺* con la despolimerización de las estructuras de actina, se puede observar un efecto aditivo en la difusión de Dni1p a lo largo de la prolongación del *shmoo* (**figura 32C**). En estas condiciones Dni1p aparece prácticamente despolarizada. Este resultado puede tener varias interpretaciones: (1) la actina y Dni2p contribuyen a la

A



B



C

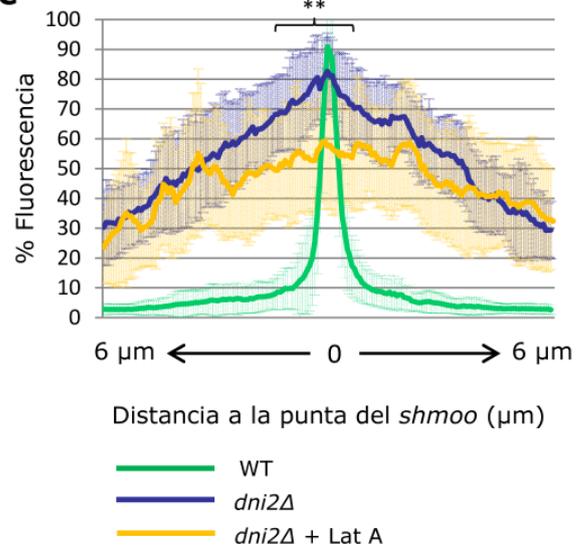


FIGURA 32:

Influencia de la actina en la concentración de Dni1p en la punta de los *shmoos*. (A) Fotografías de la estirpe *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ dni1Δ* que expresa la proteína de fusión Dni1-GFP, y de la estirpe *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ dni2Δ* que expresa Dni2-GFP o Dni1-GFP. Las células se trataron con feromona para inducir la formación de *shmoos*. Los cultivos se suplementaron o no con latrunculina A. Las puntas de flecha señalan el microdominio de fusión. Las fotografías muestran el plano central de una serie en z y se realizaron con un sistema DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 5 μm. (B) y (C) Representación gráfica del *line-scan* de las mismas imágenes que en A. En ambos casos n=25. En el eje Y se representa el porcentaje de la intensidad en cada punto normalizado con respecto al valor máximo. En el eje X se representa la distancia medida en μm desde la punta del *shmoo*. Las llaves señalan las regiones con diferencias significativas, donde ** corresponde a $p < 0,01$. En B se indica la significación estadística de la comparación entre el mutante *dni2Δ* y la estirpe WT tratada con latrunculina A. En C la comparación corresponde a un mutante *dni2Δ* tratado o no con latrunculina A.

concentración de Dni1p por mecanismos absolutamente independientes; (2) Dni2p ancla a Dni1p a la actina, pero en el mutante *dni2Δ* el efecto de la latrunculina A es más fuerte que en un silvestre, quizás por no permanecer Dni1p concentrada en ese microdominio de

la membrana antes del tratamiento; (3) la actina participa en la concentración de Dni1p por un mecanismo dependiente de Dni2p y por otro mecanismo independiente de esta proteína.

En el apartado 3.1. se ha descrito cómo la endocitosis contribuye sutilmente a mantener a Dni1p concentrada en la punta de los *shmoos*; sin embargo, dado que la latrunculina A inhibe este proceso al despolimerizar la actina, el efecto de la endocitosis en la difusión de Dni1p debe estar incluido en el efecto que realiza la droga en la cepa *dni2Δ*.

3.2.2. La actina asociada al foco de fusión colabora en la concentración de Dni1p y Dni2p en la zona de contacto intercelular.

Se ha descrito que a lo largo de la proyección del *shmoo* se posicionan dos forminas que nuclean dos tipos diferentes de cables, además de los parches de actina necesarios para la endocitosis. El denominado foco de fusión, que constituye una estructura de F-actina que se acumula en la zona de contacto intercelular y está relacionado con la fusión celular durante la conjugación (**figura 3D**), está nucleado por la formina Fus1p y depende para su formación de las miosinas de tipo V Myo51p y Myo52p (Dudin et al., 2015). Dado que la actina es necesaria para que Dni1p permanezca localizada correctamente en el microdominio de fusión de la membrana, y que a lo largo de la proyección del *shmoo* coexisten diferentes estructuras de actina, se procedió a estudiar la influencia de cada una de dichas estructuras en la localización de Dni1-GFP. En la sección 3.1. se ha descrito cómo la endocitosis interviene de manera sutil en la concentración de Dni1p en la punta del *shmoo*. Con el fin de estudiar la relación de la actina presente en el foco de fusión con la localización de Dni1p, se analizó cómo se localizaba Dni1-GFP en los mutantes *fus1Δ* y *myo52Δ*. En la **figura 33A** se observa que en ambos mutantes la señal de Dni1-GFP deja de detectarse como un punto discreto de fluorescencia, y en su lugar aparece extendida por toda la membrana de los *shmoos*, de manera muy parecida a lo que sucedía en el mutante *dni2Δ* (**figuras 18B y 33A**). Este resultado indica que la presencia de un foco de fusión organizado es necesaria para que Dni1p se localice de manera concentrada en un microdominio de la membrana plasmática situado en la punta de los *shmoos*. Asimismo también se puede observar que Dni2-GFP difunde por la membrana plasmática cuando se altera la estructura del foco de fusión (**figura 33B**). Seguramente el hecho de que Dni2p no permanezca concentrada es lo que ocasione la difusión de Dni1p a lo largo de la membrana plasmática en estos mutantes.

Para cuantificar la influencia del foco de fusión por sí solo, se procedió a realizar el *line-scan* de las cepas de *fus1Δ* o *myo52Δ* que portaban la proteína de fusión Dni1-GFP, y se comparó con el de una estirpe *dni2Δ*. En la **figura 33C** se puede apreciar que la gráfica obtenida para los mutantes *fus1Δ* o *myo52Δ*, en los que no se forma el foco de fusión, es

similar. Sin embargo, nuevamente se aprecia que la difusión de Dni1-GFP es mayor cuando se deletiona *dni2*⁺.

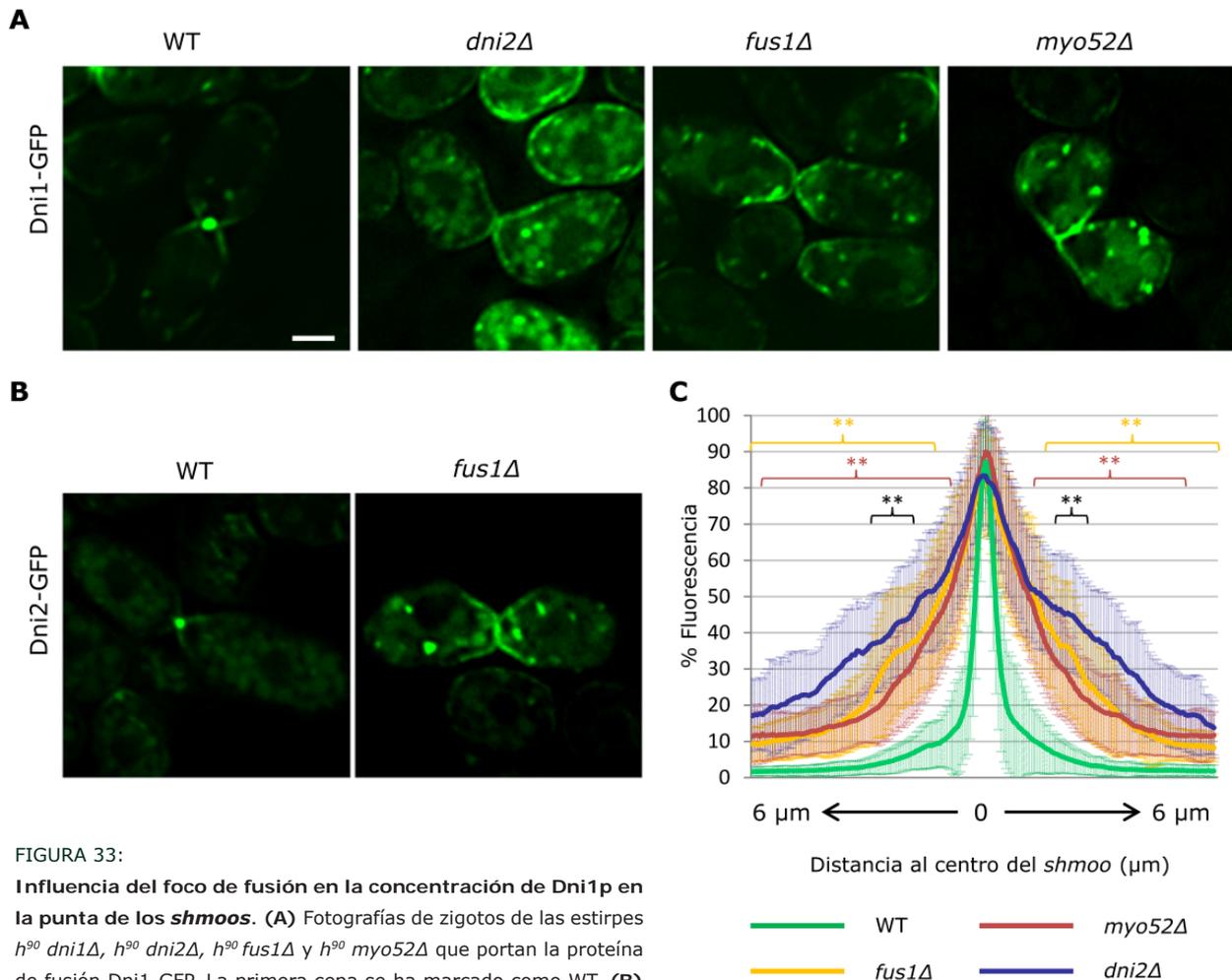


FIGURA 33:

Influencia del foco de fusión en la concentración de Dni1p en la punta de los *shmoo*s. (A) Fotografías de zigotos de las estirpes *h⁹⁰ dni1Δ*, *h⁹⁰ dni2Δ*, *h⁹⁰ fus1Δ* y *h⁹⁰ myo52Δ* que portan la proteína de fusión Dni1-GFP. La primera cepa se ha marcado como WT, (B) Zigotos de las estirpes *h⁹⁰ dni2Δ* y *h⁹⁰ fus1Δ* que expresan Dni2-GFP.

La primera cepa se ha marcado como WT. En A y B la inducción de la conjugación se llevó a cabo en MM-N líquido. Las imágenes muestran el plano central de una serie en z y se realizaron con un sistema DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 2,5 μm. (C) Representación gráfica del *line-scan* de las mismas imágenes que en A, n=80. En el eje Y se representa el porcentaje de la intensidad en cada punto normalizado con respecto al valor máximo. En el eje X se representa la distancia medida en μm desde la punta del *shmoo*. Las llaves señalan las regiones con diferencias significativas, donde ** corresponde a p<0,01. Se indica en negro la significación estadística de la comparación entre los mutantes *fus1Δ* y *myo52Δ*, en granate la de *dni2Δ* y *myo52Δ*, en amarillo la de *dni2Δ* y *fus1Δ*.

Todos los resultados descritos en el apartado 3.2. indican que la actina es necesaria para la concentración de Dni1p en el microdominio de fusión. La mayor contribución a este proceso se debe a la actina que está asociada al foco de fusión, siendo minoritaria la implicación de la actina que participa en el proceso de endocitosis. De hecho, al comparar las fotografías de las **figuras 30** y **33A** se puede percibir que mientras que en el mutante *end4Δ*, sí que se detecta una zona de mayor concentración de Dni1-GFP en la zona de contacto intercelular, en *fus1Δ* y *myo52Δ* no es así. Además, el foco de fusión también es necesario para que Dni2p se concentre en ese microdominio de fusión. El hecho de que

la ausencia de Dni2p haga que Dni1p difunda aún más por la membrana que cuando se despolimerizan las estructuras de actina, parece indicar que Dni2p debe interaccionar o colaborar, además de con la actina, con algún otro elemento para concentrar eficientemente a Dni1p en el microdominio de fusión, de manera que ésta pueda llevar a cabo su función eficientemente, promoviendo la fusión celular.

3.2.3. La actina se organiza correctamente en los mutantes *dni1Δ* y/o *dni2Δ*

Existen varios mutantes con alteraciones en funciones relacionadas con la actina que presentan un fenotipo muy parecido al de los mutantes *dniΔ*, caracterizado por una acumulación de prezigotos en condiciones de conjugación y ausencia de defecto si la proteína se expresa en uno de los parentales (Petersen et al., 1995; Petersen et al., 1998a; Kurahashi et al., 2002; Dudin et al., 2015). Con el objetivo de conocer si el defecto de los mutantes *dni1Δ* y/o *dni2Δ* se debía a una alteración en la organización de la actina, se procedió a estudiar la localización de las estructuras de actina en cepas *h⁹⁰* en condiciones de conjugación. Se utilizó la sonda CHD-GFP, en la que el dominio con homología a Calponina de Rng2p (que se une específicamente a polímeros de actina. Martin y Chang, 2006) se ha fusionado a la GFP para marcar la F-actina. En la **figura 34** se observa que en los tres mutantes hay un marcaje similar al detectado en la estirpe silvestre, tanto para los parches de actina como para el foco de fusión. Por lo tanto, la delección de *dni1+* y/o *dni2+* no afecta a la organización de las estructuras de actina durante la conjugación, al menos al nivel detectable mediante esta técnica.

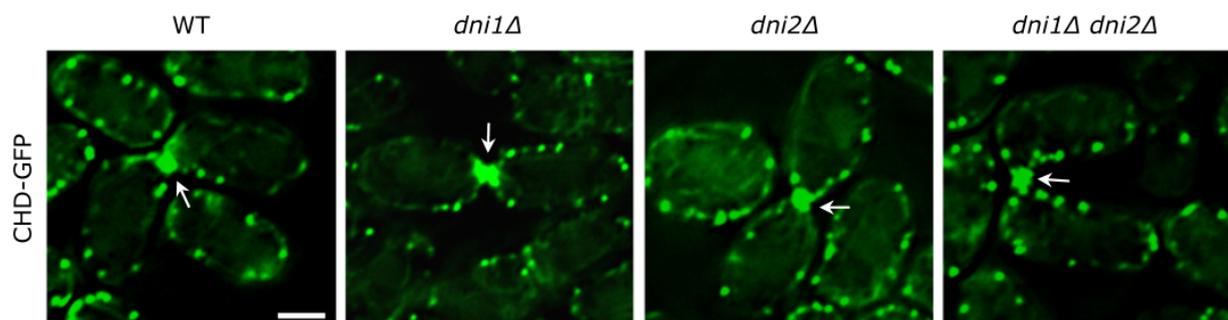


FIGURA 34:

Localización de las distintas estructuras de actina durante conjugación. Fotografías de estirpes *h⁹⁰* WT, *dni1Δ* y/o *dni2Δ* que expresan la sonda CHD-GFP que marca las estructuras de actina. La inducción de la conjugación se realizó en MM-N líquido. Las flechas señalan la estructura de actina denominada "foco de fusión". Las imágenes muestran el plano central de una serie en z y se realizaron con un sistema DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 2,5 μ m.

3.3. La concentración de Dni1p en el microdominio de fusión requiere que los esteroides de la membrana se organicen correctamente

Dado que el tratamiento con el complejo filipina altera la localización de Dni1p de manera que la proteína se observa a lo largo de la proyección del *shmoo*, sin permanecer

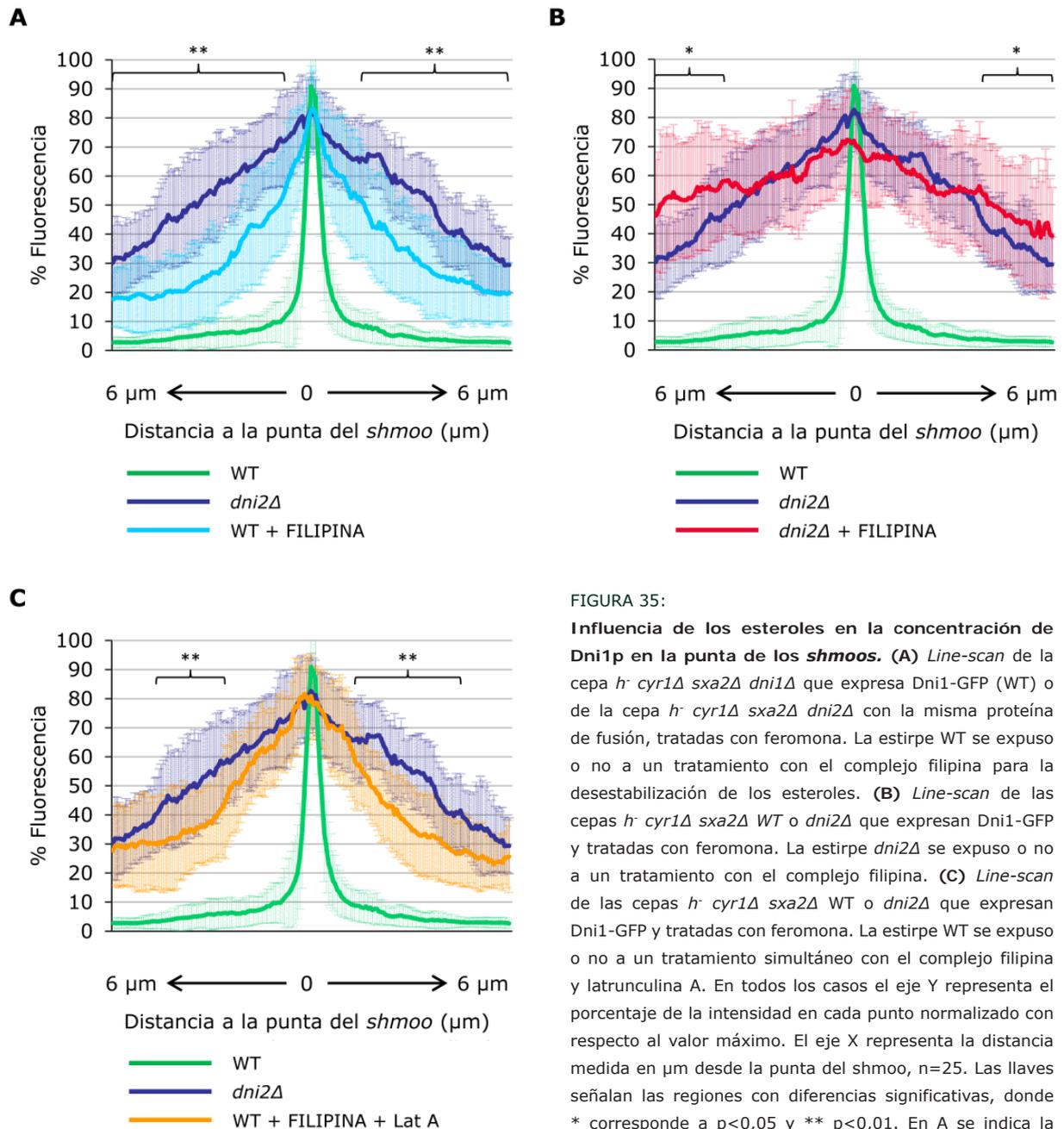


FIGURA 35:

Influencia de los esteroides en la concentración de Dni1p en la punta de los *shmoo*.

(A) *Line-scan* de la cepa *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ dni1Δ* que expresa Dni1-GFP (WT) o de la cepa *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ dni2Δ* con la misma proteína de fusión, tratadas con feromona. La estirpe WT se expuso o no a un tratamiento con el complejo filipina para la desestabilización de los esteroides. (B) *Line-scan* de las cepas *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ WT* o *dni2Δ* que expresan Dni1-GFP y tratadas con feromona. La estirpe *dni2Δ* se expuso o no a un tratamiento con el complejo filipina. (C) *Line-scan* de las cepas *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ WT* o *dni2Δ* que expresan Dni1-GFP y tratadas con feromona. La estirpe WT se expuso o no a un tratamiento simultáneo con el complejo filipina y latrunculina A. En todos los casos el eje Y representa el porcentaje de la intensidad en cada punto normalizado con respecto al valor máximo. El eje X representa la distancia medida en μm desde la punta del *shmoo*, n=25. Las llaves señalan las regiones con diferencias significativas, donde * corresponde a p<0,05 y ** p<0,01. En A se indica la significación estadística de la comparación entre el mutante

dni2Δ y la estirpe WT tratada con el complejo filipina. En B la comparación corresponde a un mutante *dni2Δ* tratado o no con el complejo filipina. En C la comparación se realiza entre el mutante *dni2Δ* y la estirpe WT tratada simultáneamente con el complejo filipina y latrunculina A.

concentrada en el microdominio de fusión (Clemente-Ramos et al., 2009), se analizó mediante *line-scan* el patrón de difusión de Dni1p tras el tratamiento con el complejo filipina. Este antibiótico interfiere con los esteroides de la membrana y altera la organización de los mismos. Se trataba de analizar la posibilidad de que Dni2p estuviera concentrando a Dni1p mediante su interacción con los esteroides, los cuales en *S. pombe* se concentran en las zonas de crecimiento activo (Wachtler et al., 2003). Como se observa en la **figura 35A**, la fluorescencia de Dni1-GFP a lo largo de la membrana en presencia de filipina no es tan

elevada como la que se observa en el mutante *dni2Δ*, indicando que la acción de Dni2p se ejerce de manera independiente a los esteroides, o no exclusivamente a través de estos lípidos. En la **figura 35B** se puede apreciar cómo cuando se trata un mutante *dni2Δ* con latrunculina A, la difusión de Dni1-GFP es superior a la que ocurre en el mutante *dni2Δ*. Es decir, la acción de Dni2p y la de los esteroides para concentrar a Dni1p es aditiva. El hecho de que el nivel de difusión de Dni1-GFP sea superior en ausencia de *dni2⁺* se podría explicar si Dni2p anclara a Dni1p tanto a la actina como a los esteroides. Sin embargo, al tratar el control WT simultáneamente con el complejo filipina y con latrunculina A, se observa que la presencia de Dni1-GFP en la zona de la membrana plasmática adyacente a la punta de los *shmoos* continúa siendo mayor en el mutante *dni2Δ* (**figura 35C**).

Todos los experimentos de cuantificación mediante *line-scan* parecen indicar la existencia de varios factores que contribuyen a concentrar a Dni1p en el microdominio de fusión. De esta forma, es probable que la proteína Dni2, el foco de fusión y los esteroides ejerzan su acción para concentrar a Dni1p en la punta del *shmoo* de forma independiente.

3.4. Los requerimientos Dni1p y Dni2p para permanecer en el microdominio de fusión son distintos

Los resultados descritos en los apartados anteriores demuestran que Dni2p es necesaria para la formación del microdominio en la membrana plasmática enriquecida en Dni1p, que se localiza la punta de los *shmoos*. Sin embargo, en la sección 2.2.1. se ha descrito que al mutagenizar las cisteínas C58 o C68 de Dni1p, o al deletar su extremo C-terminal, estas versiones mutantes se siguen localizando concentradas en la punta del *shmoo* a pesar de que Dni2p únicamente se detecte en el RE (**figuras 24A y 24C**). Una posible explicación para este hecho sería que Dni2p llegara a la membrana, pero que permaneciera allí tan solo el espacio de tiempo suficiente para que Dni1p se anclara a otro elemento que impidiera su difusión por la membrana, y después se localizara en otro lugar o se degradara. Los hechos de que la permanencia de Dni2p en la membrana plasmática fuera muy breve y de que en las cepas que portan las proteínas Dni1 mutadas la fluorescencia de Dni2-GFP en el RE es intensa, podrían enmascarar la señal fluorescente de Dni2-GFP en la membrana plasmática. Esto explicaría la ausencia del punto fluorescente de Dni2-GFP en el microdominio de fusión de dichos mutantes. Además, esta hipótesis podría estar de acuerdo con el hecho de que Dni2p, el foco de fusión y los esteroides contribuyan de manera aditiva a la concentración de Dni1p mediante la siguiente explicación: es posible que Dni2p sea el responsable inicial de que Dni1p comience a agregarse en un dominio y que después la actina y los esteroides contribuyan a estabilizar este microdominio en la membrana plasmática y a frenar la difusión de Dni1p, siendo a partir de este momento prescindible la acción de Dni2p.

Con el fin de estudiar si Dni1p y Dni2p permanecen o no durante un tiempo similar en la membrana plasmática, una vez que han llegado a la misma, se procedió a analizar su localización tras inhibir la llegada de proteína de nueva síntesis. Para llevar a cabo este experimento se indujo la formación de *shmoos* en cepas *cyr1Δ sxa2Δ* y, una vez que se detectó tanto a Dni1p como a Dni2p en la punta del *shmoo*, los cultivos se trataron con brefeldina A, que inhibe la secreción de proteínas de membrana (Turi et al., 1994). En la **figura 36A** se puede apreciar cómo incluso en las condiciones habituales de cultivo, el punto de fluorescencia que forma Dni2p es de menor tamaño que el de Dni1p. Además, el porcentaje de *shmoos* en los que se detecta Dni2p en la punta (**figura 36B**), es significativamente inferior con respecto al porcentaje de *shmoos* que presentan a Dni1p en su punta. Tras inhibir la llegada de nueva proteína mediante el tratamiento con brefeldina A, se puede intuir que el tiempo que Dni1p permanece en el microdominio de fusión es bastante corto, puesto que sólo un 48% de los *shmoos* que presentaban Dni1-GFP como un punto lo mantienen (representado por el color más oscuro en la gráfica). En el caso de Dni2-GFP el efecto del tratamiento es más severo, ya que esta proporción disminuye hasta un 12%. Estos resultados apoyan la hipótesis de que Dni1p permanece durante más tiempo que Dni2p concentrado en el microdominio de fusión.

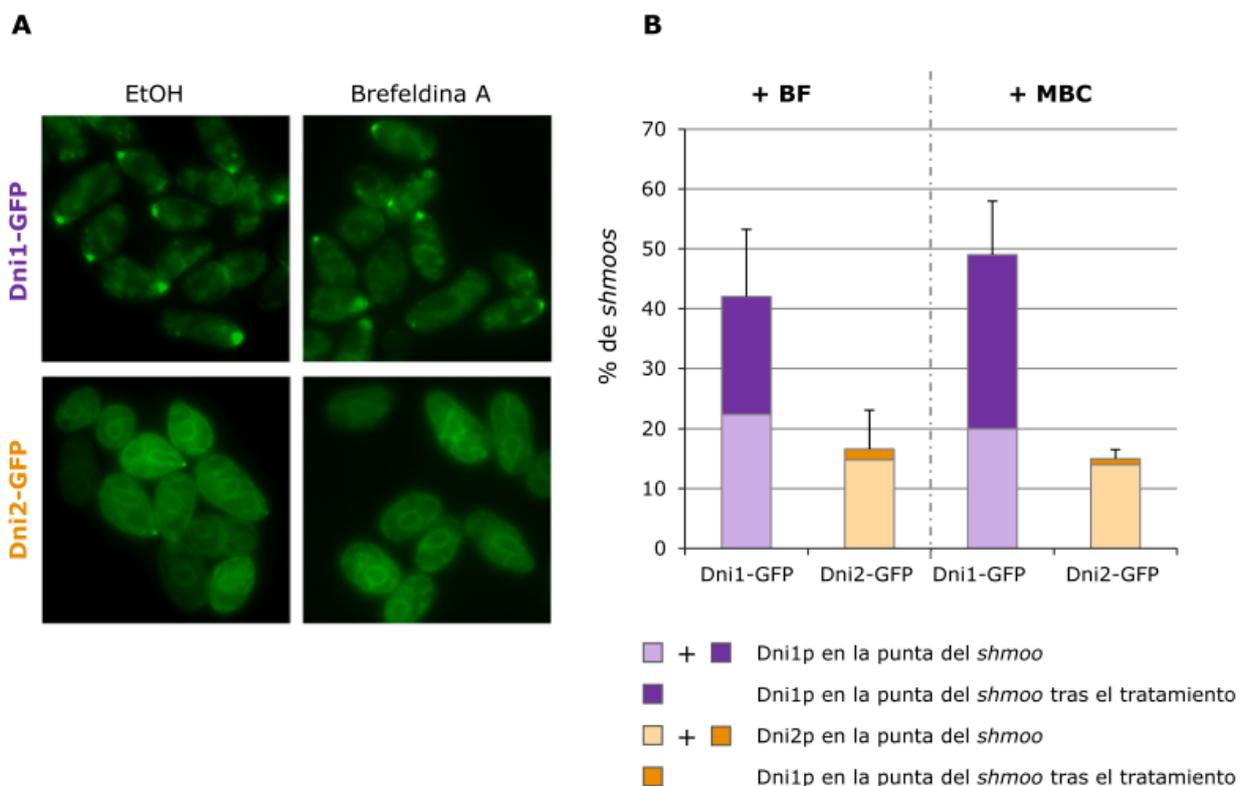


FIGURA 36:

Análisis de la permanencia de Dni1p y Dni2p en el microdominio de fusión. (A) Fotografías de *shmoos* *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ dni1Δ* que expresan Dni1-GFP o de *shmoos* *h⁻ cyr1Δ sxa2Δ dni2Δ* que expresan Dni2-GFP, tratados o no con brefeldina A. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia convencional. Barra de escala 5 μ m. (B) Porcentaje de *shmoos* que presentan cada una de las proteínas concentradas en la punta. En oscuro se muestra el porcentaje de estos *shmoos* que mantienen el marcaje en la punta tras el tratamiento con brefeldina A (+BF) o MBC.

Un efecto similar se observó al tratar las células con MBC (**figura 36B**), un compuesto que promueve la despolimerización de los microtúbulos (Mulvihill y Hyams, 2002). La explicación de este resultado podría deberse a que el transporte de Dni1p y Dni2p fuera a través de los microtúbulos; sin embargo, en levaduras se ha descrito que el transporte polarizado de vesículas tiene lugar a través de filamentos de actina (Pruyne et al., 2004). No obstante, el hecho de que aún no se conozca, no implica que no exista un transporte de vesículas a través de microtúbulos en la levadura de fisión. Aun así, los microtúbulos reparten factores de polaridad a la periferia celular (Snaith y Sawin, 2003). Una hipótesis alternativa que explicaría el resultado obtenido tras el tratamiento con MBC es que al eliminar los microtúbulos, el foco de fusión se podría ver alterado de una forma que hiciera que Dni1p, y sobre todo Dni2p, fueran inestables en esa localización.

Estos dos resultados constituyen una evidencia fuerte de que el comportamiento de Dni1p y Dni2p en el microdominio de fusión es diferente.

4. ESTUDIOS DE SOBREENPRESIÓN

El análisis del fenotipo producido por la sobreexpresión de un gen es una estrategia muy utilizada para obtener información acerca de la función del mismo. Se asume que un exceso de la proteína codificada por él interferirá con el funcionamiento de aquellas proteínas con las que interacciona normalmente, por lo que el proceso en el que interviene dicho gen se verá alterado. Un inconveniente de esta técnica es que un número excesivamente alto de copias de esa proteína podría hacer que la misma interaccione con proteínas y/o procesos con los que normalmente no lo hace. Al realizar los análisis de complementación de mutantes nulos por la sobreexpresión de *dni1*⁺ (punto 2.1.4.) se observó que las células morían si sobreexpresaban dicho gen en crecimiento vegetativo durante más de 24 horas. Dado el fuerte efecto observado, se decidió analizar en mayor detalle el fenotipo de las células que sobreexpresan *dni1*⁺ o *dni2*⁺.

4.1. Las células que sobreexpresan *dni1*⁺ pierden la integridad celular en un proceso dependiente de Dni2p

Con el fin de investigar el efecto de la sobreexpresión de los genes *dni1*⁺ y *dni2*⁺, ambos se clonaron en el plásmido pREP3x para expresarlos bajo el control del promotor *nmt1*⁺, que permite una expresión fuerte y es reprimible por tiamina. Se había observado experimentalmente que la estirpe que sobreexpresaba *dni2*⁺, construida con el marcador *ura4*⁺, crecía mejor que otras cepas que no presentaban tal prototrofia. Por esta razón, con el fin de comparar el efecto de la sobreexpresión de *dni1*⁺ o *dni2*⁺ en cepas cuya capacidad de crecimiento inicial fuera similar, se usaron cepas transformadas con vectores vacíos que proporcionaran las prototrofías necesarias, de manera que todas las cepas analizadas tuvieran las mismas auxotrofías. Como el vector pREP3x es un plásmido replicativo, las células que lo portaban debían mantenerse en medio selectivo para así evitar que lo perdieran en el caso de que el producto generado fuese tóxico para ellas. Para controlar la expresión de dichos plásmidos se utilizaron dos lotes de placas, uno suplementado con tiamina (en el que el promotor permanecía apagado), y otro sin la vitamina (el promotor se mantenía encendido).

En la **figura 37A** se muestra cómo la presencia de *dni1*⁺ en un alto número de copias es letal para las células de *S. pombe*. Además se puede observar que cuando se sobreexpresa *dni1*⁺ en el mutante *dni2* Δ , las células son capaces de crecer, indicando que Dni2p es necesaria para que Dni1p produzca el daño celular cuando está en un número de copias elevado.

Se sabe que la sobreexpresión de algunas proteínas de membrana que se acumulan en el RE genera estrés del RE por la sobrecarga de proteínas independientemente de

que éstas estén bien o mal plegadas (Pahl, 1999; Davies et al., 2009). Si la muerte de las células que sobreexpresan *dni1*⁺ se produjera por este mecanismo, la situación sería similar al sobreexpresar *dni2*⁺, que codifica una proteína con características similares, usando el mismo promotor. En la **figura 37A** se muestra que la sobreexpresión de *dni2*⁺ no es letal en un silvestre. Además tampoco lo es en un mutante *dni1Δ*, lo que descarta la posibilidad de que en ausencia de Dni1p las membranas estuvieran alteradas de un modo que fueran sensibles a un exceso de Dni2p. La sobreexpresión de *prm1*⁺ tampoco es perjudicial para las células (no mostrado), lo que demuestra que la letalidad se debe a alguna característica estructural/funcional específica de Dni1p.

En la sección 2.1.3. se ha demostrado que durante conjugación Dni2p es necesaria para que Dni1p se localice correctamente; por ello, surgió la duda de si la falta de daño celular en la estirpe *dni2Δ* que sobreexpresa el gen *dni1*⁺ podría deberse a que en este mutante la proteína Dni1p no se localizara correctamente. Para comprobar si esto era así, se sobreexpresó la proteína de fusión Dni1-GFP. Como se observa en la **figura 37B**, cuando Dni1p aparece en un elevado número de copias, se detecta en puntos citoplasmáticos y en la superficie celular, permaneciendo más concentrada en los sitios de crecimiento activo (polos celulares y zonas de síntesis del septo de división). En ausencia de Dni2p, la proteína Dni1-GFP se localiza en membranas intracelulares, el contorno nuclear y el contorno celular. Este patrón de distribución es característico del RE y sugiere que en ausencia de Dni2p, Dni1p queda retenida dentro de este orgánulo, siendo incapaz de llegar a su destino final, o al menos de hacerlo tan eficientemente como en el control silvestre. Como consecuencia, no se provoca la muerte celular aunque la proteína se esté sobreexpresando. Esto está de acuerdo con que la función de Dni1p se ejerce en la membrana plasmática; un exceso de la proteína o bien alteraría la membrana haciendo a las células más susceptibles a la lisis, o bien interaccionaría con otro(s) factor(es) que produzcan el daño celular.

En la sección 2.1.5. se ha demostrado que Dni1p y Dni2p forman un complejo. Es posible que una elevada cantidad de Dni1p en las células cause daños como consecuencia de que el complejo sea incapaz de establecerse correctamente, debido a que las cantidades de ambas proteínas no estuvieran balanceadas. De esta forma, las moléculas de Dni1p sin asociar con Dni2p podrían resultar tóxicas al no poder alcanzar la configuración nativa. También es posible las moléculas de Dni1p que están en exceso pudieran interaccionar con otras proteínas que participen en procesos en los que Dni2p no lo hiciera, ya que como se ha mencionado anteriormente la sobreexpresión de *dni2*⁺ no es letal. Con el fin de equiparar el número de copias de Dni1p y Dni2p, se sobreexpresaron los genes que codifican ambas proteínas en las mismas células. En la **figura 37C** se muestra que la presencia simultánea de un nivel elevado de Dni1p y Dni2p continúa ocasionando muerte celular. El mismo resultado se obtuvo tanto expresando *dni1*⁺ en el plásmido pREP3x y *dni2*⁺ en el derivado con el marcador *his3*, como con la combinación contraria (si el vector pREP3x contenía

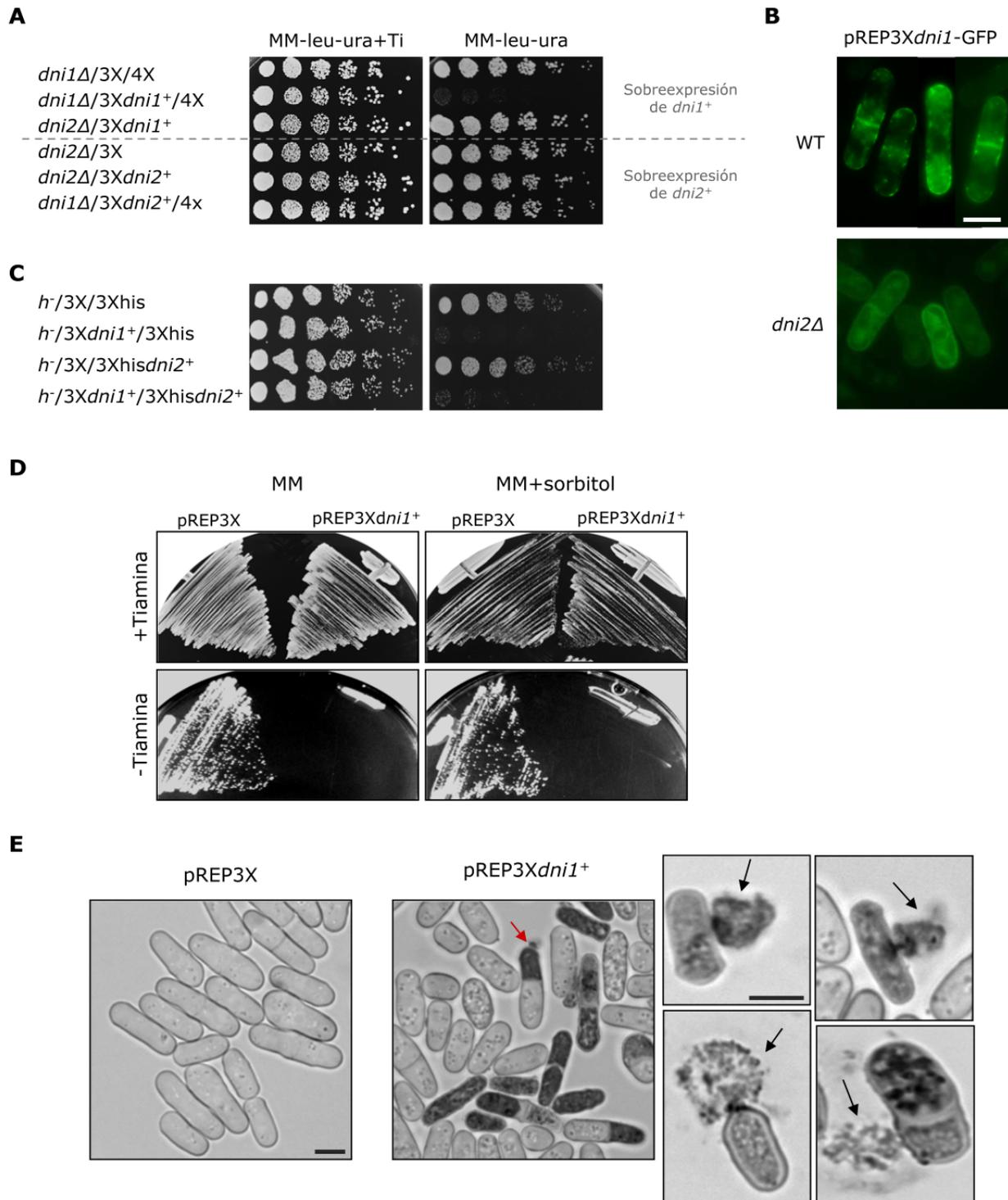


FIGURA 37:

La sobreexpresión de *dni1*⁺ provoca muerte celular. (A) 3x10⁴ células, y diluciones seriadas 1:4, procedentes de cultivos de las estirpes *dni1Δ* o *dni2Δ*, transformadas con los vectores vacíos (pREP3x o pREP4x) o con los plásmidos de sobreexpresión de los genes *dni1*⁺ o *dni2*⁺, que se inocularon en placas de MM + tiamina (condiciones de represión) o de MM - tiamina (desrepresión). Las placas se incubaron durante 2 días a 32°C. (B) Localización de la proteína Dni1-GFP en condiciones de sobreexpresión (21 horas sin tiamina) en la estirpe control (WT) y en el mutante *dni2Δ*. (C) Cultivos similares a los del panel A, de estirpes que portan dos plásmidos de sobreexpresión, vacíos o con los genes *dni1*⁺ y/o *dni2*⁺. (D) Placas de MM suplementadas o no con sorbitol en las que había inoculado células de una estirpe transformada con el vector vacío o con el plásmido de sobreexpresión de *dni1*⁺. Las placas se incubaron a 32°C antes de ser fotografiadas. (E) Fotografías al microscopio de campo claro de células de una estirpe silvestre transformada con el vector pREP3x o con el plásmido pREP3*dni1*⁺ incubadas en ausencia de tiamina durante 30 horas a 32°C y teñidas con azul de metileno. La célula del panel grande señalada por la flecha roja, y las células de los paneles de la derecha muestran las zonas de la célula por donde ha tenido lugar la salida del contenido citoplasmático (señalado por flechas). Las imágenes se tomaron con un microscopio convencional. Barra de escala 5 μm.

el gen *dni2⁺* y el vector pREP3*his3⁺* el gen *dni1⁺*). En este último caso, las células que expresaban pREP3*his3⁺*+*dni1⁺* no morían completamente, sino que era posible detectar cierto nivel de crecimiento, aunque significativamente inferior al de la estirpe silvestre. Este efecto se debe a que la construcción con el plásmido pREP3*his3⁺* presenta un nivel de expresión ligeramente inferior al del plásmido pREP3x (Moreno et al., 2000).

Estos resultados demuestran que para que el exceso de Dni1p cause daño a las células es necesario que Dni2p esté presente, pero que no es necesario que ambas proteínas permanezcan en cantidades elevadas, lo que sugiere que la letalidad no se produce por la presencia de un complejo Dni1/Dni2 estable. Además hay que recordar que la sobreexpresión se está produciendo durante el crecimiento vegetativo, momento en el que la expresión de *dni2⁺* es muy baja. De manera que o bien la expresión de *dni2⁺* aumenta en condiciones de sobreexpresión de *dni1⁺*, o bien la interacción de Dni2p con Dni1p es muy breve en el tiempo, de manera que unas pocas moléculas de Dni2p fueran capaces de interactuar con todo el conjunto de Dni1p. Esta idea estaría de acuerdo con los resultados obtenidos con los mutantes de las cisteínas conservadas de Dni1p (situación en la que Dni1-GFP se localiza en el microdominio de fusión pero Dni2-GFP no se observa allí) y con el tratamiento con Brefeldina A (que demuestra que la permanencia de Dni1p en el microdominio es menor que la de Dni2p). Por otro lado, Dni1-GFP en condiciones de sobreexpresión se localiza en la membrana plasmática en una cepa WT, pero en ausencia de Dni2p se detecta en el RE, dato que concuerda con el hecho de que las células retienen las proteínas en el RE hasta que consiguen plegarse y oligomerizar completamente (Cosson et al., 2013).

4.2. La muerte de las células que sobreexpresan *dni1⁺* no se remedia por sorbitol

Con el fin de averiguar si la muerte celular producida por un exceso de la proteína Dni1p se debía a una lisis generada como consecuencia de alteraciones en la pared celular, se analizó el crecimiento de dicha estirpe en placas de MM sin leucina suplementadas o no con el estabilizador osmótico sorbitol. Como se muestra en la **figura 37D**, tanto la estirpe que porta el vector vacío como la que expresaba *dni1⁺* en un número de copias elevado, fueron capaces de crecer en presencia de tiamina (promotor apagado). Sin embargo, en condiciones de sobreexpresión, únicamente se detectó crecimiento de la cepa control. Este resultado sugiere que el daño producido en las células que sobreexpresan *dni1⁺* no está relacionado con un defecto en la síntesis de la pared celular, o al menos no lo está exclusivamente.

Con el propósito de obtener una idea más detallada del efecto que conlleva la sobreexpresión de *dni1⁺*, se analizó si las células que sobreexpresaban dicho gen morían en un momento determinado de su ciclo de vida. Para averiguar si todas las células perdían la

integridad celular en un punto concreto de su ciclo vital, se tiñeron con azul de metileno. Esta tinción se utiliza para determinar qué células se encuentran muertas, ya que al haber perdido la integridad permiten el paso del colorante, y se detectan de color oscuro al microscopio de campo claro. Además, si las células hubieran dejado salir su contenido celular justo en el momento de la tinción, este contenido aparecería oscuro y se podría determinar por qué zona de la célula ha salido al exterior. La tinción se realizó a las 22 horas de incubación sin tiamina (desrepresión). En la **figura 37E** se observa cómo en la estirpe control las células no han perdido la integridad celular (no se detectan células oscuras) mientras que en las células con un elevado número de copias de *dni1+*, un 30% de las células se encuentran lisadas. Se ve cómo sólo la mitad de la célula aparece teñida en muchos casos, lo que sugiere que la muerte ha ocurrido después de la formación del septo. La célula del panel grande señalada por la flecha roja, y las células de los paneles de la derecha, muestran que la salida del contenido citoplasmático ocurre tanto en los polos como en las zonas cercanas al septo, regiones en las que se detectó con mayor intensidad la presencia de Dni1-GFP en condiciones de sobreexpresión.

4.3. La sobreexpresión de *dni1+* provoca una expansión del RE

Con el fin de obtener una información más detallada del efecto de la sobreexpresión del gen *dni1+*, se realizaron fotografías con un microscopio electrónico de transmisión. De esta forma se observó que más de un 70% de las células presentaban entre 1 y 4 invaginaciones de lo que parecía membrana plasmática (se indica con flechas en la **figura 38A**). Este resultado, junto con el hecho de que la lisis celular no se corrigiera por un estabilizador osmótico, parecería indicar la existencia de algún tipo de alteración en la membrana plasmática. No obstante, el RE se dispone en el interior celular muy próximo a la membrana plasmática. Debido a ello, no fue posible distinguir ambos orgánulos en las fotografías mostradas en la **figura 38A**.

Con el propósito de determinar si las estructuras detectadas mediante microscopía electrónica correspondían a membrana plasmática o a RE, se procedió a utilizar marcadores fluorescentes específicos. Para ello, se transformaron cepas que portaban la proteína de fusión Sur4-RFP (como marcador del RE), o bien Psy1-mCherry (como marcador de la membrana plasmática) con el vector vacío o el plásmido que sobreexpresaba *dni1+*. En la **figura 38B** se puede comprobar que la membrana plasmática de las células que contienen un número de copias de Dni1p elevado no presenta alteraciones aparentes. Sin embargo, al analizar la disposición del RE, es posible percibir la existencia de unas láminas intracelulares hiperdesarrolladas y de cúmulos de fluorescencia en los polos cuando se sobreexpresa *dni1+*. Este resultado sugiere que las estructuras anómalas detectadas mediante microscopía electrónica correspondían al RE y no a la membrana plasmática, y que la letalidad de la sobreexpresión de *dni1+* está asociada a una alteración del RE.

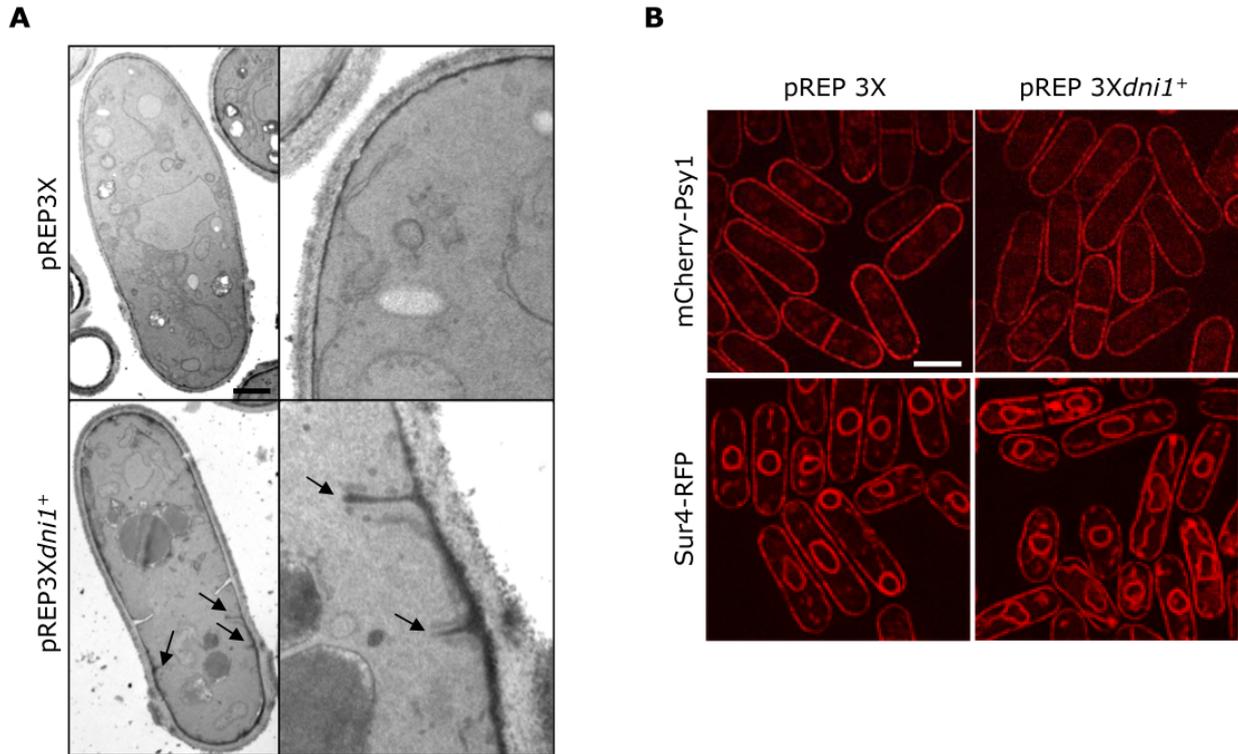


FIGURA 38:

La sobreexpresión de *dni1*⁺ provoca una expansión del RE. (A) Micrografías al microscopio electrónico de una célula control (pREP3x) y otra que sobreexpresa *dni1*⁺. Para cada cepa, la fotografía de la derecha consiste en una ampliación de la cepa mostrada a la izquierda. Las flechas señalan posibles invaginaciones de la membrana plasmática. Barra de escala 1 μm. (B) Fotografías de cepas transformadas con el vector vacío o con el plásmido de sobreexpresión de *dni1*⁺, que portan la proteína de fusión Sur4-RFP (marcaje de RE) o mCherry-Psy1 (marcaje de membrana plasmática). Las imágenes son proyecciones máximas de planos adquiridos en series-z y se realizaron con un sistema DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 5 μm.

4.4. Las células que sobreexpresan *dni1*⁺ se mueren por una señalización dependiente de Ire1p

Con el objetivo de obtener más información sobre la muerte de las células que portan una elevada cantidad de la proteína Dni1p, se analizó a través de qué ruta de señalización se producía este proceso, para así intentar averiguar si la función de Dni1p pudiera estar relacionada con alguna de ellas. Para ello se sobreexpresó *dni1*⁺ en mutantes que carecían de las principales rutas de señalización: *sty1Δ* (carente de la MAPK de la ruta de respuesta a estrés (Toda et al., 1991)), *pmk1Δ* (carente de la MAPK de la ruta de integridad celular (Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997)), o bien *ire1Δ* (carente de la quinasa-nucleasa que detecta la presencia de proteínas mal plegadas en el RE, e inicia la denominada UPR o respuesta a proteínas mal plegadas (Ron y Walter, 2007)). De todos estos mutantes, únicamente *ire1Δ* fue capaz de crecer en condiciones de sobreexpresión de *dni1*⁺ (figura 39A y datos no mostrados), lo que indica que la muerte celular asociada a dicha sobreexpresión se producía a través de una señalización en la que intervenía Ire1p. Por lo tanto, es posible que las células con niveles de Dni1p elevados presenten

hiperactivada la UPR. Esta ruta se activa al producirse estrés en el RE, que puede consistir en la presencia de proteínas mal plegadas o bien en un exceso de proteínas de secreción; y media una serie de respuestas como son: disminución de la síntesis proteica, incremento de la síntesis de chaperonas que permiten el plegamiento correcto de las proteínas, degradación de las proteínas mal plegadas, y una expansión del RE que favorece que las proteínas mal plegadas no se agreguen y sean accesibles a los mecanismos de reparación. Si la UPR no es capaz de evitar un estrés de RE prolongado, se puede activar una respuesta de autofagia y de apoptosis (Gorman et al., 2012). Por lo tanto, es posible que ésta sea la causa de la muerte de las células que sobreexpresan *dni1*⁺. No obstante, la delección de *ire1*⁺ sólo rescataba parcialmente la letalidad asociada a la sobreexpresión (la células *ire1Δ* que portan el plásmido pREP3*dni1*⁺ no crecen tan eficientemente como las que portan el plásmido vacío). Esto demuestra la existencia de algún factor adicional a la UPR que contribuye a la letalidad generada por la sobreexpresión de *dni1*⁺; lo más probable es que éste factor sea el efecto que Dni1p ejerce en la membrana plasmática.

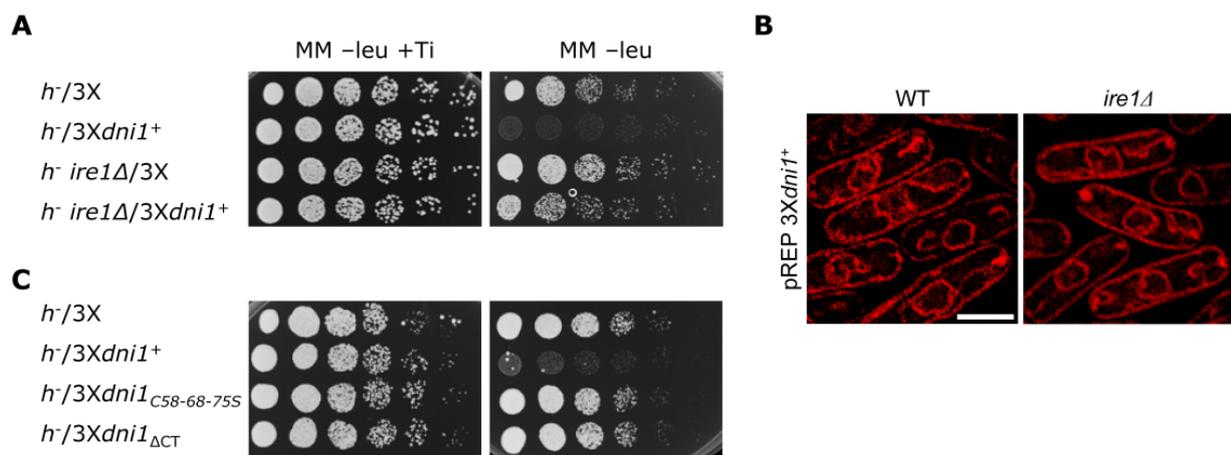


FIGURA 39:

Análisis del papel de Ire1p en los fenotipos asociados a la sobreexpresión de *dni1*⁺. (A) 3x10⁴ células, y diluciones seriadas 1:4, procedentes de cultivos de las estirpes WT o *ire1Δ*, transformadas con el vector vacío (pREP3x) o con el plásmido de sobreexpresión de *dni1*⁺, inoculadas en placas de MM sin leucina + tiamina (MM-leu+Ti, condiciones de represión) o de MM sin leucina y sin tiamina (MM-leu, desrepresión). Las placas se incubaron durante 2 días a 32°C. (B) Fotografías de las estirpes WT o *ire1Δ* que portan la proteína de fusión Sur4-RFP que marca el RE y además sobreexpresan *dni1*⁺. Las imágenes son proyecciones máximas de planos adquiridos en series-z y se realizaron con un sistema DeltaVision Deconvolution. Barra de escala 5 μm. (C) Cultivos similares a A, de estirpes que portan el vector vacío o los plásmidos de sobreexpresión de *dni1*⁺, o bien de los mutantes de las tres cisteínas del primer lazo extracelular (*dni1*_{C58SC68SC75S}) o la delección del extremo C-terminal (*dni1*_{ΔCT}).

Dado que la ausencia de *ire1*⁺ era capaz de corregir la muerte celular que se producía por niveles elevados de Dni1p, se decidió estudiar si también subsanaba la alteración morfológica del RE utilizando nuevamente el marcador Sur4-RFP. En la **figura 39B** se muestra que en el mutante *ire1Δ* se siguen apreciando las estructuras anormales que se observan en este orgánulo en la estirpe silvestre cuando se sobreexpresa *dni1*⁺. Así, a pesar de que Ire1p es necesaria para que se produzca la muerte celular, no lo es para la expansión del

RE. Se ha descrito que para aliviar un exceso de proteínas mal plegadas, la membrana del RE puede expandirse por una ruta independiente a la de la UPR (Schuck et al., 2009). Por lo tanto, es factible que la expansión del RE que genera un número de copias elevado de Dni1p se produzca por una vía independiente a la UPR.

4.5. Las cisteínas conservadas y el dominio C-terminal de Dni1p son necesarios para que se produzca daño celular en condiciones de sobreexpresión

Con el fin de averiguar si los elementos estructurales que Dni1p compartía con las claudinas eran importantes para que esta proteína provocara daños en las células cuando se encontraba en un elevado número de copias, se procedió a expresar bajo el control del promotor *nmt1+* las versiones mutadas de Dni1p. En la **figura 39C** se puede ver que la sobreexpresión de los alelos mutantes que codifican las proteínas Dni1_{C58SC68SC75S} y Dni1_{ΔCT} no reduce el crecimiento celular. Por lo tanto, Dni1p necesita las cisteína C58, C68 y C75, así como del dominio C-terminal para causar letalidad cuando la proteína está en un número de copias elevado.

En la sección 2.2.1. se demostró que, mientras que la región C-terminal de Dni1p era prescindible para su función, las tres cisteínas del primer lazo extracelular debían estar presentes para que la proteína fuera totalmente funcional. Sin embargo, el hecho de que la presencia de los elementos citados sean necesarios para provocar la muerte celular por sobreexpresión, indica que la funcionalidad de la proteína no es la causa de la lisis celular, o al menos no es la causa principal. Es probable que las versiones mutantes de la proteína no se plieguen correctamente y por eso no causen daño. Por otra parte, es posible que en ausencia de las tres cisteínas la interacción entre Dni1p y Dni2p se debilite, de manera que en estas condiciones Dni2p fuera incapaz de ejercer su efecto sobre Dni1p, lo que explicaría que la toxicidad pudiera deberse a un exceso de Dni1p proteína nativa. Como la muerte celular depende en gran medida de Ire1p (**figura 39A**), lo más probable es que el efecto de la sobreexpresión de *dni1+* se deba a una activación de Ire1p por la acumulación excesiva de la proteína nativa en el RE, que origine un estrés en el RE, mientras que las versiones mutadas no producirían este estrés.

5. RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS Dni1p, Dni2p y Prm1p

El hecho de que el fenotipo de los mutantes *dni1Δ*, *dni2Δ* y *prm1Δ* muestre características comunes (acumulación de prezigotos en las mezclas de conjugación; desorganización de la membrana plasmática y de la pared celular en la zona de contacto de los *shmoo*s que están conjugando) se podría explicar de dos maneras:

- Los genes *dni1⁺*, *dni2⁺* y *prm1⁺* forman parte de una misma ruta funcional, de manera que Dni1p ejerza su función regulando a Prm1p, o viceversa.
- Los genes *dni1⁺*, *dni2⁺* y *prm1⁺* participan en rutas funcionales distintas, siendo ambas necesarias para garantizar una remodelación de las envueltas celulares que facilite la fusión celular durante la conjugación.

Para distinguir entre estas dos posibilidades se llevaron a cabo los experimentos que se detallan a continuación.

5.1. Los genes *dni⁺* y *prm1⁺* actúan en rutas funcionales diferentes

Una de las aproximaciones seguidas para determinar si dos genes participan en el mismo proceso formando parte de la misma ruta funcional, o si lo hacen formando parte de rutas funcionales paralelas, es generar un mutante doble que carezca de ambos genes. De esta forma, si los dos genes participan en la misma ruta, el hecho de eliminar uno de ellos, el otro, o ambos, tendría efectos similares porque sólo se anularía una función. Como consecuencia el mutante doble presentaría un fenotipo similar al de los mutantes sencillos. Sin embargo, si ambos genes formaran parte de rutas paralelas, al eliminar los dos se estarían suprimiendo dos funciones, y por lo tanto el fenotipo del mutante sería más drástico que el de los mutantes simples. El mutante *prm1Δ* muestra un defecto muy severo en fusión celular, que se ha observado a todas las temperaturas probadas (Curto et al., 2014). Este hecho hace que no sea factible detectar un agravamiento de dicho defecto al eliminar los genes *dni1⁺* y/o *dni2⁺*. Por esta razón no se abordó el análisis de la fusión celular en mutantes dobles *dni1Δ prm1Δ* o *dni2Δ prm1Δ*.

En el punto 2.1.4. se ha mencionado que otra estrategia experimental que puede usarse para obtener información acerca de la relación funcional entre dos genes, es averiguar si la sobreexpresión de uno de ellos es capaz de complementar un nivel reducido del otro gen. En este caso se observó que ni la sobreexpresión de *prm1⁺* suprime el defecto en fusión celular de los mutantes *dni1Δ* y/o *dni2Δ*, ni viceversa (resultados no mostrados). Estos resultados indican que, o bien el gen *prm1⁺* no está relacionado funcionalmente con los genes *dni⁺*, o bien estos tres genes dependen totalmente unos de otros para su función.

Un método alternativo, que se utiliza para averiguar si dos proteínas participan en la misma ruta funcional necesaria para la conjugación, es el análisis de este proceso en cruces unilaterales y bilaterales. Se denominan cruces unilaterales aquellos en los que un gen determinado, que está relacionado con un proceso, sólo aparece mutado en uno de los parentales; cruces bilaterales son aquellos en los que el mismo gen se encuentra mutado en ambos parentales. Un requisito previo para poder llevar a cabo esta estrategia es que el defecto en conjugación debido a una mutación sea menos drástico en cruces unilaterales que en cruces bilaterales. Es decir, que la expresión de la proteína en estudio en uno de los dos parentales sea suficiente para promover la conjugación con cierta eficiencia.

Ya se sabía que en los cruces unilaterales WT x *dni1Δ* y WT x *dni2Δ* el defecto en conjugación es menos severo que en los cruces bilaterales *dni1Δ* x *dni1Δ* y *dni2Δ* x *dni2Δ* (Clemente-Ramos, 2006; Clemente-Ramos et al., 2009). Para comprobar si ocurría lo mismo con los mutantes *prm1Δ*, se procedió a analizar el defecto en el proceso de conjugación en cruces en los que ambos parentales eran silvestres (control positivo del experimento), ambos parentales eran mutantes *prm1Δ* (control negativo del experimento) y en cruces en los que un parental era silvestre y el otro *prm1Δ*. En la **figura 40A** se muestra el resultado de todos los cruces realizados. Para empezar, se observa que, al igual que sucede para los mutantes *dni1Δ* y *dni2Δ*, en los cruces unilaterales de *prm1Δ* x WT la eficiencia de fusión es considerablemente mayor a la obtenida en los cruces bilaterales *prm1Δ* x *prm1Δ*. Este resultado demuestra que la presencia de Prm1p en uno de los parentales es capaz de promover la fusión celular eficientemente. Por tanto, era posible investigar la relación funcional entre los genes *prm1⁺* y *dni⁺*, mediante el análisis de la eficiencia de fusión en cruces unilaterales y bilaterales. Este análisis se basa en las siguientes premisas (representadas en el esquema de la **figura 40B**):

- Cruces bilaterales WT x WT: en este caso, los dos parentales portan los genes *dni⁺* y *prm1⁺*; por lo tanto, la fusión celular se producirá de manera correcta independientemente de si estos genes actúan en la misma ruta funcional o en rutas distintas.
- Cruces bilaterales *dniΔ* x *dniΔ*: ambos parentales carecen del gen *dni1⁺* o *dni2⁺*; como consecuencia, existirá un defecto en la fusión celular. La situación será similar para los cruces bilaterales *prm1Δ* x *prm1Δ*.
- Cruces unilaterales *dniΔ* x WT: En estos cruces se produce la fusión celular con una eficiencia alta debido a la presencia de la proteína DniP en uno de los parentales. La situación será análoga para los cruces unilaterales *prm1Δ* x WT.
- Cruces unilaterales *dniΔ* x *prm1Δ*: en este tipo de cruces podrían darse dos situaciones:
 - Si los genes *dni⁺* y *prm1⁺* actuaran en la misma ruta funcional, ésta se encontraría afectada en ambos parentales, aunque en distintos pasos de

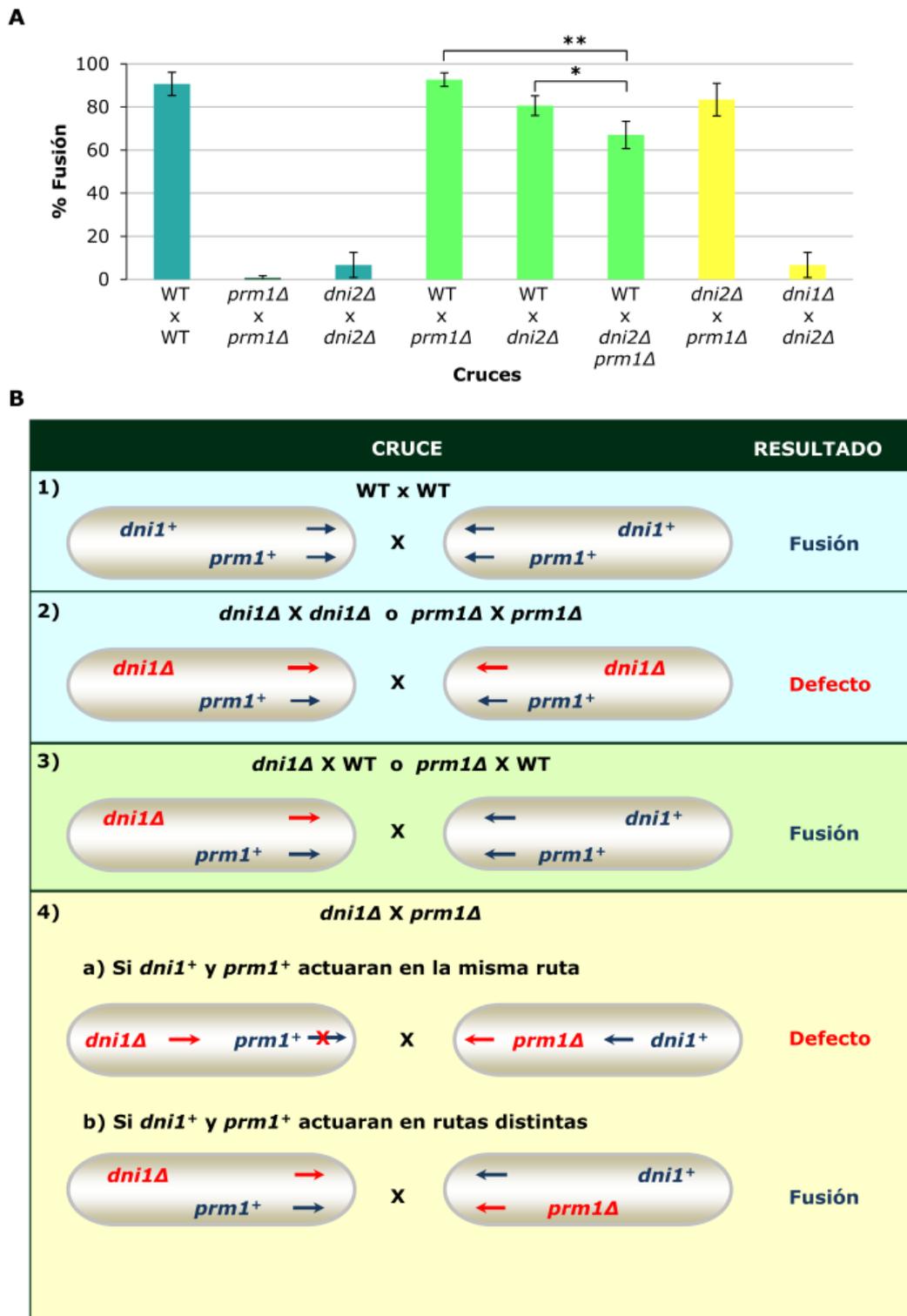


FIGURA 40:

Los genes *dni1*⁺ y *prm1*⁺ actúan en rutas funcionales diferentes. (A) Porcentaje de fusión obtenido de la mezcla de cultivos heterotáticos *h*⁺ y *h*⁻ de la delección de los genes indicados. La inducción de la conjugación se realizó en placas MM durante 3 días a 32°C. El color azul muestra los resultados de los cruces bilaterales utilizados como controles positivo (WT x WT) o negativo (*dni2*Δ x *dni2*Δ y *prm1*Δ x *prm1*Δ). Las barras verdes indican los resultados de los cruces unilaterales usados como controles (WT x *dni2*Δ y WT x *prm1*Δ). El color amarillo muestra el resultado de los cruces unilaterales *dni2*Δ x *prm1*Δ y *dni1*Δ x *dni2*Δ. Los experimentos se llevaron a cabo un mínimo de 3 veces con duplicados. Se muestran la media, la desviación estándar, y el nivel de significación estadística. Se señalan diferencias relevantes, donde * corresponde a p<0,05 y ** p<0,01. (B) Representación esquemática de los fundamentos del análisis de cruces unilaterales y bilaterales. Las flechas indican rutas necesarias para la fusión celular. El color azul señala que el gen o la ruta son funcionales y el color rojo hace referencia a que no lo son. El aspa roja indica que esa ruta no es funcional a pesar de que uno de los genes de los que depende sí lo es.

la misma. Por lo tanto, la situación sería similar a la de un cruce bilateral *dniΔ* x *dniΔ* o *prm1Δ* x *prm1Δ*; como consecuencia se produciría defecto en el proceso de fusión celular.

- En el caso de que los genes *dni*⁺ y *prm1*⁺ actuaran en distintas rutas funcionales, cada gen estaría presente en un parental y ausente en el otro. Por lo tanto, cada uno de los parentales carecería de la función de uno de los genes, que estaría presente en el otro parental (ver el panel 4 b del esquema). Es decir, estos cruces serían similares a los cruces unilaterales *dniΔ* x WT y *prm1Δ* x WT en los que la fusión celular es eficiente.

En la **figura 40B** se muestran los resultados obtenidos con el mutante *dni2Δ*. En la figura se puede observar que en los cruces WT x WT la frecuencia de fusión se encuentra en torno al 90%. Sin embargo, cuando se trata de los cruces bilaterales *dni2Δ* x *dni2Δ* y *prm1Δ* x *prm1Δ*, la frecuencia de fusión es inferior al 3%. Con respecto a los cruces unilaterales WT x *dni2Δ* y WT x *prm1Δ* se observa que el porcentaje de fusión es superior al 60%. Por su parte, en el cruce unilateral *dni2Δ* x *prm1Δ*, la frecuencia de fusión es también superior al 60%. Este resultado demuestra que los genes *dni2*⁺ y *prm1*⁺ actúan en rutas funcionales distintas. Además se puede comprobar que en el cruce unilateral WT x *dni2Δ* *prm1Δ*, aunque la eficiencia de fusión es alta, es significativamente inferior a la de cualquiera de los cruces unilaterales de los mutantes simples. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que ambos genes actúan en rutas funcionales distintas. Como control del experimento se añadió el cruce unilateral *dni1Δ* x *dni2Δ*; dado que se sabía que ambos genes actuaban en la misma ruta funcional (Clemente-Ramos et al., 2009) se esperaba una eficiencia de fusión reducida, y eso fue lo que obtuvo en el experimento.

Cuando el ensayo de cruces unilaterales y bilaterales se llevó a cabo cruzando *prm1Δ* con los mutantes *dni1Δ* o *fus1Δ*, otros mutantes de la ruta *dni*⁺ (Clemente-Ramos et al., 2009), se obtuvieron resultados similares a los mostrados para *dni2Δ*. Todos estos resultados están de acuerdo con *prm1*⁺ actúe en una ruta funcional distinta a la de los genes *dni*⁺.

A continuación se describen una serie de experimentos que se realizaron para intentar caracterizar en más detalle los fenotipos asociados a la pérdida de cada una de las rutas funcionales implicadas en la fusión celular durante la conjugación (la mediada por los genes *dni*⁺ y *fus1*⁺ y la mediada por *prm1*⁺). A priori los datos obtenidos podrían contribuir a intentar averiguar el papel de dichas rutas en el proceso de fusión celular.

5.2. Los mutantes *dni1Δ* y *prm1Δ* presentan sensibilidad a compuestos que interfieren con los lípidos de la membrana plasmática

Mediante microscopía electrónica se había detectado una fuerte desorganización de la membrana plasmática en la zona de contacto intercelular de los mutantes *dni1Δ* (Clemente-Ramos et al., 2009). En la sección 1.5. se ha descrito un fenotipo similar para el mutante *prm1Δ*. Además, en la sección 1.8. se ha evidenciado un comportamiento anómalo de la fosfatidilserina durante la conjugación en el mutante *prm1Δ*. Todos estos datos sugieren que las proteínas Dni1p, Dni2p y Prm1p pudieran tener alguna implicación en la organización, estructura o dinámica de la membrana plasmática. Con el fin de obtener más información acerca de la función de dichas proteínas en *S. pombe*, se trataron las cepas mutantes *dni1Δ* y *prm1Δ* con compuestos que interfieren de alguna manera con los lípidos de la membrana. Dado que en las secciones 1.1. se ha mostrado que los tres genes se expresan durante el crecimiento vegetativo, es posible que también pudieran estar regulando alguna de las propiedades de la membrana plasmática en esas condiciones. Por ello estos experimentos se llevaron a cabo tanto en condiciones de conjugación como durante el crecimiento vegetativo.

Cuando las estirpes WT, *dni1Δ* y *prm1Δ* procedentes de cultivos en fase exponencial se sembraron en placas de YES suplementadas con miconazol, una sustancia que inhibe la síntesis de esteroides (Launhardt et al., 1998), se encontró que *prm1Δ* era parcialmente sensible a esta droga (**figura 41A**). Con respecto a *dni1Δ*, su sensibilidad era intermedia entre la mostrada por la estirpe control y *prm1Δ*. Otro compuesto que afecta a las células a través de los esteroides es el complejo filipina. Se trata de un antibiótico de la familia de los polienos que interfiere con los esteroides de la membrana plasmática provocando su disrupción y por tanto la muerte celular (Van Leeuwen et al., 2008). Existen estudios que afirman que la filipina disrumpe los dominios ricos en esteroides y esfingolípidos denominados balsas lipídicas (Wachtler et al., 2003). Otros autores, sin embargo, mantienen que este antibiótico se une a esteroides libres de esfingolípidos (Jin et al., 2008). En cualquier caso, lo que es cierto es que el complejo filipina interfiere con el ergosterol de la membrana plasmática, y por tanto una sensibilidad a este antibiótico reflejaría defectos en la organización y/o cantidad de este lípido en la membrana. Cuando se incubaron en medio líquido células procedentes de cultivos en crecimiento exponencial en presencia de filipina se encontró que *dni1Δ* era parcialmente sensible (**figura 41B**). Por su parte, *prm1Δ* presentaba una sensibilidad intermedia entre las cepas WT y *dni1Δ*. Estos resultados sugieren que la cantidad u organización de los esteroides es defectuosa tanto en *dni1Δ* como en *prm1Δ*. Asimismo, confirman la presencia de Dni1p y Prm1p durante el crecimiento vegetativo, ya que su ausencia produce un fenotipo en estas condiciones. Por otro lado, ninguno de estos mutantes era sensible durante esta fase de crecimiento a miriocina (no mostrado). La miriocina es un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos (Arita et al., 2011).

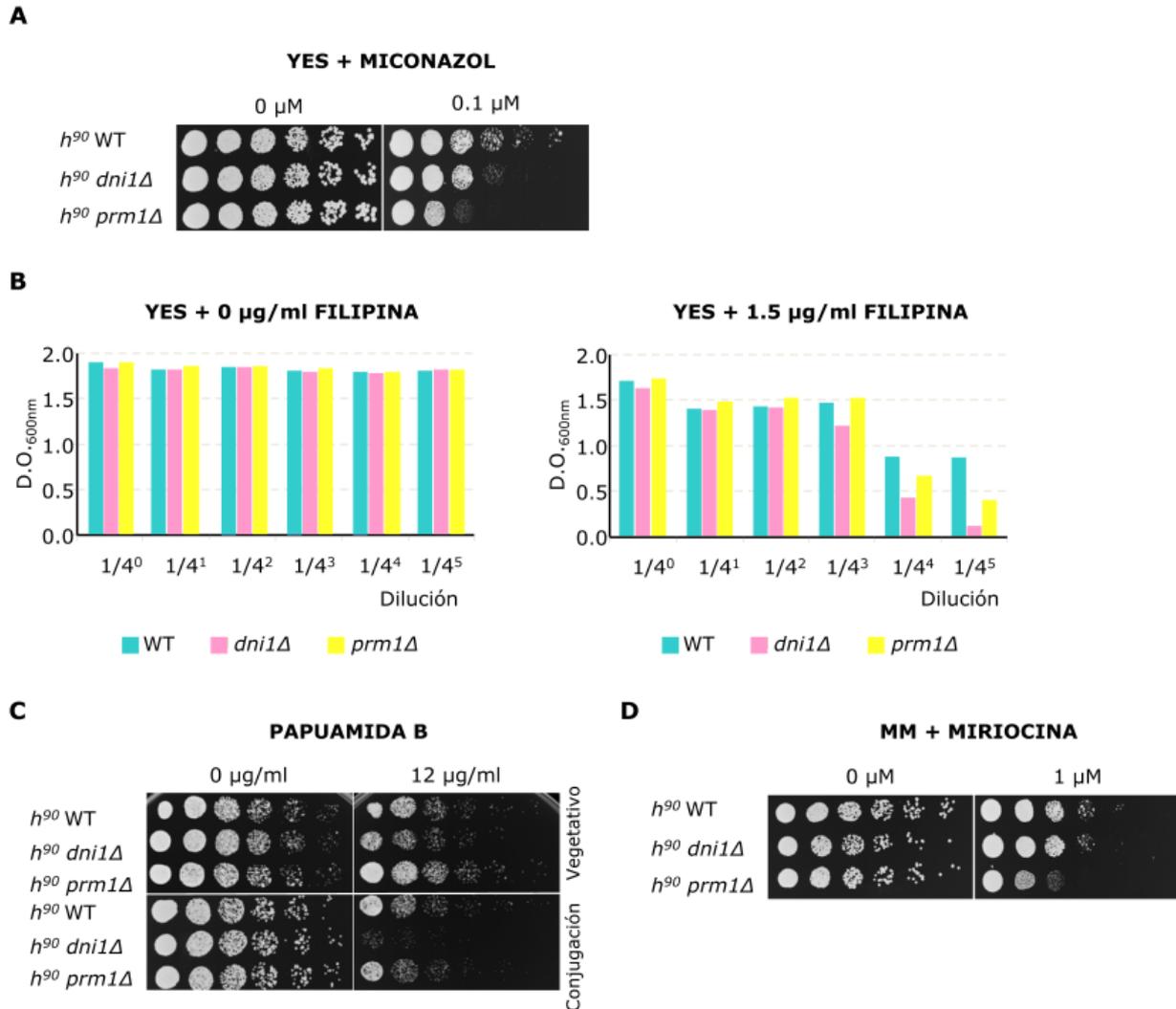


FIGURA 41:

Alteración de los lípidos de membrana en los mutantes *dni1Δ* y *prm1Δ*. (A) 3×10^4 células, y diluciones seriadas 1:4, procedentes de cultivos de las estirpes WT, *dni1Δ* o *prm1Δ* inoculadas en placas de YES suplementadas o no con el inhibidor de la síntesis de esteroides miconazol e incubadas durante 2 días a 32°C. (B) 3×10^4 células, y diluciones seriadas 1:4 de las mismas cepas que en A incubadas durante 2 días en medio líquido YES suplementado con el complejo filipina, un compuesto que disrumpe los esteroides de la membrana. El eje Y representa la DO_{600nm} de las diluciones de los cultivos indicados en el eje X. (C) Células de las estirpes indicadas tratadas con papuamida B (péptido que resulta citotóxico cuando interacciona con la fosfatidilserina si ésta se expone en la hemimembrana externa), durante 5 horas cuando crecían activamente en MM (crecimiento vegetativo) o habían iniciado la conjugación en MM-N. Se inocularon 3×10^4 células, y diluciones seriadas 1:4, en placas de YES que se incubaron durante 2 días a 32°C para evaluar la supervivencia celular. (D) 3×10^4 células, y diluciones seriadas 1:4 de las mismas estirpes inducidas a conjugación en MM-N, e inoculadas en placas de MM suplementadas o no con miriocina (un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos) e incubadas a 32°C durante 2 días. Los experimentos A-D se realizaron un mínimo de 3 veces con duplicados; se muestra un ejemplo representativo de cada uno de ellos.

Otros compuestos que se utilizaron en este experimento fueron duramicina y papuamida B. Se trata de péptidos citotóxicos que se unen respectivamente a fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS). Al añadirlos a un cultivo celular, únicamente pueden unirse al fosfolípido correspondiente si este se dispone en la cara externa de la membrana plasmática, induciéndose en ese caso la lisis celular como consecuencia de una desorganización de la membrana plasmática (Lopez-Marques et al., 2010). Normalmente

las flipasas mantienen dichos fosfolípidos en la hemimembrana interna; por lo tanto, un incremento en la sensibilidad a duramicina y papuamida B sería indicativo de un defecto en la organización de los fosfolípidos en la membrana plasmática. En este caso, se trataron con los citados péptidos citotóxicos células que crecían activamente en MM y células a las que se les indujo la conjugación con MM-N. Posteriormente ambos cultivos se plaquearon en YES para evaluar la supervivencia celular. En la **figura 41C** se puede observar que en los experimentos control, en los que las células únicamente se habían tratado con el solvente, todas las cepas crecen de forma similar tanto si el tratamiento se había realizado en cultivos que estaban creciendo vegetativamente como si se había llevado a cabo cuando habían entrado en el programa de conjugación. Este resultado indica que en estas condiciones la falta de fusión en los mutantes no provoca lisis celular. Cuando las células se habían expuesto a papuamida B, en *dni1Δ* se detecta cierta sensibilidad durante el crecimiento vegetativo. La sensibilidad aumenta cuando el péptido se había añadido en condiciones de conjugación. Este resultado sugiere que la membrana plasmática en *dni1Δ* podría presentar una mayor cantidad de PS expuesta hacia el exterior celular con respecto al WT, y que esta diferencia se haga más evidente durante la conjugación. Por otro lado, no se obtuvieron resultados reproducibles cuando *dni1Δ* se trató con duramicina, o cuando *prm1Δ* se trató con cualquiera de los dos péptidos citotóxicos.

Cuando se inducía la conjugación en las estipes *h⁹⁰* en MM-N y posteriormente se plaqueaban en MM suplementado con miriocina (un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos) de manera que las células que habían comenzado a conjugarse (y presumiblemente habían experimentado cambios en sus membranas) fueran expuestas a dicha droga, se percibió una ligera sensibilidad únicamente en *prm1Δ* (**figura 41D**). No obstante, bajo estas condiciones no fue posible detectar sensibilidad a miconazol en ninguno de los mutantes, lo que podría estar de acuerdo con la hipótesis de que la composición de la membrana pudiera ser diferente en condiciones de crecimiento vegetativo y conjugación.

Todos estos resultados sugieren que la composición y/o estructura de la membrana plasmática es diferente durante el crecimiento vegetativo y durante la conjugación. La sensibilidad de los mutantes *prm1Δ* y *dni1Δ* al complejo filipina, que interacciona con los esteroides de la membrana, y la sensibilidad del mutante *dni1Δ* a la papuamida B, que se une a la PS expuesta en la hemimembrana externa, sugiere que la distribución específica de los lípidos es defectuosa tanto en *prm1Δ* como en *dni1Δ*. El desequilibrio producido por una reducción en la síntesis de ergosterol y esfingolípidos por miconazol y miriocina podría potenciar estos defectos, resultando en una sensibilidad a dichos compuestos. Estos pequeños defectos en la composición lipídica tendrían un efecto mínimo durante el crecimiento vegetativo de los mutantes, pero resultarían catastróficos durante la conjugación. La hipótesis de que la composición de la membrana plasmática de las células de *S. pombe* es distinta durante el crecimiento vegetativo y la conjugación está de

acuerdo con lo descrito en *S. cerevisiae*, donde se ha visto que la membrana plasmática de la proyección del *shmoo* está más condensada que la del resto de la célula, y que los esfingolípidos son necesarios para dicha organización (Proszynski et al., 2006).

5.3. Efecto del calcio en el proceso de conjugación en distintos mutantes

La remodelación de la pared celular y la fusión de membranas son dos procesos que deben estar perfectamente regulados entre los dos *shmoos* para evitar la lisis celular. En el mutante *prm1Δ* de *S. cerevisiae* los prezigotos que no consiguen fusionarse sufren una lisis, dependiente de contacto, que se agrava si desciende la concentración externa de Ca^{2+} (Jin et al., 2004; Aguilar et al., 2007). También en *S. cerevisiae* se ha visto que el defecto en fusión celular de *fig1Δ* (carente de una proteína similar por secuencia a Dni1 y Dni2p) se corrige al aumentar la concentración de Ca^{2+} en el medio de cultivo (Muller et al., 2003). En *S. pombe* se ha descrito que un descenso en la concentración de Ca^{2+} extracelular no afecta la eficiencia de fusión ni provoca la lisis de los zigotos de las estirpes WT y *dni1Δ* (Clemente-Ramos et al., 2009). Con el fin de obtener una mayor información sobre la influencia del Ca^{2+} durante la fusión celular y la integridad en los zigotos en el mutante *prm1Δ* de *S. pombe*, se indujo la conjugación de las cepas WT, *dni2Δ*, *prm1Δ*, *dni2Δ prm1Δ* y *fus1Δ* en placas de MM con diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Para ello se preparó MM sin calcio (que contendría trazas del catión) al que no se añadió nada (MM- Ca^{2+}), o bien se añadió BAPTA (quelante de calcio intracelular) o EGTA (quelante de calcio extracelular), o se añadieron distintas concentraciones de calcio (100 μM y 100 mM).

Para valorar la lisis celular se indujo la conjugación en MM-N suplementado con las distintas concentraciones de Ca^{2+} . Tras 4 horas de incubación en dicho medio se realizó una tinción con azul de metileno para así visualizar la presencia de zigotos lisados. En ninguna de las condiciones analizadas el porcentaje de lisis fue mayor del 10% en ninguna de las estirpes. Este mismo resultado se obtuvo cuando las células se incubaron durante 24 horas en las mismas condiciones (datos no mostrados), lo que estaría indicando que la eliminación del Ca^{2+} no genera daños irreversibles ni en las membranas de los mutantes de la ruta *dni⁻-fus1⁺* ni en los de la ruta de *prm1⁺* durante la fusión celular.

También se evaluó el efecto del calcio en la eficiencia de fusión de las mismas estirpes. Para realizar este experimento las cepas se inocularon en placas de MM suplementadas con las diferentes concentraciones de Ca^{2+} y se incubaron durante dos días a 32°C, o durante cinco días a 22°C, para permitir la formación de las ascas. De esta forma se observó que en *dni2Δ* el defecto se suprimía parcialmente al aumentar considerablemente la concentración de Ca^{2+} extracelular (figura 42). Este resultado concordaba con lo descrito para *dni1Δ*, y estaría de acuerdo con que ambas proteínas actúen en la misma ruta funcional. Además, en la misma figura se observa que el descenso de la temperatura presenta un efecto aditivo al

incremento en la concentración de calcio en la mejora del defecto de conjugación de *dni2Δ*. Asimismo, el incremento de la eficiencia de fusión a baja temperatura y en presencia de calcio 100 mM también se observó (aunque de forma más ligera) en el mutante *fus1Δ*, que es defectivo en misma ruta funcional. Por su parte, en el mutante *prm1Δ* no se intuye influencia alguna del Ca^{2+} en a la fusión celular. El mutante doble *dni2Δ prm1Δ* presenta un comportamiento similar al de *prm1Δ*.

En *S. cerevisiae* los defectos en fusión de membranas y la lisis observada en los

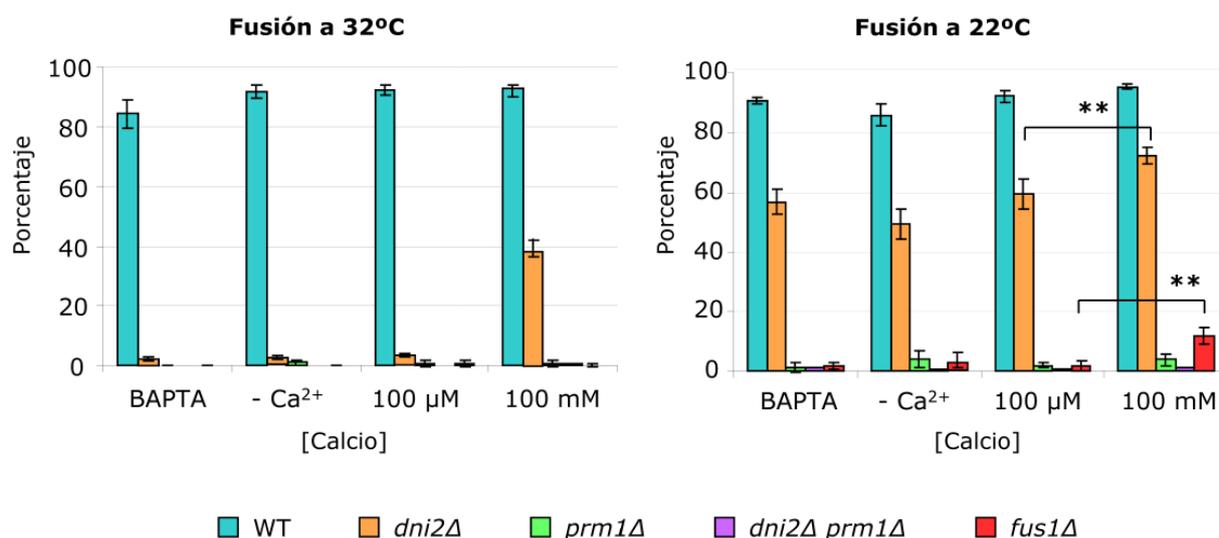


FIGURA 42:

Influencia del Ca^{2+} en la conjugación. Porcentaje de fusión de las estirpes *h⁹⁰* WT, *dni2Δ*, *prm1Δ*, *dni2Δ prm1Δ* y *fus1Δ* inducidas a conjugar en MM suplementado con el quelante de Ca^{2+} BAPTA (0,1 mM), sin el ion divalente (- Ca^{2+}), o con diferentes cantidades de calcio (100 μM o 100mM) e incubadas a distintas temperaturas. Los experimentos se llevaron a cabo un mínimo de 5 veces. Se muestran las medias, las desviaciones estándar y el nivel de significación estadística donde ** indica $p < 0,01$.

mutantes *prm1Δ* y *fig1Δ* parecen deberse a la desregulación de una fusasa. El Ca^{2+} podría jugar un papel directo en la fusión interaccionando con las cabezas de los lípidos de las bicapas opuestas o con las proteínas de la maquinaria de fusión. Sin embargo en *S. pombe* el efecto del Ca^{2+} no se ejercería favoreciendo una reparación de las membranas, o al menos no solo intervendría en ese proceso, ya que los prezigotos *dni1Δ* no presentan una lisis elevada. Dado que en ambos organismos la concentración de calcio que repara el defecto es muy elevada, es posible que lo que ocurra sea que se dispare un proceso de señalización que de alguna manera compense el defecto en la fusasa (Engel and Walter, 2008). En *S. pombe* la presencia de Ca^{2+} mejorar el defecto de los mutantes *dniΔ* pero no el de *prm1Δ*, a pesar de que en todos estos mutantes las paredes celulares permanecen sin degradarse. Esto podría deberse a diferencias específicas en los fenotipos de ambos mutantes, o indicar que el efecto del Ca^{2+} se ejerce a través de Prm1p en la levadura de fusión.

Todos estos resultados parecen indicar que, aunque las proteínas estudiadas intervengan en rutas funcionales diferentes, sus funciones son necesarias para garantizar una organización de la membrana plasmática que permita una fusión celular eficiente. Parece ser que ambas rutas participarían en esta organización de diferente manera, ya que responden de manera distinta a los compuestos que interfieren con los lípidos de la membrana plasmática y a la concentración de calcio extracelular. Sin embargo, la acción coordinada de las dos rutas es necesaria para que la fusión celular proceda de manera correcta.



Discusión

1. Prm1p y las proteínas Dni participan en dos rutas funcionales independientes necesarias para la remodelación de las envueltas celulares durante la fusión celular

En este trabajo se ha caracterizado la función de Prm1p y se ha profundizado en el estudio de Dni1p y de Dni2p. Los análisis genéticos han demostrado que *prm1*⁺ actúa en una ruta funcional distinta de la integrada por *dni1*⁺/*dni2*⁺/*fus1*⁺. Previamente se había descrito que el mutante *dni1Δ* presenta un defecto en la fusión celular (Clemente-Ramos et al., 2009) que se caracteriza por una desorganización masiva de las envueltas celulares: la pared celular, que constituye el equivalente de la matriz extracelular de las células de mamíferos, y la membrana plasmática. Además en algunos de los prezigotos es posible observar zonas donde la pared celular se ha degradado completamente y las membranas plasmáticas permanecen yuxtapuestas (ver el panel a de la **figura 4G**). En otros organismos éste es el fenotipo descrito para los mutantes *prm1Δ* (Heiman y Walter, 2000; Jin et al., 2004; Fleissner et al., 2009). Mientras que la ausencia del gen *FIG1* de *S. cerevisiae* (similar por secuencia a los genes *dni*⁺) se caracteriza por un defecto en la toma de calcio durante el desarrollo sexual, esta carencia no se produce en el mutante *dni1Δ* de *S. pombe* (Clemente-Ramos et al., 2009). Así, aunque distintos organismos han conservado la participación de todos estos genes en la fusión celular, la función específica de cada proteína podría diferir entre especies. Todas las proteínas de las familias Prm1 y Fig1/Dni contienen cuatro dominios transmembrana y se agrupan en microdominios de la membrana plasmática. Curiosamente, en organismos superiores las tetraspaninas (proteínas con cuatro hélices transmembrana que se agrupan en dominios específicos) juegan un papel relevante en el proceso de fertilización (Hemler, 2005; Sutovsky, 2009). Por lo tanto, el estudio de las proteínas Prm1 y Fig1/Dni en varios sistemas modelo puede ayudar a entender el proceso de fusión celular.

El análisis de los zigotos *prm1Δ* que expresan la forma soluble de la GFP sugiere que en este mutante se podrían generar burbujas/ampollas similares a las descritas para los mutantes *prm1Δ* de otros organismos (Heiman y Walter, 2000; Jin et al., 2004; Fleissner et al., 2009). Sin embargo la microscopía electrónica, los análisis de *time-lapse*, y el análisis de los planos z de imágenes revelan que su naturaleza es distinta. En *S. pombe* estas estructuras se forman en la membrana de uno de los *shmoos* sin necesidad, ni de que se degrade la pared celular ni de que intervenga la membrana del otro parental, que es lo que sucede en *S. cerevisiae* y *N. crassa* (Heiman y Walter, 2000; Jin et al., 2004; Fleissner et al., 2009). En el mutante *prm1Δ* de estos organismos, la pared celular se degrada y las membranas permanecen yuxtapuestas, de manera que el citoplasma de la célula que muestra mayor turgencia presiona las membranas y éstas invaden parte del citoplasma de la pareja; es posible que en ciertas circunstancias este contacto prolongado entre las dos membranas permita la fusión después de un tiempo, de manera que una posible participación de Prm1 en la fusión de membranas ya no fuera necesaria. Sin embargo en

los cigotos *prm1Δ* de *S. pombe* las burbujas aparecen rodeadas de pared celular, de modo que esta estructura no se degradaría en la zona de contacto intercelular y actuaría como una barrera física que impediría la fusión de membranas. La presencia de esta barrera explicaría que la eficiencia de fusión del mutante de *S. pombe* sea menor que la de los mutantes de otros organismos. En cualquier caso, y como se ha sugerido para *S. cerevisiae* y *N. crassa*, Prm1p tampoco estaría actuando como un fusógeno en *S. pombe*.

El hecho de que en el mutante *prm1Δ* de *S. pombe* se observe cómo la membrana plasmática de un *shmoo* se invagina hacia el interior celular mientras que la del otro *shmoo* permanece plana, sugiere que en aquel en el aparece la burbuja, la membrana plasmática se podría haber dissociado de la pared celular. Esta teoría está de acuerdo con el hecho de que se hubieran observado invaginaciones de la membrana plasmática en un 40% de los prezigotos, mientras que la GFP soluble sólo se detectó invadiendo parte del citoplasma del *shmoo* opuesto en un 11% de ellos, lo que indica que la invaginación de la membrana plasmática no siempre coexiste con la digestión de la pared celular. Esto también está de acuerdo con el desacoplamiento temporal entre la aparición de poros en la pared celular y de invaginaciones en la membrana que se observaron por *time-lapse*. Probablemente en la zona de fusión celular se generen fuerzas o tensiones que cambian cuando comienza la erosión de la pared. Si la membrana no permaneciera correctamente anclada a la pared celular, la membrana podría relajar la tensión generada mediante la formación de invaginaciones hacia el citoplasma de una de las células. Hay que mencionar que a día de hoy no se conoce cómo se asocia la membrana plasmática a la pared celular, salvo por la presencia de proteínas de membrana que se proyectan hacia el exterior celular; así, Prm1p podría interactuar con algunas proteínas de la pared celular ayudando a reforzar la unión entre las dos cubiertas celulares. La hipótesis de la disociación entre la membrana requiere que las fuerzas sean mayores que la presión de turgencia, que empujaría la membrana hacia la pared celular. Si la flexibilidad de la membrana estuviera alterada en los cigotos *prm1Δ*, es posible que ésta se plegara abruptamente hacia el interior del citoplasma y relajara esas fuerzas. Posteriormente la presión de turgencia podría empujar de nuevo la membrana hacia la pared celular; esto estaría de acuerdo con la observación de que las invaginaciones de la membrana sean retráctiles. Este fenómeno, por tanto, sería similar al descrito en cultivos celulares cuando las células se separan abruptamente de la superficie. En estas condiciones la membrana plasmática forma burbujas transitorias (Norman et al., 2010). Mientras que en las células de mamíferos las burbujas se forman hacia el exterior de la célula, en los cigotos de *prm1Δ* lo harían hacia el interior debido a la rigidez de la pared celular. La alteración de las tensiones en la zona de contacto entre los *shmoos prm1Δ* podría contribuir al defecto en la fusión celular.

Dado que membrana y pared celular se reorganizan durante la conjugación, no es de extrañar que exista algún tipo de comunicación, tanto entre ellas como entre

ellas y el interior celular, que garantice una remodelación coordinada y que evite la lisis celular. La diferencia de presión osmótica entre el citoplasma y el ambiente extracelular hace que la degradación de la pared celular y la fusión de las membranas sean tareas peligrosas. Si la pared celular se degradara en un lugar o en un momento equivocado, la membrana plasmática quedaría expuesta al ambiente hipotónico y la célula se lisaría (Philips y Herskowitz, 1997; de Nobel et al., 2000). De esta forma, la presencia de pared celular en los prezigotos *prm1Δ* de *S. pombe*, podría protegerlos de la lisis ante una situación de fusión celular ineficiente. Una alteración en la membrana de los mutantes podría afectar la comunicación entre la pared, la membrana y el interior celular. El hecho de que en los prezigotos *dni1Δ* y *prm1Δ* se observen crecimientos aberrantes de la pared hacia el interior celular, indica que en estos mutantes esta comunicación se ha alterado. Dado que Dni1p y Prm1p se sitúan en la membrana plasmática, cabe suponer que la señal se origine en dicha estructura o se transmita a través de ella. Esta señal es diferente de la que desencadena el desarrollo sexual, ya que la sobreexpresión del factor de transcripción Ste11p en los mutantes no suprime sus fenotipos (resultados no mostrados).

Es posible que en todos los organismos las proteínas de la familia Prm1 participen en la comunicación entre las envueltas y el interior celular, y en la coordinación de la remodelación de las envueltas. Sin embargo su ausencia parece tener consecuencias diferentes. En *S. cerevisiae* y *N. crassa* la degradación de la pared celular se vería favorecida, dando lugar a amplias zonas donde las membranas permanecen yuxtapuestas; como contrapartida, en estos zigotos la lisis es frecuente. En *S. pombe*, la balanza se inclinaría hacia la síntesis, conduciendo a un defecto de fusión severo, ausencia de lisis, e hipertrofia de la pared celular.

2. La ausencia de Prm1p y de las proteínas Dni podrían alterar algunas propiedades de la membrana plasmática en el microdominio de fusión

En *S. cerevisiae* tanto la cantidad de esteroides en la membrana plasmática como su distribución/organización en la misma son relevantes para la fusión celular (Bagnat y Simons, 2002; Proszynski et al., 2006; Jin et al., 2008; Aguilar et al., 2010; Grote, 2010). En células humanas se ha propuesto que un incremento de colesterol, que rebaja la fluidez de las membranas, inhibe la entrada del virus de la hepatitis C (Chamoun-Emanuelli et al., 2013). Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, las proteínas de las familias Prm1 y Fig1/Dni son integrales de membrana y se concentran en un microdominio de la membrana plasmática en la punta de los *shmoos*. La lisis dependiente de contacto en el mutante *prm1Δ* de *S. cerevisiae* no se remedia por sorbitol (Jin et al., 2004) y depende de la $[Ca^{2+}]$ (Aguilar et al., 2007). En *S. pombe* el alcance del defecto en fusión celular de los mutantes *dniΔ* depende de la temperatura (Clemente-Ramos et al., 2009).

Dado que el Ca^{2+} y la temperatura afectan a la fluidez de la membrana (Gordon et al., 1978) es posible que las proteínas Prm1 y Fig1/Dni influyan en el ambiente lipídico que las rodea en el microdominio, y de ese modo regulen la dinámica de la membrana durante la fusión y/o la activación del fusógeno. Fallos en estos aspectos contribuirían al defecto en fusión de los mutantes.

Asimismo el crecimiento alterado de los mutantes *prm1Δ* y *dniΔ* en presencia de compuestos que interfieren de algún modo con los lípidos sugiere que los citados mutantes pudieran presentar alguna alteración en la composición lipídica de la membrana plasmática. Se sabe que dentro de la membrana plasmática se produce una regulación mutua entre lípidos y proteínas transmembrana (Marsh, 2008). Así, tanto Prm1p como el complejo Dni1p/Dni2p podrían influir en distintos aspectos de la organización de los lípidos en el microdominio de fusión, de modo que la ausencia de estas proteínas afectaría a la función/actividad de otras proteínas transmembrana directamente involucradas en la fusión y/o el anclaje de la membrana a la pared celular. El defecto en fusión celular del mutante *erg6Δ* de *S. cerevisiae* (Jin et al., 2008) demuestra la relación entre un defecto en la composición lipídica de la membrana y un defecto en la fusión celular.

Los experimentos con la sonda LactC2-GFP sugieren que en la estirpe silvestre la fosfatidilserina (PS) se excluye de la monocapa interna de la membrana plasmática en la zona de contacto intercelular en los momentos previos a la fusión. Esto puede deberse a su translocación hacia la hemimembrana externa, su difusión dentro de la hemimembrana interna, o a que las flipasas que la introducen desde la monocapa externa dejen de funcionar. Esta reorganización de lípidos también ocurre en el mutante *dni1Δ*, pero no en *prm1Δ*, lo que sugiere que Prm1p es necesaria para esta modificación de la membrana. En células humanas la PS se expone al exterior en diversos procesos biológicos tales como la apoptosis, la activación de la cascada de coagulación y la maduración del esperma. Este cambio en la distribución de la PS podría ser consecuencia de una disminución de la actividad de las flipasas y un aumento de las scramblasas (Vance, 2008) durante estos procesos. Estudios *in vitro* con mioblastos de ratón sugieren que una exposición transitoria de la PS en la superficie externa podría ser importante para la fusión de estos tipos celulares (van den Eijnde et al., 2001; Jeong y Conboy, 2011). De manera similar, esta exposición de la PS parece ser importante para la fusión celular durante la conjugación en *S. pombe*. Se sabe que la composición lipídica afecta a propiedades biofísicas de la membrana como son la curvatura intrínseca, el grosor, la rigidez y la permeabilidad. También se sabe que la presencia de lípidos con carga negativa (como la PS), o con forma cónica (como la PE) promueven la fusión (Kinnunen y Holopainen, 2000). Por lo tanto, en el mutante *prm1Δ* el hecho de que no se produzca la modificación en la distribución de la PS podría alterar la curvatura/fluidez de la membrana, la acción de los fusógenos, o una señal de comunicación intercelular, impidiendo así la fusión. Es más, las burbujas retráctiles son más frecuentes en *prm1Δ* que en *dni1Δ*, lo que parece establecer una correlación entre estos dos fenotipos.

La miriocina entra en las células gracias a la acción de flipasas (Khakhina et al., 2015) y por ello se utiliza para monitorizar la actividad de estas proteínas (García-Marques et al., 2016). El mutante *prm1Δ* es sensible a este compuesto, lo que indicaría que las flipasas estarían introduciendo en la célula una mayor cantidad de miriocina que en una estirpe WT. Dado que la PS se mantiene en la cara interna por la acción de flipasas, una mayor actividad de estas proteínas explicaría tanto la sensibilidad al compuesto como la presencia de la PS en la hemimembrana interna del mutante antes de la fusión (Curto et al., 2014). El genoma de *S. cerevisiae* contiene al menos 5 flipasas (Catty et al., 1997), de las que tres sufren una relocalización durante la formación del *shmoo*, concentrándose en la punta del mismo (Sartorel et al., 2014). En *S. pombe* existen secuencias similares a algunas de ellas pero permanecen aún sin caracterizar. Es posible que Prm1p regule la actividad de las flipasas, o que medie una comunicación entre la pared celular y la membrana plasmática y esta comunicación genere algún tipo de señal que influya en la actividad de las flipasas.

3. Relación entre Dni1p, Dni2p y las claudinas

Dni1p y Dni2p están relacionadas estructuralmente con las proteínas de la familia Sur7, que se localizan en microdominios de membrana, regulan la organización espacial de la membrana plasmática y la distribución de fosfoinosítidos, y afectan la estabilidad de las proteínas en la membrana (Alvarez et al., 2008; Douglas et al., 2012; Wang et al., 2016). Además el crecimiento intracelular de la membrana plasmática y algunas estructuras en la zona de contacto intercelular de los mutantes *dniΔ* de *S. pombe* recuerdan a las observadas en el cuello madre-hija de las levaduras *sur7Δ* de *C. albicans* (Alvarez et al., 2008). A su vez todas estas proteínas comparten características estructurales con las claudinas, proteínas que compartimentalizan pequeñas regiones de la membrana plasmática actuando como barrera de difusión (Piontek et al., 2011). Finalmente, las secuencias de aminoácidos de Dni1p y Dni2p no predicen ninguna actividad enzimática, por lo que es posible que estas proteínas posean un papel estructural en la punta del *shmoo*, siendo necesarias para localizar o compartimentalizar un conjunto de lípidos que promuevan la correcta fluidez y/o curvatura necesarias para la fusión celular.

Tanto Dni1p como Dni2p están incluidas dentro de la familia de claudinas fúngicas (Clemente-Ramos et al., 2009) debido a su topología y a la presencia de una secuencia conservada en el primer lazo extracelular. En mamíferos existe cierta divergencia de secuencia dentro de las proteínas que integran esta familia, y sólo algunas de ellas se han estudiado en detalle (Gunzel y Yu, 2013; Krug et al., 2014). Aunque en invertebrados las uniones estrechas no son comunes, estos organismos presentan proteínas con secuencias similares a las de las claudinas. Sin embargo, esta similitud de secuencia es relativamente baja tanto entre especies como entre los miembros de una misma especie. Estas proteínas

de invertebrados forman parte de las denominadas uniones septadas que, aunque no son análogas a las uniones estrechas de cordados a nivel estructural ni establecen un contacto tan estrecho, también llevan a cabo una función de barrera en los epitelios. Otros invertebrados, como *C. elegans*, no poseen ni uniones estrechas ni uniones septadas, sino otras estructuras de contacto de membranas que comparten algunas características de las uniones estrechas y de las uniones septadas, y que también están integradas por proteínas con similitud a claudinas (Simske, 2013). Así, a parte de la presencia de ciertas características estructurales, es difícil establecer si una proteína es o no una claudina. Por todo esto, la mera similitud de secuencia y topología no son suficientes para afirmar ni para descartar con total seguridad, que Dni1p y Dni2p sean claudinas.

Los elementos estructurales que comparten con esta clase de proteínas no afectan a su función de la misma manera. En el caso de Dni1p el dominio C-terminal, aunque parece ser necesario para su endocitosis, característica que sí comparten las claudinas de metazoos (Lal-Nag y Morin, 2009; Gunzel y Yu, 2013), no es estrictamente necesario para su función. De igual modo, las cisteínas conservadas del primer lazo extracelular son dispensables, lo que podría descartar la idea de que Dni1p perteneciera a esa familia de proteínas. La eliminación de cualquiera de las cisteínas de Dni1p hace que Dni2p permanezca retenida en el RE, lo que podría indicar que Dni1p pudiera ayudar al plegamiento de Dni2p a través de estos residuos. Por otro lado la sobreexpresión de *dni1+* es letal y esta letalidad se pierde tanto si se mutan sus cisteínas como si se elimina Dni2p, lo que sugiere que Dni2p ayuda a Dni1p a alcanzar su conformación nativa, que es tóxica cuando aparece en un elevado número de copias. Estos datos sugieren que Dni1p y Dni2p colaboran mutuamente para su salida del RE. Una opción podría ser que ambas se ayudasen mutuamente a alcanzar el plegamiento correcto, actuando así como una especie de chaperonas. Esto supondría que el complejo Dni1p/Dni2p que se detectó por coinmunoprecipitación se formaría en el RE. Sin embargo es posible que existieran otras chaperonas que ayuden a Dni1p a alcanzar su configuración nativa y salir del RE, ya que al eliminar las cisteínas de Dni2p ésta pierde su funcionalidad y se reduce su capacidad de interactuar con Dni1p, y sin embargo Dni1p sí que sale del RE en esas condiciones. Otra opción sería que se ayuden a formar oligómeros (los datos del ensayo TOXCAT sugieren que estas proteínas son capaces de oligomerizar), quizás proporcionando un entorno adecuado para esta oligomerización. Finalmente, podrían colaborar en su secreción por algún otro mecanismo. Curiosamente, la proteína Nce102p de *S. cerevisiae* es una proteína tetraspán que se distribuye en microdominios de la membrana y que participa en un sistema de secreción de proteínas que carecen de un péptido señal clásico (Cleves et al., 1996).

Independientemente de que a nivel estructural Dni1p pertenezca o no a la familia de las claudinas, los resultados de este trabajo demuestran que Dni1p debe permanecer concentrada en la punta del *shmoo* para que la fusión celular tenga lugar de manera

eficiente. De este modo, Dni1p podría actuar como una claudina ayudando a que las membranas se acerquen y permanezcan muy próximas, prerrequisito para que tenga lugar la fusión de membranas. Además Dni1p podría facilitar el establecimiento de un estado de hemifusión de las membranas de manera análoga a lo que pudiera suceder en las uniones estrechas (Kachar y Reese, 1982; Lee et al., 2008) que podría evolucionar para producir la apertura de un poro. Este pequeño poro iniciaría la fusión celular y/o permitiría el paso de moléculas de señalización al interior celular. Esta hipótesis no es incompatible con un papel de Dni1p en el mantenimiento de una organización de la membrana que fuera adecuada para permitir la de fusión de las membranas plasmáticas, ya que la curvatura de la membrana es importante para que se genere la tensión necesaria para la expansión del poro de fusión (Kozlov et al., 2010). Por otro lado, existen dos modelos de expansión del poro de fusión: en el primero, el poro se dilata inmediatamente después de generarse permitiendo la fusión completa de las membranas; en el segundo, el poro de fusión se abre y se cierra (modelo *Kiss-and-run*). Parece ser que el equilibrio entre los dos modos controla la cinética de apertura (Bretou et al., 2014). Así, otra posibilidad es que Dni1p no medie la apertura inicial del poro sino que intervenga en su estabilización durante el proceso de fusión (como se ha propuesto para Prm1p de *S. cerevisiae*). La alteración de la dinámica de apertura y/o la estabilidad del poro conduciría a fallos en la fusión de las membranas.

Con respecto a Dni2p, la eliminación de las cisteínas conservadas conduce a una pérdida de función. Esto puede deberse a la alteración del plegamiento de la proteína, a su incapacidad de interactuar con Dni1p o con otras moléculas de Dni2p, o a su incapacidad de formar puentes disulfuro intramoleculares. En los trabajos publicados hasta la fecha se asume que en las claudinas de metazoos se establece un puente disulfuro entre las dos cisteínas de la misma molécula, aunque esto no se ha demostrado experimentalmente (Lal-Nag y Morin, 2009; Gunzel y Yu, 2013). Además el extremo C-terminal de Dni2p es necesario para su función. Estos hechos, junto a la mayor conservación del dominio del primer lazo extracelular, hacen que en este caso sí que se pueda hablar de Dni2p como una claudina fúngica, al menos a nivel estructural. Esto hace pensar que pueda estar relacionada funcionalmente con las claudinas de metazoos.

Las claudinas actúan como de barreras de difusión y median procesos de adhesión celular y formación de poros selectivos en el espacio extracelular. En este trabajo se ha demostrado que Dni2p es necesaria para que Dni1p permanezca concentrada en el microdominio de fusión y ejerza su función en la fusión celular. Así Dni2p podría actuar como una claudina actuando de barrera de difusión para Dni1p y ayudando a su compartimentalización en el microdominio de fusión. Otra hipótesis no excluyente sería que Dni2p favorezca un estado de hemifusión en la punta del *shmoo*, que impediría la difusión de Dni1p. En ambos supuestos, la acción de Dni2p sería funcionalmente similar a la de las claudinas. Además de ejercer como una barrera que evite la difusión de Dni1p, no

se debe descartar la idea de que Dni2p participe en la adhesión de las membranas de los dos *shmoos* o en el establecimiento y/o mantenimiento del poro de fusión.

4. Dni2p podría formar homo-oligómeros a través de motivos *small-xxx-small*

Los motivos *small-xxx-small* presentes en proteínas con varios dominios transmembrana pueden mediar tanto oligomerización de las mismas (pudiendo interactuar a través del mismo o de diferentes motivos transmembrana), como facilitar su plegamiento (Teese y Langosch, 2015). De hecho, a veces, el plegamiento de las proteínas de membrana puede dirigirse exclusivamente por las interacciones entre las DTMs (Schneider et al., 2007). Un motivo *small-xxx-small* media la interacción de la cuarta hélice de Dni2p consigo misma. Por otro lado, no se puede descartar que el motivo presente en el DTM3, e incluso los motivos de Dni1p, interactúen con los motivos de otras hélices, algo que no se puede comprobar por el ensayo TOXCAT. En este trabajo se ha propuesto que Dni1p y Dni2p podrían ayudarse mutuamente a alcanzar el plegamiento correcto, proceso que podría ocurrir a través de las cisteínas y/o de los motivos *small-xxx-small* de ambas proteínas. En el receptor EGF (*epidermal growth factor*), presente en la superficie de células de humanos, se han descrito dos motivos *small-xxx-small* independientes. Uno es necesario para homodimerización y el otro para heterooligomerización (Fink et al., 2011). En el caso de Dni2p, se ha visto que cuando se mutagenizan estos motivos, las versiones mutadas permanecen parcial o totalmente retenidas en el RE, lo que podría indicar problemas de oligomerización, pero también de plegamiento. En relación con esta idea, se ha propuesto la existencia de chaperonas transmembrana que ayudan al plegamiento de proteínas transmembrana. Estas chaperonas podrían servir de plataforma para permitir y mediar interacciones hélice-hélice específicas (Schneider et al., 2007). Como se ha mencionado, las propias Dni1p y Dni2p podrían ser o regular estas chaperonas.

Por otro lado, mediante el ensayo TOXCAT se ha observado que las hélices estudiadas de Dni1p y Dni2p muestran una interacción basal elevada, lo que podría señalar una tendencia a agregarse. Respecto a la relevancia biológica de esta oligomerización, habría varias posibilidades: i) Colaborar en la concentración de Dni1p y Dni2p en la punta de los *shmoos*; ii) Estabilizar las proteínas minimizando la interfase proteína-lípido; se ha sugerido que la formación de oligómeros altamente ordenados podría constituir pasos individuales del plegamiento durante la formación de las proteínas transmembrana (Schneider et al., 2007); iii) Modular la transmisión de una señal; los motivos *small-xxx-small* están conservados en receptores transmembrana acoplados a proteínas G de distintas especies, incluyendo levaduras, plantas y mamíferos (Lock et al., 2014). Por lo tanto, la oligomerización de Dni2p, una posible interacción entre Dni1p y Dni2, o incluso una interacción con otra proteína con motivos *small-xxx-small*, podría desencadenar una señal que permitiera la progresión de la

fusión celular; iv) Colaborar en la organización de la membrana; como se ha mencionado, el complejo Dni1p-Dni2p podría participar en la organización de la membrana plasmática en la zona de contacto intercelular. La oligomerización podría constituir un requisito para esta función. Una vez que la membrana presentara las características idóneas para la fusión celular, el complejo podría transmitir esta información a través de una interacción entre DTMs.

El motivo *small-xxx-small* más frecuente, y el que más se ha estudiado, es el integrado por dos glicinas (Senes et al., 2000). Sin embargo, no aparece como tal en las hélices ni de Dni1p ni de Dni2p. El DTM4 de Dni2p presenta dos motivos *small-xxx-small* encadenados, de los que el segundo está formado por glicina y serina. Este tipo de motivo aparece con una frecuencia un 14% mayor de lo esperado si la disposición de estos aminoácidos fuera al azar (Senes et al., 2000), lo que denota su implicación de alguna función biológica. El motivo doble *small-xxx-small* del DTM4 de Dni2p interviene en la interacción hélice-hélice; pero será necesario realizar más estudios para averiguar si el responsable de la interacción es el primer motivo, el segundo, o ambos. Por otro lado, es habitual que aparezcan residuos alifáticos con tendencia a formar láminas β en posición ± 1 o ± 2 de los residuos pequeños, lo que podría modular la flexibilidad de la hélice (Senes et al., 2000). En el caso del DTM4 de Dni2 (VAAAVFGWISS) aparecen en posiciones ± 2 valina e isoleucina. Aunque en alguno de los otros motivos *small-xxx-small* analizados aparecen también aminoácidos alifáticos, éstos no se disponen separados por tres aminoácidos, una distribución que suele aparecer en los DTMs con una frecuencia superior a la esperable por azar. Este patrón podría ser el que proporcione flexibilidad a la hélice (Senes et al., 2000). Es decir, parece ser que es frecuente la aparición de residuos pequeños en una cara de la hélice, que permitirían la interacción, y residuos formadores de láminas β en la otra cara, que estabilizarían dicha hélice.

Según las comparaciones de secuencias que se han realizado en este trabajo, la presencia de un motivo doble *small-xxx-small* en el DTM4, está conservada en las claudinas de mamíferos. Esta es una característica estructural, de la que no se habla en la literatura, que podría constituir una nueva propiedad de las claudinas. Aunque no todas las proteínas anotadas como "similares a claudinas" de otros organismos alejados evolutivamente lo presenten, hay que tener en cuenta que la mayoría se han incluido en la familia de las claudinas porque comparten topología, aunque la similitud de secuencias sea reducida. Por otro lado, también es cierto que en algunas de las claudinas predichas en mamíferos el motivo *small-xxx-small* es sencillo y no doble como el que se ha detectado en el DTM4 de Dni2p. Consecuentemente, sería necesario realizar más estudios para establecer si el motivo *small-xxx-small* del DTM4 de las claudinas podría constituir una propiedad característica de dicha familia de proteínas. Asimismo habría que estudiar el resto de motivos que, al menos en las claudinas humanas, aparecen también conservados en otros DTMs.

Aunque los motivos *small-xxx-small* han sido los más estudiados hasta la fecha, existen otros motivos que median la asociación de las hélices transmembrana, como polar-xx-polar o aromático-xx-aromático (Fink et al., 2011). En la hélice de la glicoforina A, utilizada como control del experimento, no se detectan ninguno de estos motivos. Sin embargo, la hélice 4 de Dni1p contiene un motivo polar-xx-polar intercalado con el motivo *small-xxx-small*. La mutación de los aminoácidos pequeños podría favorecer el efecto del motivo polar-xx-polar y por ello fomentar la interacción medida en el ensayo TOXCAT. Asimismo, la hélice 3 de Dni2p contiene un motivo polar-xx-polar alejado del motivo *small-xxx-small*. Dado que según los datos obtenidos mediante el ensayo TOXCAT el motivo *small-xxx-small* de la hélice 3 de Dni2p no parece ser responsable de la interacción, es posible que la interacción basal tan elevada sea consecuencia del motivo polar-xx-polar. Por otro lado, el motivo *small-xxx-small* de la hélice 4 de Dni2p favorece la interacción hélice-hélice. Sin embargo no es el responsable absoluto de la interacción, ya que al mutagenizarlo sigue quedado cierto nivel de interacción. Al analizar su secuencia aparece un motivo aromático-xx-aromático que pudiera ser responsable de esa asociación residual. Un ejemplo de colaboración de varios motivos en la interacción entre hélices transmembrana lo constituye Mam2p, el receptor de la feromona factor P de *S. pombe*, que además del motivo *small-xxx-small* contiene sitios adicionales de interacción hélice-hélice (Lock et al., 2014).

5. Compartimentalización de Dni1p en el microdominio de fusión

En este trabajo se ha demostrado que Dni1p debe permanecer concentrada en la punta del *shmoo* para que la fusión celular proceda eficientemente. Uno de los elementos que contribuyen a la compartimentalización de Dni1p es la actina. Muchas de las claudinas presentan en su extremo C-terminal un motivo de unión a motivos PDZ, mediante el cual interaccionan con proteínas que poseen tales dominios y que actúan como andamios que las conectan al citoesqueleto de actina (Gunzel y Yu, 2013). Se han descrito varios motivos consenso de unión a dominios PDZ, aunque existen dominios PDZ que no se unen a ninguno de ellos (Harris y Lim, 2001). Por esta razón, el hecho de que ni en Dni1p ni en Dni2p se hayan encontrado esos dominios, no significa a priori que ninguna de ellas lo porte. No obstante, en la base de datos no se ha anotado ninguna proteína con dominios PDZ que pudiera desarrollar esa función de andamio con la actina, lo que podría descartar que éste sea el mecanismo por el que la actina compartimentaliza a Dni1p. La endocitosis, aunque contribuye a la compartimentalización de Dni1p como lo hace con otras proteínas transmembrana (Trimble y Grinstein, 2015), no parece ser el mecanismo principal por el que la actina concentra a Dni1p en la punta del *shmoo*. Es posible que esta capacidad de la actina sea indirecta, al formar una barrera de difusión mediante su unión a otra(s) proteína(s) transmembrana en el microdominio de fusión (Fujiwara et al., 2002).

Cuando se elimina de forma conjunta a *dni2⁺* y a la actina, el *line-scan* mostraba que Dni1p permanecía más extendida por la membrana que en cualquiera de las dos situaciones por separado. Por lo tanto, parece que la ausencia de *dni2⁺* y de la actina podrían tener un efecto aditivo, y por tanto, ambos contribuirían a concentrar a Dni1p de distinta manera. De todas formas, hay que tener en cuenta que cuando se trataban las células silvestres con latrunculina A, Dni1p se encontraba inicialmente concentrada en la punta del *shmoo*; al añadir la droga Dni1p comienza a difundir desde esa zona. Sin embargo, cuando las estructuras de actina se despolimerizan en una estirpe *dni2Δ*, Dni1p jamás habría permanecido concentrada, y por ello la gráfica obtenida podría ser más plana, ya que es posible que en la estirpe silvestre Dni1p necesitara más tiempo para difundir totalmente desde el punto donde se ubicaba concentrada. Sin embargo, un tratamiento a tiempos más largos con latrunculina A complicaría la interpretación del resultado, ya que en esas condiciones se alterarían la secreción y otros procesos celulares dependientes de actina. Aun así, la gráfica es muy distinta de la obtenida para *dni2Δ*. Además, al comparar el *line-scan* de una cepa *dni2Δ* con el generado para los mutantes carentes del foco de fusión, el patrón continua siendo diferente, lo que indica nuevamente que la actina y Dni2p estarían actuando por mecanismos independientes para concentrar a Dni1p. De acuerdo con esta hipótesis, en células B de mamíferos se ha descrito la colaboración entre la actina y una tetraspanina en la concentración de un receptor de superficie en nanodominios con muy baja movilidad (Mattila et al., 2013).

El *Spitzenkörper* es una estructura característica de hongos filamentosos compuesta por una acumulación de vesículas, F-actina y ribosomas, situada muy próxima a la membrana apical de las hifas. Se ha propuesto que pudiera actuar como un centro organizador de actina que podría mediar la fusión de vesículas secretoras (que entre otras proteínas de secreción contienen enzimas de síntesis y degradación de la pared celular) en puntos específicos de la membrana plasmática (Berepiki et al., 2011). Esta estructura también contiene, forminas, miosinas de tipo V y tropomiosina. Además, los microtúbulos junto con los motores asociados son necesarios para la integridad del *Spitzenkörper* (Steinberg, 2007). En *S. cerevisiae* y *C. albicans* se ha propuesto la existencia de una estructura similar al *Spitzenkörper* en la punta de las prolongaciones de conjugación (Chapa et al., 2011). En mioblastos de *D. melanogaster* se ha descrito la formación de unas estructuras que invaden la célula con la que se van a fusionar y que en la punta de esas estructuras se dispone un foco de actina (Kim et al., 2015). Es posible que esta estructura sea similar al foco de fusión de *S. pombe* y que ambas estén relacionadas con los *Spitzenkörper*, pudiendo permanecer algunas de sus funciones conservadas a lo largo de la evolución. De manera similar a como sucede en el *Spitzenkörper*, es posible que al despolimerizar los microtúbulos se afecte la integridad del foco de fusión, de manera que Dni1p dejaría de permanecer eficientemente concentrada en la punta del *shmoo*, y por ello

se observen defectos en fusión celular en condiciones en las que estas estructuras están comprometidas.

En fusión de mioblastos de *D. melanogaster* se han detectado una acumulación de vesículas en la zona de contacto entre las células, que se ha propuesto que pudieran transportar las moléculas de adhesión y las proteínas fusogénicas a la membrana plasmática. Estas vesículas derivan del Golgi y se transportan a través de microtúbulos (Kim et al., 2015). Por lo tanto, una hipótesis alternativa, es que los microtúbulos fueran necesarios para el transporte de vesículas que contengan a Dni1p y/o Dni2p, aunque este tipo de transporte no se ha descrito a día de hoy en *S. pombe*.

El resultado del tratamiento con el complejo filipina demuestra que para que Dni1p se mantenga concentrada en el microdominio de fusión es necesaria una determinada organización de los esteroides en la membrana. El hecho de que varios mecanismos contribuyan a este mantenimiento podría constituir una estrategia para asegurar la localización de Dni1p, pero también podría deberse a que cada uno de los mecanismos participe en el proceso de manera diferente y regule, además, distintos aspectos de la función de la proteína. Las balsas lipídicas interactúan con proteínas en la membrana plasmática y por ello, además de participar en su localización, pueden modular su plegamiento, actividad y abundancia (Contreras et al., 2011). Por ejemplo, Nce102p se concentra en eisomas dependiendo de la disponibilidad de esfingolípidos y, a su vez, regula la señalización mediada por las quinasas Pkh dependientes de fosfoinosítidos; de esta manera su presencia en esos dominios de la membrana resulta en la regulación de una ruta de señalización. Por ello, es posible que los esteroides de la membrana, además de contribuir a concentrar a Dni1p en la punta del *shmoo*, contribuyan a que la proteína pueda adquirir la conformación correcta o a proporcionar un entorno adecuado para que promueva la fusión celular.

Los análisis de *line-scan* han mostrado que la ausencia de Dni2p y el tratamiento con filipina tienen efectos aditivos en la alteración de la concentración de Dni1p en el microdominio de fusión. Es más, el efecto con filipina y con latrunculina A sigue siendo menor al de la eliminación de Dni2p. Así, aunque la actina y la organización de las balsas lipídicas contribuyen a la compartimentalización de Dni1p, la función de Dni2p parece ser de una naturaleza distinta. En este sentido, no es extraño que una misma proteína mantenga varios tipos de interacciones para localizarse en una determinada ubicación dentro de la membrana plasmática. Así, en *S. cerevisiae* el complejo formado por Slm1p-Slm2p promueve la organización del citoesqueleto de actina, la homeostasis de esfingolípidos y el crecimiento celular. Estas proteínas se intercambian entre dos microdominios de la membrana plasmática; se ha propuesto que su ubicación en eisomas depende de interacciones lípido-proteína, mientras que su ubicación en microdominios ricos en TORC2 depende de interacciones proteína-proteína.

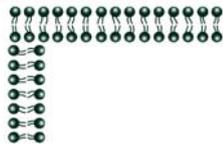
En este trabajo se ha observado que, aunque Dni1p y Dni2p son interdependientes para su localización, hay circunstancias en las que Dni1p permanece en el microdominio de fusión mientras que Dni2p se observa en el RE, y que la estabilidad de Dni2p en el punto de fusión es menor que la de Dni1p. En base a estas observaciones, se propone un modelo en el que Dni2p sería necesario para que Dni1p establezca un contacto inicial con alguna proteína/lípido que garantice su permanencia en un lugar determinado de la membrana plasmática. Sería durante este período cuando Dni2p se localizaría concentrada en la punta de los *shmoos*. Una vez que Dni1p ha contactado con los otros elementos que median su concentración, Dni2p sería dispensable y el microdominio enriquecido en Dni1p se mantendría gracias a la acción (directa o indirecta) del citoesqueleto de actina y de los esteroides.



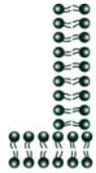
Conclusiones

El presente trabajo ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La proteína Prm1 de *S. pombe* es necesaria para la fusión celular durante la conjugación.
2. La proteína Prm1 se colocaliza con Dni1p en una región discreta de la membrana plasmática que se ha denominado "microdominio de fusión". Estas proteínas pertenecen a rutas funcionales independientes necesarias para que las envueltas celulares se remodelen correctamente para permitir fusión celular.
3. Durante el proceso de conjugación de *S. pombe* la fosfatidilserina de la membrana plasmática de la zona de contacto intercelular cambia de distribución. La proteína Prm1 es necesaria para que se produzca este cambio.
4. Las proteínas Dni1 y Dni2 forman un complejo y son interdependientes para su localización en el microdominio de fusión.
5. Los elementos estructurales que Dni2p comparte con las claudinas son necesarios para que la proteína lleve a cabo su función. Esto no ocurre en el caso de Dni1p.
6. La concentración de Dni1p en el microdominio de fusión es una condición necesaria para que la fusión celular tenga lugar. La proteína Dni2p, y una organización correcta de la actina del foco de fusión y de los esteroides de la membrana plasmática son necesarias para que Dni1p mantenga esa distribución.
7. Dni1p y Dni2p muestran alta tendencia de oligomerización a través de sus dominios transmembrana (DTM2 y DTM4 en Dni1p y DTM3 y DTM4 en el caso de Dni2p). Dni2p contiene un motivo *small-xxx-small* en su cuarta hélice transmembrana que favorece su oligomerización. Este motivo está conservado en la secuencia de las claudinas humanas.
8. La sobreexpresión de *dni1*⁺ induce la expansión del retículo endoplásmico y causa lisis celular. Para que tenga lugar esta lisis celular son necesarias las cisteínas del motivo conservado en claudinas y el extremo C-terminal de Dni1p, así como la presencia de Dni2p y de Ire1p.



Materiales y Métodos



1. MICROORGANISMO EMPLEADOS

En este trabajo se han utilizado dos microorganismos:

- La bacteria ***Escherichia coli*** se ha empleado en los trabajos rutinarios de clonación molecular. Se han utilizado diferentes cepas:
 - DH5 α : como hospedador habitual de los plásmidos utilizados.
 - DH10B: como hospedador de los plásmidos utilizados en el ensayo TOXCAT, debido a su menor frecuencia de recombinación.
 - CJ236: para los experimentos de mutagénesis dirigida *in vitro*.
 - MM39: se ha usado en el ensayo TOXCAT.

En la **tabla III** (Anexo) se recogen las características genéticas y la procedencia de las citadas estirpes. Las diferentes cepas de *E. coli* se conservan en viales con glicerol al 50% que se mantienen a una temperatura de -80°C.

La mayor parte de este trabajo se ha realizado con la levadura de fisión ***Shizosaccharomyces pombe***. Las cepas de *S. pombe* se conservan en glicerol al 30% a una temperatura de -80°C.

En la **tabla IV** (Anexo) se detallan las cepas empleadas en el presente trabajo, sus características genéticas y su procedencia.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada (Milli-RO), a excepción del medio mínimo sin nitrógeno (MM-N), que se elaboró con agua destilada y desionizada (Milli-Q). Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave. La selección y/o cultivo de cepas auxótrofas o resistentes a antibióticos se realizó añadiendo a los medios de cultivo los suplementos o antibióticos necesarios.

Se utilizaron medios de cultivo líquidos y sólidos. Los cultivos en medios líquidos se incubaron en matraces Erlenmeyer con una agitación de 250 rpm. El crecimiento se controló determinando la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro. Por estudios previos realizados en nuestro laboratorio sabemos que una $D.O._{600} = 1,0$ es equivalente a 1×10^7 células/ml. Los medios de cultivo sólidos se prepararon añadiendo agar al 2%. Estos cultivos se incubaron en placas Petri.

La temperatura de incubación de los cultivos fue de 37°C para *E. coli* y de 25°C, 28°C, 32°C o 37°C para *S. pombe*, según los experimentos.

2.1. Crecimiento de *Escherichia coli*

Para cultivar las estirpes de *E. coli* se utilizaron los siguientes medios:

LB (Luria Bertani)

- 1% Bactotripton
- 0,5 % Extracto de levadura
- 1% NaCl

2xYT

- 1,6 % Bactotripton
- 1 % Extracto de levadura
- 0,5% NaCl

Medio mínimo M9 + Maltosa

- 20% Sales M9 (6,4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5% KH_2PO_4 , 0,25% NaCl, 0,5% NH_4Cl)
- 0,024% MgSO_4
- 0,001% CaCl_2
- 0,4% Maltosa

La resistencia a antibióticos se analizó suplementando estos medios con ampicilina (Roche) a 100 $\mu\text{g/ml}$, kanamicina (Formedium) a 50 $\mu\text{g/ml}$ o estreptomina (Sigma) a 25 $\mu\text{g/ml}$. En la **tabla V** (Anexo) se detalla la concentración y la procedencia de todas las soluciones stock que se han utilizado en este trabajo

2.2. Crecimiento *Schizosaccharomyces pombe*

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* han sido los descritos previamente (Moreno et al., 1991; <http://biotwiki.org/foswiki/bin/view/Pombe/NurseLabManual>). A continuación se detalla la composición de los medios que se han utilizado para la realización de los diferentes experimentos.

2.2.1. Crecimiento vegetativo

Los medios usados para el crecimiento vegetativo de esta levadura fueron:

YES (Yeast-extracts with supplements). Se trata de un medio rico

- 0,5% Extracto de levadura
- 3% Glucosa
- 0,025% Leucina
- 0,025% Uracilo
- 0,025% Adenina
- 0,025% Histidina
- 0,025% Lisina

MM (Medio mínimo)

- 0,5% Biftalato de Potasio
- 2% Glucosa
- 0,22% Na_2HPO_4
- 0,5 % NH_4Cl
- Sales, vitaminas y minerales de acuerdo con lo especificado previamente (Moreno et al., 1991)

Para la selección cepas con determinadas auxotrofías, o transformadas con plásmidos, el MM se suplementó con 225 mg/l de uracilo, leucina, adenina o histidina, según fuera necesario. Cuando fue pertinente, el medio YES se suplementó con geneticina (G418, de Formedium) a una concentración final de 120 $\mu\text{g/ml}$ y/o nourseothricina (cloNat, de WERNER BioAgents) a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$.

En el caso del mutante *prm1 Δ* , el medio mínimo se suplementó además con 0,025% de lisina. Esta necesidad fue consecuencia de la pérdida parcial del gen *lys1⁺*, que codifica una enzima necesaria para la síntesis de este aminoácido, producida al delecionar la ORF (fase de lectura abierta) de *prm1⁺* debido al solapamiento de ambas ORFs en el genoma.

2.2.2. Conjugación y esporulación

Inducción de la conjugación:

MM-N (Medio mínimo sin nitrógeno)

- 0,3% Biftalato de Potasio
- 2% Glucosa
- 0,22% Na_2HPO_4
- Sales, vitaminas y minerales de acuerdo con lo especificado previamente (Moreno et al., 1991)
- Agua milli-Q

Este medio siempre se utilizó para inducir la conjugación en cultivos líquidos, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

Desde un cultivo inoculado el día anterior en medio sólido se sembró una pequeña cantidad de células en medio rico YES, que se incubó durante unas 8-10 horas a 28°C. A continuación las células se reinocularon a una D.O.₆₀₀ = 0,06 en MM con los suplementos necesarios y se incubaron durante toda la noche a 28°C. En el caso en que la cepa fuera termosensible, el cultivo se reinoculó a D.O.₆₀₀ = 0,15 y se mantuvo en todo momento a 25°C. Cuando no se disponía de una estirpe *h⁹⁰* con las características de interés, fue necesario mezclar dos cantidades iguales de cultivos *h⁺* y *h⁻* en el momento de transferir las células desde medio YES a MM. En todos los casos, el cultivo se reinoculó nuevamente

al día siguiente para que a la hora de comenzar la inducción de la conjugación las células estuvieran creciendo en fase logarítmica (una $D.O._{600} \sim 0,8-1$). En este momento se realizaron tres lavados del cultivo con agua ultrapura milli-Q y se resuspendieron en MM-N preparado con agua ultrapura milli-Q en un volumen de medio 2/3 del volumen inicial. Para facilitar la aireación del cultivo la incubación se realizó en un matraz Erlenmeyer, en el que el cultivo constituía 1/10 del volumen del matraz, y con una agitación de 70 rpm, que permite el contacto entre las células que van a conjugarse. Las muestras para los experimentos se tomaron al cabo de 3,5 horas de incubación a 26°C, o de 2 horas a 32°C (según los requerimientos del experimento), tiempo en que se podía observar una proporción razonable de células en conjugación. De todos los protocolos probados para inducir la conjugación, éste fue el que garantizó una mayor sincronización del proceso de conjugación en los cultivos, por lo que fue el que se utilizó rutinariamente para estudios de microscopía y de *Western-blot*.

MM COMPLETO DE CONJUGACIÓN

Se trata de un medio similar al MM descrito para el crecimiento vegetativo, pero que contiene la mitad de los suplementos (adenina, uracilo, lisina, leucina e histidina). Este medio siempre se utilizó sólido.

Para inducir la conjugación las cepas de interés se transfirieron a MM completo de conjugación desde una placa de YES que había sido inoculada el día anterior, y se incubaron a 32°C unas 9 horas, o a 25°C unas 15 horas. Este protocolo se utilizó para realizar cruces genéticos, para obtener cepas con características de interés. También se utilizó para estimar la eficiencia de conjugación al cabo de tiempos largos de incubación (ver más adelante).

Inducción de la formación de shmoos:

Para algunos experimentos interesó obtener un gran número de *shmoos* de manera sincronizada, sin que entraran en contacto con *shmoos* de tipo sexual opuesto. Para estos experimentos se utilizaron cepas carentes de los genes *cyr1⁺* (la adenilato ciclasa, interviene en la ruta de señalización del desarrollo sexual. Davey, 1998) y *sxa2⁺* (la proteasa que degrada el factor P. Imai and Yamamoto, 1994). La delección de *cyr1⁺* hace que las células sean capaces de diferenciar *shmoos* en medios que contienen nitrógeno (Stern and Nurse, 1997), mientras que la de *sxa2⁺* permite que sean hipersensibles a feromonas. En los experimentos se utilizó un preinóculo de una estirpe *h⁻* que había crecido durante toda la noche en MM. Al día siguiente el cultivo se reinoculó en el mismo medio a $D.O._{600} = 1$ y se incubó durante dos horas a 28°C. A continuación se añadió la feromona factor P a una concentración final de 1,5 µg/ml. Para realizar los experimentos, las muestras se tomaron tras una incubación de 3h a 25°C, momento en el que ya se podía observar un número razonable de *shmoos* en estadios tempranos.

Estimación de la eficiencia de conjugación y esporulación:

Los medios utilizados fueron:

MM COMPLETO DE CONJUGACIÓN

Se trata del mismo empleado para la inducción de la conjugación, especificado en la sección anterior. Este medio es el que se utilizó para los experimentos rutinarios.

MM COMPLETO DE CONJUGACION + SORBITOL

Medio similar al anterior suplementado con el estabilizador osmótico sorbitol a una concentración final de 1,2 M. Este medio se utilizó con el fin de reducir la presión osmótica extracelular, y así averiguar si los fenotipos que se habían observado previamente eran una consecuencia de problemas en la pared celular, estructura que protege a las células de la presión osmótica de forma natural.

MEA (Medio agar extracto de malta)

- 3% Extracto de malta
- 0,023% Suplementos: leucina, adenina, histidina y uracilo

SPA (Medio agar de esporulación)

- 1% Glucosa
- 7,3 mM KH_2PO_4
- Vitaminas de acuerdo con lo especificado (Moreno et al., 1991)

Las condiciones de cultivo en todos los medios fueron similares:

Si se trataba de cruces entre cepas heterotálicas (h^+ y h^-) se tomaron 10^7 células de cada una de las dos estirpes parentales (procedentes de cultivos creciendo en medio rico líquido en fase logarítmica de crecimiento), se centrifugaron y se inocularon en placas de medio MM de conjugación. En aquellos casos en los que se utilizaron cepas homotálicas (h^{90}), se realizó una réplica desde cultivos en placas de medio YES, incubados durante toda la noche, a placas de MM de conjugación. Estas placas se incubaron a 32°C durante 2 días, o a 21°C durante 4 días, para que tuvieran lugar la conjugación y la esporulación. En estas condiciones, el cálculo de la eficiencia de conjugación se realizaba a tiempo final.

Los cálculos para estimar la eficiencia fueron:

- La eficiencia de conjugación se calculó como el número de prezigotos más zigotos más ascas, respecto al número de células totales (prezigotos, zigotos, ascas y células vegetativas).
- La eficiencia de fusión se calculó como el número de zigotos más ascas respecto al número de prezigotos más zigotos más ascas. Este parámetro se usó como medida indirecta de la fusión celular.

Aislamiento de ascosporas al azar:

Para la realización de cruces genéticos dirigidos a obtener una progenie con las características genéticas necesarias, se mezclaron aproximadamente igual cantidad de células de las estirpes parentales de interés en placas de MM de conjugación, y se incubaron a 32°C durante 2 días (o a 25°C durante 4 días cuando los mutantes presentaban problemas en conjugación), para que tuviera lugar la esporulación. En el caso de que uno de los parentales fuera una cepa homotática h^{90} y el otro una cepa heterotática h^+ o h^- , se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero la cantidad de células tomadas de la cepa h^{90} fue menor que la cantidad de células de la cepa heterotática, para así disminuir la probabilidad de que conjugasen células de la cepa homotática entre sí.

Una vez que en el cultivo se observó la presencia de ascas maduras (refringentes a la luz), se tomó una pequeña muestra del cultivo que se resuspendió en 1 ml de agua, al que se añadieron 5 μ l de β -glucuronidasa/arilsulfatasa (Roche). La mezcla se incubó a temperatura ambiente en agitación, durante 15 horas aproximadamente, para facilitar la digestión de la pared celular del asca y la liberación de las esporas. Pasado este tiempo se contó el número de esporas/ml y se hicieron diluciones, de modo que se sembraron entre 300 y 500 esporas en una placa de medio YES. Las colonias obtenidas se analizaron seleccionando aquellas que portaban el genotipo de interés mediante la utilización de medios selectivos, análisis por PCR u observación al microscopio.

2.2.3. Condiciones especiales de crecimiento

Medios con diferente concentración de calcio:

Para estudiar la influencia del Ca^{2+} en la conjugación de diferentes estirpes se preparó un MM sin calcio eliminando el $CaCl_2$ de los minerales, y reemplazando el pantoneato de calcio de las vitaminas por pantoneato de sodio. Posteriormente se añadieron las cantidades de $CaCl_2$ necesarias para obtener las concentraciones finales de Ca^{2+} deseadas (100 μ M y 100 mM). Si lo que se pretendía era eliminar todo el Ca^{2+} del medio, al MM sin calcio se le añadieron los quelantes BAPTA (0,1 mM) o EGTA (10 mM).

Medios suplementados con compuestos que interfieren con los lípidos de la membrana:

En algunos experimentos interesó analizar el comportamiento de diferentes estirpes cuando se modifica la composición de su membrana plasmática. Para este análisis se estudió el crecimiento de las mismas, suplementando el medio de cultivo con los siguientes compuestos:

- **Miconazol:** inhibidor de la síntesis de esteroides (Launhardt et al., 1998). Se añadió a concentraciones finales entre 0,5 μ M y 1 μ M. El análisis se realizó siempre en medio sólido.

- **Complejo Filipina:** es un antibiótico de la familia de los polienos que interfiere con los esteroides de la membrana plasmática, provocando su disrupción y por tanto la muerte celular (Van Leeuwen et al., 2008). Para analizar la sensibilidad a este antibiótico, se recogieron células de un preinóculo en fase logarítmica por centrifugación y se resuspendieron en medio líquido que contenía el complejo Filipina a concentraciones entre 1,25 µg/ml y 1,75 µg/ml. Se realizaron diluciones seriadas 1:4 en placas microtiter con el mismo medio, de manera que se diluían las células pero no la concentración del compuesto, y se monitorizó la D.O.₆₀₀ del cultivo a lo largo de 48 horas utilizando un espectrofotómetro de placas (Multiskan Ascent, Thermo).
- **Miriocina:** inhibe la síntesis de esfingolípidos (Arita et al., 2011). Se añadió al medio a concentraciones entre 1 µM y 2,5 µM. El análisis se llevó a cabo siempre en medio sólido.
- **Duramicina:** péptido que al unirse a la fosfatidiletanolamina (PE) en la hemimembrana externa resulta citotóxico (Lopez-Marques et al., 2010). Se añadió a una concentración 90 µg/ml a cultivos de cepas *h⁹⁰* dos horas después de proceder a inducir la conjugación en MM-N. Para estudiar la viabilidad de los cultivos, estos se plaquearon en YES en diluciones seriadas 1:4 a las 2, 3 y 5 horas de tratamiento con el compuesto.
- **Papuamida B:** péptido citotóxico que reconoce a la fosfatidilserina (PS) (Lopez-Marques et al., 2010). Se utilizó a 12 µg/ml de manera similar a lo descrito para la Duramicina.

Medio mínimo con tiamina (MM+Ti):

Este medio se utilizó cuando las cepas portaban un plásmido con un promotor del gen *nmt1⁺* (*no message in thiamine*), y se quería reprimir la expresión del gen que se encontraba bajo el control de dicho promotor. Las placas de MM se suplementaron con 20 µg/ml de tiamina.

3. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Vectores utilizados

3.1.1. Vectores de *E. coli*

pBluescript KS⁺ (Stratagene): Se trata de un plásmido autoreplicativo de 2958 pares de bases (pb) que lleva incluido el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación ColE1 y un fragmento del operón lac de *E. coli* que codifica la enzima β-galactosidasa.

Dispone de un sitio de clonación múltiple, en el que aparecen 21 sitios únicos de restricción, que permiten la selección de clones recombinantes por α -complementación de cepas de *E. coli* portadoras de la delección lacZ M15. Flanqueando los sitios de restricción únicos se encuentran los promotores de las ADN polimerasas T3 y T7, que se utilizan para la síntesis de ARN *in vitro*. También contiene el origen de replicación f1 que permite la obtención de ADN monocatenario tras infección de las células portadoras del plásmido con el fago auxiliar M13K07.

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

pccKAN (Russ and Engelman, 1999): Se trata de un plásmido de 7360 pb que contiene el dominio N-terminal (ToxR') del factor de transcripción dependiente de dimerización ToxR de *Vibrio cholerae* bajo el control del promotor constitutivo *ToxR*, fusionado al dominio C-terminal de la proteína de unión a maltosa (MBP). Esta es una proteína monomérica del espacio periplásmico de *E. coli* que forma parte del sistema de toma de maltosa, actuando en el reconocimiento de este disacárido y de maltodextrinas (Boos and Shuman, 1998). Estas dos secuencias se encuentran unidas por un fragmento de ADN que contiene los sitios reconocidos por las enzimas de restricción *Bam*HI (también reconocido por *Dpn*I) y *Nhe*I que permiten la clonación de fragmentos transmembrana flaqueados por dichas secuencias. Además presenta el gen reportero cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) bajo el control del promotor *ctx*. ToxR' es responsable de la activación transcripcional de los genes que se encuentran bajo el control del promotor *ctx* (Kolmar et al., 1995). También contiene el gen de resistencia a ampicilina para su selección.

3.1.2. Vectores de *S. pombe*

Estos plásmidos poseen una serie de características comunes que consisten en la presencia de un origen de replicación, un marcador de selección bacteriano (el gen de resistencia a un antibiótico, que en el caso de los utilizados en este trabajo se trata del gen de resistencia a ampicilina) y un marcador de selección en levaduras (generalmente un marcador metabólico). Los plásmidos multicopia portan una secuencia de replicación autónoma (ARS), mientras que los plásmidos integrativos no la contienen, por tanto, la forma de mantener estos últimos plásmidos en la célula es integrarlos en su cromosoma.

Para ello es necesario linearizarlos mediante la digestión con una enzima de restricción, lo que permitirá que se integre de una manera estable en el genoma de *S. pombe* por recombinación homóloga.

pAL-KS⁺ (J.Ishiguro, Konan University, Japón): es un plásmido multicopia para *S. pombe* de 6300 pb obtenido a partir del vector pBluescript KS⁺, al que se añadió la secuencia de replicación autónoma *ars1⁺*, que aumenta la frecuencia de transformación y reduce el número de copias del plásmido. Lleva el marcador de selección *LEU2* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *leu1-32⁻* de *S. pombe*.

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

pREP 3X (Maundrell, 1993): plásmido multicopia construido a partir del vector de *E. coli* PUC119 añadiendo el marcador *LEU2* que permite complementar la mutación *leu1-32* de *S. pombe*. Su característica más destacable es que porta el promotor *nmt1⁺* reprimible por tiamina fusionado a un sitio de clonación múltiple (*XhoI/SalI/BamHI/SmaI*), lo que permite la sobreexpresión de los genes clonados cuando las células se incuban en un medio carente de tiamina. Existen otras variaciones que presentan los marcadores de selección *ura4⁺* e *his3⁺* que complementan las mutaciones *ura4-Δ18* e *his3-Δ1* respectivamente (Moreno et al., 2000).

pJK148 (McLeod et al., 1987): Vector integrativo de 5343 pb. Posee un sitio de clonación múltiple, el gen *leu1⁺* como marcador de selección en levaduras, el gen de resistencia a ampicilina, un fragmento del operón lac de *E. coli* y el origen de replicación ColE1 de *E. coli*.

3.2. Técnicas generales de manipulación de ADN

Todos los protocolos utilizados para la manipulación del ADN (tratamientos con enzimas de restricción, obtención de ADN, electroforesis de ADN, etc.) se recogen en el manual escrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989). Además de las indicaciones generales de este manual de laboratorio, se tuvieron en cuenta las especificaciones de las casas comerciales suministradoras del material.

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o por tratamiento con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Hispanlab) elaborados a distintas concentraciones (entre 0,7% y 2% de agarosa), según el tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon con tampón TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM) al que se le añadió bromuro de etidio (Bio-Rad) a una concentración final de 0,5 µg/ml.

Para separar y aislar bandas de ADN, que posteriormente se utilizaron en reacciones de ligación, se utilizó un kit comercial (NucleoSpin). Las ligaciones de los fragmentos de ADN purificados se llevaron a cabo utilizando la enzima ligasa del fago T4 (Fermentas) e incubando la mezcla de ligación a 16°C de 12-16 horas. Esta mezcla de ligación se utilizó directamente para transformar *E. coli*.

3.3. Obtención de ADN

Para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*, de manera rápida y a pequeña escala (mini-preps), se empleó el método de rotura alcalina descrito anteriormente (Zhou et al., 1990). Las células se lisan por adición de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS), precipitándose finalmente el ADN por la adición de isopropanol y sales. En algunos casos, cuando interesó la obtención de mayor cantidad de ADN plasmídico y de mayor pureza, se empleó un kit comercial (QIAprep® Spin Miniprep Kit).

La extracción de ADN plasmídico y genómico de *S. pombe* se realizó por diferentes procedimientos siguiendo los protocolos descritos anteriormente (Moreno et al., 1991; Sambrook et al., 1989).

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se realizó en el termociclador MyCycler™ (BioRad) utilizando en la mezcla de reacción (de 20 µl, volumen final) 2 µl del ADN usado como molde, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a una concentración final de 0,2 mM cada uno, los oligonucleótidos utilizados como cebadores a 1 µM, MgCl₂ a 3 mM, 0,25 unidades de la polimerasa (BIOTAQ™ de Bionline), y el tampón de reacción suministrado por dicha casa comercial (el volumen se completó con agua). Se aplicó un número variable de ciclos y de temperaturas de anillamiento, dependiendo de las características del experimento que se estuviera llevando a cabo. Por lo general se programó un ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturalizar el ADN. Seguidamente se dieron entre 25 y 35 ciclos que consistían en los siguientes pasos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, para permitir el anillamiento, y 1 minuto/kb de ADN a amplificar a 72°C, para permitir la síntesis de las cadenas de ADN. Por último se programó un ciclo de extensión 10 minutos a 72°C.

En los casos en que la PCR se utilizó para amplificar un fragmento de ADN que posteriormente se clonaría para su expresión en *S. pombe*, la reacción varió ligeramente. La mezcla de reacción en este caso era de un volumen final de 50 µl y contenía 600 ng de ADN molde, 0,4 mM de dNTPs, 3% de DMSO y 0,02 unidades de una polimerasa con actividad 3'-5' exonucleasa correctora de errores (VELOCITY de Bionline). En este caso se llevó a cabo un ciclo inicial de 2 minutos a 98°C, seguido de 25 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, y 1 minuto por kb de ADN a amplificar a 72°C. Por último se programó un ciclo de extensión de 1 minuto a 72°C.

3.5. PCR semicuantitativa

Esta técnica permite estimar el nivel de expresión de los genes objeto de estudio y se llevó a cabo para estudiar en qué momentos del ciclo celular se expresan *dni1*⁺, *dni2*⁺ y *prm1*⁺.

Para la extracción del ARN se partió de cultivos de 20 ml tanto en crecimiento vegetativo como en condiciones de conjugación. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con 1 ml de agua fría y se congelaron en hielo seco para facilitar la rotura. Después de haber descongelado la muestra, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua, se añadieron 50 µl de TRIzol® (Bioline) y 500 µl de perlas de vidrio de 425-600 nm tratadas con ácido (Sigma), y se mezcló todo enérgicamente con la ayuda de un vórtex. La rotura se llevó a cabo en una Fast-prep (MP-Biomedicals) aplicando 3 ciclos de 20 segundos de duración a velocidad 5,5. A continuación se agujereó el tubo con la ayuda de una aguja caliente, se colocó dentro de un tubo nuevo y se sometió un breve pulso de centrifugación a baja velocidad para recoger la muestra libre de las bolitas de vidrio en el tubo limpio. Posteriormente se añadieron 200 µl de cloroformo (Merck), se agitó con el vórtex durante 15 segundos, y la muestra se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con un volumen de isopropanol (Merck) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 12.000 rpm. Después se lavó con 1 ml de etanol 70% (Merck). Para la eliminación completa del alcohol se centrifugó durante 5 minutos a 7500 rpm a temperatura ambiente y se incubó 30-40 minutos a 32°C. El precipitado se resuspendió en 100 µl de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. Al día siguiente se observaron las muestras mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. A continuación se cuantificó la concentración de ARN en una dilución 1:5 de la muestra utilizando un equipo Nanodrop 1000 (Thermo scientific). Antes de comenzar a trabajar con ARN, para evitar la degradación del mismo, todos los instrumentos se habían lavado con SDS 1% y el material fungible se había autoclavado varias veces.

El ARNm se trató con el kit DnaseI (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, para degradar los restos de ADN que pudieran quedar en la muestra. A continuación se utilizó el kit SuperScript III (Invitrogen) para sintetizar el ADNc (ADN complementario, carente de intrones) usando como cebador un oligo poliT, ya que la mayoría de ARNm contienen una cola de poliA al final de su secuencia. Este kit contiene una enzima retrotranscriptasa que permite la síntesis de ADN a partir de ARN

La PCR semicuantitativa se llevó a cabo en un termociclador convencional. La mezcla de reacción era de 20 µl y contenía: MgCl₂ 2,5 mM, los cuatro dNTPs a una concentración final de 2 mM cada uno, los oligonucleótidos a 0,4 µM que hibridaban en la ORF del gen objeto de estudio y 2,5 unidades de la polimerasa (BIOTAQ™ de Bioline). Se utilizó como molde 1 µl del ADNc sintetizado previamente. Como control de carga se empleó la

amplificación obtenida para el gen *act1*⁺. Durante la PCR se llevó a cabo un ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de, 18 ciclos para *prm1*⁺ y *act1*⁺, o 22 ciclos para *dni1*⁺ y *dni2*⁺. Estas repeticiones consistían en: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C (para *prm1*⁺ y *act1*⁺) o a 55°C (para *dni1*⁺ y *dni2*⁺) y 1 minuto/kb a 72°C. Para terminar se aplicó un ciclo final de 2 minutos a 72°C. En todos los experimentos se incluyó un control negativo consistente en una muestra en la que no había tenido lugar la síntesis de ADNc porque no se le añadieron ni el oligonucleótido poliT ni la retrotranscriptasa.

3.6. Mutagénesis dirigida *in vitro*

Esta técnica se utilizó para introducir pequeñas mutaciones en el gen de interés. En todos los casos se siguió un método que incluye los siguientes pasos (Kunkel et al., 1987):

1.- Transformación de la cepa CJ236 de *E. coli* con el plásmido que porta el inserto de ADN bicatenario que se desea mutagenizar. Esta cepa bacteriana contiene el episoma F', que le permite ser infectada por el fago auxiliar M13K07, y dos mutaciones que son de utilidad en la mutagénesis dirigida. La mutación *dut* inactiva la enzima dUTPasa y esto hace que las moléculas de ADN sintetizadas porten la base nitrogenada uracilo en los lugares donde debía aparecer timina. La mutación *ung* inactiva la uracilo N-glicosilasa y esto permite que el uracilo incorporado al ADN no sea eliminado.

2.- Extracción de ADN de cadena sencilla infectando las bacterias con el fago M13 que al replicarse incorpora en su cápsida a una de las cadenas del plásmido bicatenario con el inserto de interés.

3.- Fosforilación del oligonucleótido que porta la mutación deseada, y que actuará como cebador para la síntesis de la cadena complementaria a la hebra sencilla, rica en uracilo, obtenida en el paso anterior. Para ello se utiliza la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 según la técnica descrita previamente (Sambrook et al., 1989).

4.- Anillamiento del oligonucleótido fosforilado a la zona complementaria del ADN de cadena sencilla. Este paso se lleva a cabo incubando ambas moléculas de ADN durante 1 minuto a 100°C (para permitir la desnaturalización del ADN) y dejando descender la temperatura lentamente por debajo de 35°C (para permitir el anillamiento del oligonucleótido al molde). A continuación se añade el tampón de síntesis, T4 ADN ligasa y T7 ADN polimerasa y se incuba la mezcla de reacción 5 minutos de en hielo, 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente 90 minutos a 37°C, para que la síntesis de la cadena complementaria tenga lugar por extensión del oligonucleótido cebador.

5.- Transformación de la cepa DH5α de *E. coli* con la mezcla de reacción. En esta cepa, la hebra rica en uracilo se degrada, replicándose exclusivamente la cadena sin uracilo que es la que ha incorporado la mutación deseada.

3.7. Construcción de plásmidos

3.7.1. Clonación del gen *prm1*⁺

El gen *prm1*⁺ se clonó a partir del genoma de una cepa silvestre de *S. pombe* mediante la técnica conocida como "reparación del hueco" (*gap repair*) (Orr-Weaver et al., 1983), que permite la transferencia de un fragmento de ADN desde el genoma hasta un plásmido replicativo que contenga las regiones flanqueantes de dicho fragmento. El plásmido debe permanecer en forma lineal, de modo que al introducirlo en una cepa de levadura pueda tener lugar la recombinación homóloga para recuperar el fragmento de interés, localizado entre las dos regiones flanqueantes. Esto permite que el plásmido se vuelva a circularizar, de manera que los transformantes pueden crecer en el medio selectivo adecuado. Finalmente se extrae ADN total de estos transformantes y el plásmido se amplifica utilizando *E. coli*.

En el caso de *prm1*⁺ se emplearon dos oligonucleótidos, Prm1Apa-F y Prm1Eco-R, (en la **tabla VI** (Anexo) se indica la secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo), para amplificar por PCR un fragmento de ADN, de aproximadamente 1Kb y correspondiente a la región localizada delante del ATG de la ORF, flanqueado por los sitios *ApaI* y *EcoRV*. Por otra parte los oligos PrmBam-F y PrmScKp-R se utilizaron para amplificar un fragmento de ADN, de aproximadamente 1Kb y correspondiente a la región situada a continuación del codón de parada, flanqueado por los sitios *BamHI* y *SacI*. Ambos fragmentos se clonaron en el plásmido KS-Not, obteniéndose el plásmido KS-Not+*prm1*⁺5'+3'. Este plásmido se cortó con *ApaI* y *SacI* para clonar dicho fragmento en el plásmido pAL. El plásmido resultante se digirió con las enzimas *PstI* y *BamHI* para su linearización y se introdujo en la cepa silvestre HVP281 de *S. pombe* mediante transformación. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM-leu. Los plásmidos de diversos transformantes se recuperaron mediante extracción de ADN de levadura y transformación de *E. coli*. Posteriormente se confirmó que portaban la secuencia de *prm1*⁺ mediante análisis de restricción, y se secuenciaron para compararlos con la secuencia del gen depositada en las bases de datos. Así se comprobó que el gen clonado no presentaba ninguna mutación. El plásmido generado se denominó pAL+*prm1*⁺.

3.7.2. Construcción del casete de delección *prm1::KAN*

El gen *prm1*⁺ se eliminó del genoma mediante la técnica del "reemplazamiento génico" (Rothstein, 1983). Esta técnica consiste en la construcción de un casete en el que las regiones 5' y 3' no codificantes del gen de interés se ligan a un marcador de selección. El casete de delección se introduce en la cepa adecuada por transformación para que tenga lugar la recombinación homóloga entre las regiones contiguas a la ORF del gen, que están presentes tanto en el casete como en el genoma. De este modo el marcador de selección sustituye a la ORF en el genoma. Para estudiar los efectos de la ausencia del gen *prm1*⁺ en

las células, se construyó un casete de delección en el que la ORF de dicho gen se sustituyó por el gen *KanMX6* (Bähler et al., 1998), que proporciona resistencia a kanamicina en *E. coli* y a geneticina (G418) en *S. pombe*. El fragmento se clonó entre los sitios *EcoRV* y *BamHI* del plásmido KS-Not+*prm1*⁺5'+3', generando un nuevo plásmido que se denominó KS+*prm1*::KAN.

3.7.3. Construcción del casete de delección *dni2*::NAT

Durante la realización de este trabajo se había observado experimentalmente que la prototrofia de uracilo ralentizaba la entrada en conjugación. Para facilitar los estudios de conjugación se generó un casete de delección para el gen *dni2*⁺ distinto al que existía en el laboratorio (*dni2*::*ura4*⁺. Clemente-Ramos et al., 2009). Para ello los fragmentos de ADN de 1 kb anterior al ATG y posterior al codón de parada de *dni2*⁺ se obtuvieron a partir del plásmido 148+*dni2*GFP (Clemente-Ramos, 2006) mediante digestión con *ApaI* y *HindIII*, y con *NotI* y *SacI*, respectivamente. Por otro lado se digirió el plásmido pFA6+NAT (Sato et al., 2005) con *HindIII* y *NotI* para obtener el gen *NatMX6*, que confiere resistencia a nourseotricina. Los tres fragmentos se ligaron al vector KS+, y el plásmido resultante se denominó KS+*dni2*::NAT. El casete se liberó del vector cortando con *ApaI* y *SacI* y se usó para transformar la cepa HVP281 de *S. pombe*.

3.7.4. Marcaje de los genes *dni1*⁺, *dni2*⁺ y *prm1*⁺

Para poder observar la localización de las proteínas de interés bajo el microscopio de fluorescencia, éstas se fusionaron a proteínas fluorescentes. La proteína verde fluorescente (GFP, del inglés "Green Fluorescent Protein") o la proteína roja fluorescente mCherry se clonaron al final de la ORF de los genes correspondientes como fragmentos de ADN flanqueados por sitios para la enzima de restricción *NotI*. Para ello previamente se había introducido, mediante mutagénesis dirigida *in vitro*, un sitio de reconocimiento para dicha enzima antes del codón de parada de la proteína correspondiente. La inserción correcta del fragmento se comprobó por análisis con enzimas de restricción y/o mediante PCR. En estas construcciones las proteínas fluorescentes están separadas de la proteína de interés por una "bisagra" de 12 alaninas, con el fin de evitar la distorsión de la estructura de la proteína que se está estudiando. En el laboratorio se disponía de *Dni1p* y *Dni2p* marcadas con GFP (Clemente-Ramos, 2006; Clemente-Ramos et al., 2009) pero para la realización de este trabajo también se fusionaron a mCherry. *Prm1p* se marcó con ambas proteínas fluorescentes siguiendo el mismo procedimiento.

Para detectar las proteínas de interés mediante ensayos tipo "Western-blot" se utilizaron las proteínas marcadas con GFP, y además se procedió al marcaje de las

mismas con el epítipo HA (hemaglutinina). Este epítipo es un pequeño péptido de 9 aminoácidos (aa) (YPYDVPDYA) procedente de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe. Un fragmento de ADN de 115 pb que porta tres copias consecutivas del epítipo se clonó flanqueado por sitios *NotI* al final de la ORF de los genes.

La funcionalidad de todas estas proteínas marcadas se comprobó mediante análisis de la capacidad de complementar el defecto en fusión celular de los mutantes correspondientes.

3.7.5. Construcción de plásmidos de sobreexpresión

Para el estudio de la función de las proteínas Dni1p, Dni2p y Prm1p se procedió a expresarlas en plásmidos de sobreexpresión. La ORF del gen *dni1*⁺ se clonó en el plásmido pREP3x (o en sus derivados) como un fragmento de ADN flanqueado por los sitios de restricción para las enzimas *XhoI* y *SacI*. La ORF de *dni2*⁺ se clonó como un fragmento que contenía en sus extremos la diana para las enzimas *SmaI* y *SacI*. Por otro lado, para la clonación del gen *prm1*⁺ en este vector fue necesario introducir un sitio *SnaBI* antes del codón de inicio de la ORF del gen por mutagénesis dirigida. El corte con esta enzima genera un extremo romo en el fragmento del ADN, que puede ligarse a otro extremo generado por digestión con cualquier enzima que genere extremos, como es *SmaI*, cuya diana aparece en el sitio de clonación múltiple del vector. En el caso de que se utilicen dos enzimas distintas para generar el extremo romo, el fragmento resultante de la ligación carecerá de la dianas de ambas. La ORF de *prm1*⁺ se obtuvo por digestión con las enzimas *SnaBI* y *SacI* para insertarla en el plásmido pREP3x que se había cortado con *SmaI* y *SacI*.

3.7.6. Construcción del plásmido KS+LactC2-GFP

El dominio similar a discoidina C2 de la lactadherina de la leche es capaz de unirse a la fosfatidilserina (PS) de la capa interna de la membrana, de manera que si se fusiona a la GFP, es posible visualizar la localización de este fosfolípido (Yeung et al., 2008). Para analizar el comportamiento de la PS en la membrana plasmática de *S. pombe* durante el proceso de conjugación, se expresó la construcción LactC2-GFP de manera constitutiva. Para ello el dominio LactC2-GFP se amplificó por PCR a partir del plásmido LactC2-GFP-p416 (#22853 de Addgene) flanqueado por los sitios de corte para las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. Fragmentos de ADN de 1 kb situados 5' y 3' respecto a la ORF del gen *act1*⁺ (que codifica la actina) se amplificaron flanqueadas por las dianas de las enzimas *ApaI* y *HindIII*, y de las enzimas *EcoR* y *NotI*, respectivamente. Todos los fragmentos se clonaron en el vector KS+ al que se había ligado el gen *NatMX6*. El plásmido final que portaba la construcción de interés se linearizó por digestión con la enzima *EcoRV* para su integración en el locus *act1*⁺.

3.7.7. Construcción del plásmido 148+Psy1-mCherry

La proteína de fusión que se expresa a partir de este plásmido se empleó como marcador de la membrana plasmática. En la colección del laboratorio se disponía del plásmido KsKAN+Psy1-Cherry, un plásmido integrativo con el gen *KANMX6* como marcador de selección. Debido a la necesidad de un marcador diferente, se construyó un derivado del mismo en pJK148. Para su construcción se digirió KsKAN+Psy1-Cherry con *Xba*I y *Sac*I y se clonó en el vector pJK148. Este nuevo plásmido se linearizó mediante la digestión con *Tth*111I para su integración en levadura.

3.7.8. Clonación de hélices transmembrana para el ensayo TOXCAT

La predicción de la secuencia de los dominios transmembrana (DTM) se realizó con el programa TMHMM-2.0 J (Krogh et al., 2001). A partir de dichas secuencias se diseñaron dos oligonucleótidos antiparalelos flanqueados por las secuencias que derivan del corte con las enzimas de restricción *Nhe*I y *Bam*HI. A la hora del diseño de estos oligonucleótidos, fue necesario añadir una guanina adicional en la secuencia de *Bam*HI para que no se modificara la fase de lectura de la ORF al clonarlo en el vector pccKAN. En la **tabla VI** (Anexo) se indican los oligonucleótidos diseñados para la construcción de los plásmidos necesarios para la realización del ensayo TOXCAT.

Se mezclaron cantidades equitativas de los juegos de oligonucleótidos correspondientes, a concentración 100 μ M en un volumen final de 100 μ l, y se facilitó su hibridación calentándolos a 100°C para posteriormente dejar descender la temperatura por debajo de 35°C lentamente. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN bicatenario correspondiente a la secuencia de cada DTM flanqueado por secuencias similares a las generadas por digestión con las enzimas *Nhe*I y *Bam*HI. De este modo estos fragmentos de ADN podían clonarse en el plásmido pccKAN. Para realizar esta ligación se tomó 1 μ l de una dilución 1:10 de los oligonucleótidos hibridados.

Para la amplificación de ADN plasmídico se empleó la estirpe de *E. coli* DH10B, ya que se comprobó que si se utilizaba la cepa DH5 α era frecuente la aparición de reorganizaciones internas.

3.8. Transformaciones

3.8.1. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* con mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado anteriormente (Kushner, 1978). Este método promueve la entrada de ADN en las células someténdolas a un choque térmico.

En el caso de la transformación de la estirpe de *E. coli* MM39 con los plásmidos construidos en el vector pccKAN se empleó el método de la electrotransformación (o

electroporación) (Sambrook et al., 1989). Esta técnica se basa en el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática mediante la aplicación de un campo eléctrico externo. Se utilizó 1 μ l de la mezcla de ligación del vector pccKAN con el inserto correspondiente. El electroporador (BioRad) se ajustó a 25 μ F, 2,5 kV y 200 Ω . Las células se plaquearon en LB suplementado con ampicilina y estreptomycinina.

Para amplificar plásmidos ya construidos se empleó el método simplificado conocido como "transformación del minuto" (Golub, 1988).

3.8.2. Transformación de *Schizosaccharomyces pombe*

Las transformaciones de *S. pombe* se llevaron a cabo siguiendo el método del acetato de litio (Ito et al., 1983), con las modificaciones descritas por Bähler y colaboradores (Bähler et al., 1998).

4. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIIONES

4.1. Microscopía de campo claro y de contraste de fases

Para la observación de células en campo claro o en contraste de fases se tomaron muestras directamente de cultivos incubados en medio líquido o en placa. Se utilizó un microscopio Leica DM RXS. La captación de imágenes se realizó con una cámara digital Leica Qsensus y el programa informático Qfish asociado a ella. Las imágenes obtenidas de esta manera se procesaron con el programa Adobe Photoshop.

Tinción con azul de metileno:

El azul de metileno es un colorante que sólo penetra en las células muertas, debido a la pérdida de permeabilidad selectiva. Como consecuencia, dichas células aparecen teñidas de color azul, mientras que las células vivas no se tiñen. Cuando se quiso evaluar la existencia de lisis celular, se recogió una muestra del cultivo que se centrifugó. Las células se resuspendieron en un pequeño volumen de una solución de azul de metileno al 0,6% y se observaron inmediatamente al microscopio de campo claro.

4.2. Microscopía de fluorescencia

La observación de muestras con fluorescencia se realizó en un microscopio Leica DM RXA, mediante la iluminación de las mismas con un sistema de epifluorescencia empleando una lámpara de mercurio de 100 W (EBQ100). La captación de las imágenes obtenidas en este microscopio se llevó a cabo con una cámara digital Leica Qsensus y el programa informático Qfish asociado a ella. En algunos experimentos se utilizó un equipo

Personal DeltaVision Microscope (Applied Precision) equipado con un microscopio invertido Olympus IX-70, una lámpara de xenón y una cámara Photometrics HQ-2. La captación de imágenes se realizó con el programa informático DeltaVision Softworx Resolve3D asociado al sistema.

En ambos casos se usaron los filtros adecuados para dejar pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Las imágenes obtenidas de esta manera se procesaron con los programas Adobe Photoshop e ImajeJ. Las fotografías obtenidas con el sistema DeltaVison son series de 15 planos adquiridos en z a intervalos de 0,2 μm . Las proyecciones máximas que se muestran corresponden a 4-6 planos centrales adquiridos en cada serie. En cada ensayo realizado con este microscopio se indica si las imágenes mostradas son planos medios o proyecciones.

4.2.1. Fluorescencia directa con GFP y RFP

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria* (Chalfie et al., 1994), que posee la capacidad de emitir luz verde a 507 nm cuando se excita con luz ultravioleta de longitud de onda de 488 nm. La GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariotas. Por esta razón, suele usarse como sistema de detección *in vivo* de la expresión y la localización subcelular de proteínas. También existe una proteína roja fluorescente (RFP), que procede del coral *Dicosoma striata*, y emite fluorescencia roja con un pico a 607 nm cuando se excita con una longitud de onda de 584 nm. Al igual que la GFP, esta proteína mantiene la capacidad de emitir fluorescencia cuando se expresa heterológamente. Se han obtenido varios derivados de la RFP cuya luz de emisión es más brillante y estable, como es el caso de la mCherry, utilizada en este trabajo, que emite luz de 610 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 587 nm (Shaner et al., 2005).

Para usar esta técnica se fusiona en fase la secuencia de ADN que codifica la proteína fluorescente con la del gen de la proteína objeto de estudio, y se introduce la proteína de fusión en las células de interés por transformación. Estas células se observan al microscopio de fluorescencia. Al presentar la GFP y la RFP diferentes espectros de absorción y emisión, es posible expresarlas en una misma célula para realizar estudios de colocalización de dos proteínas.

4.2.2. Tratamientos con compuestos químicos

Tratamiento con latrunculina A:

Este compuesto secuestra los monómeros de actina, bloqueando de este modo la polimerización de los filamentos por el extremo +. Como estos filamentos continúan despolimerizándose por el extremo -, el efecto neto del tratamiento con latrunculina A es la despolimerización de las estructuras de actina (Ayscough et al., 1997). Este tratamiento se llevó a cabo para estudiar si la localización de diversas proteínas dependía del citoesqueleto de actina. Para ello se centrifugaron 60 μ l de un cultivo, al que previamente se había inducido la diferenciación a *shmoos*, para así recoger las células. Éstas se resuspendieron en 60 μ l de agua y se añadieron 1,2 μ l de latrunculina A quedando así a una concentración final de 100 μ M. La muestra se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se observó al microscopio. Para comprobar el efecto del compuesto se sometió la estirpe *h⁹⁰ 41xnmf-GFP-CHD (HVP4261)* a un tratamiento similar. Esta cepa expresa una sonda de unión a estructuras de F-actina fusionada a la GFP. Tras el efecto de la latrunculina A, la GFP se observa dispersa por el citoplasma.

Tratamiento con MBC (Metil Benzimidazol-2il-Carbamato):

Se llevó a cabo cuando se quiso eliminar el citoesqueleto de microtúbulos, ya que este compuesto es un agente despolimerizador de dichas estructuras (Mulvihill y Hyams, 2002). El tratamiento se realizó con una concentración final de MBC de 50 μ g/ml durante 10 minutos a 25°C. Además de las estirpes objeto de estudio, se trató en paralelo la cepa *h⁹⁰ Atb2-GFP (HVP2127)*, en que la α -tubulina está fusionada a la GFP, y que por tanto sirvió como control de la actuación del MBC.

Tratamiento con brefeldina A:

Este compuesto se emplea para inhibir la secreción, ya que disgrega el aparato de Golgi (Turi et al., 1994). Como consecuencia, las proteínas de membrana que se sintetizan en el retículo endoplásmico no consiguen alcanzar la membrana plasmática, porque su trayecto se encuentra bloqueado a la altura del aparato de Golgi. La brefeldina A se utilizó para bloquear el flujo de proteína de nueva síntesis, y así poder analizar la estabilidad de varias proteínas en un microdominio de membrana. Para la realización del experimento se indujo la formación de *shmoos* en las cepas objeto de estudio y se añadió brefeldina A (a una concentración final de 400 μ M) a 250 μ l del cultivo. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

4.2.3. Tinción con Calcoflúor

El Calcoflúor es un compuesto que se une a los polímeros con enlaces $\beta(1,3)$ y $\beta(1,4)$. Por esta razón se usa para teñir la pared celular fúngica, compuesta por polisacáridos con

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

Para realizar la tinción se centrifugó 1 ml de cultivo durante 1 minuto a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron con 1 ml de agua y se resuspendieron en unos 15 μ l de una solución de calcoflúor 0,5 mg/ml.

4.2.4. Tinción con Hoeschst 33258

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

Para realizar la tinción se tomó 1 ml de un cultivo en condiciones de conjugación, se lavó con 1 ml de agua destilada y las células se resuspendieron en 20 μ l de una solución de Hoeschst 33258 a 50 μ g/ml (preparada a partir de una solución madre de este colorante que estaba a 1 mg/ml en agua destilada). Las células se tiñeron de esta manera durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con agua y se observaron al microscopio de fluorescencia.

4.2.5. Tinción con FM4-64

Para analizar el proceso de endocitosis se empleó la tinción de células vivas con el colorante FM4-64 [dibromuro de N-(3-trietilamonopropil)-4-(6-(dietilamino)fenil) hexatrienil) piridina]. El FM4-64 es un colorante lipofílico fluorescente que permite observar el proceso de endocitosis desde su incorporación a la membrana plasmática, su transporte por la ruta endosomal y su llegada e incorporación a la membrana vacuolar como destino

final (Vida and Emr, 1995). Esta última característica permite también analizar la morfología de dichos orgánulos celulares.

Para la tinción con FM4-64 se centrifugó 1 ml de cultivo durante 1 minuto a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante, dejando 50 μ l del mismo para resuspender las células. El tubo con la muestra se introdujo en hielo y se incubó durante 2 minutos para así detener el proceso de endocitosis, que depende de energía. Se añadió el FM4-64 a una concentración final de 20 μ M. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 3-5 minutos más para hacer posible una incorporación eficiente del colorante a la membrana, lo que permite observar claramente las zonas activas de endocitosis. Debido a la rápida internalización de este colorante, a los 2 minutos ya se pudieron apreciar endosomas en el interior celular. Para detectar la membrana vacuolar fue necesario incubar las muestras un mínimo de 30 minutos a 30°C después de haber añadido el colorante. En todos los casos las células se observaron al microscopio de fluorescencia (λ excitación 508 nm; λ emisión 751 nm).

4.2.6. Tinción con *Lucifer yellow*

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

Para realizar el experimento se centrifugaron tomaron 1,5 ml del cultivo a 3000 rpm y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 90 μ l de medio de cultivo y se mezclaron con el colorante de manera que éste quedara a una concentración final de 4 μ g/ml. Las muestras se incubaron de 15 a 90 minutos a 30°C. Seguidamente las muestras se lavaron dos veces con 1 ml de agua. Las células se resuspendieron en 100 μ l de medio de cultivo y se observaron inmediatamente al microscopio de fluorescencia (λ excitación 428 nm; λ emisión 542 nm).

4.3. Experimentos de *time-lapse*

Se realizaron para estudiar el comportamiento de una misma célula a lo largo del tiempo. Para llevarlos a cabo se usaron cámaras para microscopio de 8 pocillos ibidi u-slide a las que se añadieron 5 μ l de lectina de soja a 1 mg/ml (Sigma), que se distribuyeron por toda la superficie para facilitar la adhesión uniforme de las células. Una vez que la lectina se había secado, se lavó el pocillo con 300 μ l de medio MM-N, ya que estos experimentos se realizaron con cultivos de células en condiciones de conjugación. A continuación el pocillo se llenó con 600 μ l del cultivo objeto de estudio y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, para que las células se adhirieran a la lectina. A continuación se

recogió la mezcla con la que se había llenado el pocillo, que contenía las células que no se habían adherido a la lectina, y se lavó el pocillo 2 veces con 300 μ l de medio. Finalmente se añadieron 300 μ l de medio para que las células estuvieran activas mientras se realizaba el experimento. Las imágenes se tomaron con equipo Personal DeltaVision Microscope a 28°C, pero esta vez en un sólo plano central.

En los casos en los que se quiso visualizar la pared celular, se eliminó el MM-N de la muestra y las células se resuspendieron en 600 μ l de MM-N con Calcoflúor a una concentración final de 2,5 μ g/ml. La muestra se introdujo en el pocillo cubierto de lectina y se incubó durante 1 minuto. Se utilizó MM-N con Calcoflúor a 2,5 μ g/ml para los lavados y para incubar las células durante el experimento.

4.4. Cuantificación por "line-scan"

Se llevó a cabo con el fin de representar gráficamente la intensidad de fluorescencia a lo largo de una línea. Para ello se empleó el programa informático ImageJ. La cuantificación se realizó a partir de imágenes de 16 bits adquiridas con el equipo Personal DeltaVision Microscope. Para llevar a cabo esta técnica se comenzó por dibujar una línea a mano alzada a lo largo de la zona objeto de estudio. La medida de la fluorescencia se obtuvo con el comando "*plot profile*" y los datos obtenidos se exportaron al programa Excell de Microsoft. Todos los valores se normalizaron respecto al valor máximo, obteniéndose así el porcentaje de fluorescencia en cada punto de la línea dibujada, respecto a dicho valor. En las gráficas se representó este porcentaje de fluorescencia frente a la distancia que recorría la línea.

4.5. Microscopía electrónica de transmisión

Los experimentos de microscopía electrónica se realizaron en la Universidad de Stony Brooks, en Nueva York, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Janet Leatherwood. Las células se fijaron con permanganato de potasio al 2%. Después se deshidrataron sometiéndolas a pases sucesivos en etanol al 70%, 90% y 100%, se lavaron tres veces con la siguiente mezcla: 5 ml de resina Epon-812, 1,5 ml de dodecenil anhídrido succínico y 3,5 ml de metil anhídrido náutico. Finalmente las muestras se resuspendieron en la mezcla Epon con el acelerador DMP-30 (0,15 ml), se dejaron durante dos horas a temperatura ambiente y 24 horas a 60°C antes de ser seccionadas con un microtomo.

5. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

5.1. Obtención de extractos proteicos

Se obtuvieron a partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento ($D.O._{600} = 1$) o bien en condiciones de conjugación, según el experimento. Se utilizaron cultivos de un

volumen mínimo de 30 ml para *S. pombe* y 20 ml para *E. coli*. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm y se lavaron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% frío. A continuación se resuspendieron en 50 µl de TCA al 20% y se añadieron 500 µl de Ballotini (perlas de vidrio de 0,40-0,60 mm de diámetro; "Glasperlen", Braun Biotech International). Las células se rompieron en una "Fast Prep" FP120 (Savant Bio101) en tres ciclos de 16 segundos a una velocidad de 6 y a 4°C, con una incubación de 5 minutos en hielo entre los pulsos de rotura. Posteriormente las bolitas de vidrio se lavaron añadiendo 400 µl de TCA al 5% frío y agitándolas enérgicamente con un vórtex. Los extractos celulares se transfirieron a un tubo nuevo de 1,5 ml frío picando la base del tubo que contenía la muestra con una aguja caliente, y colocándolo dentro de un tubo nuevo. Los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 3000 rpm en frío. Las muestras, recogidas en el tubo nuevo, se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en una solución compuesta por SDS al 10 % y Tris Base 1M, y se calentó durante 10 minutos a 65°C. Posteriormente se centrifugó la muestra durante 2 minutos a 13.200 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. La cantidad de proteína en cada muestra se valoró con el kit "Protein Assay" de BioRad (Método Bradford) usando duplicados de diluciones 1:10 de cada muestra, y utilizando estándares de seroalbúmina bovina (BSA) para realizar una recta patrón (0, 5, 10, 15 y 20 µl de una solución a 1 mg/ml). Seguidamente se añadió un volumen de tampón de carga SB2x (Tris HCl pH 6,8 100 mM, SDS 2%, β-Mercaptoetanol 0,286 M, glicerol 20% y azul de bromofenol) igual al equivalente de extracto necesario para cargar entre 10 y 75 µg de proteína en el gel. En algunos casos los extractos proteicos se guardaron congelados a -20°C.

5.2. Separación por electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas

Las proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de diferente porcentaje de poliacrilamida (BioRad) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los geles se polimerizaron el día anterior a 4°C y la electroforesis se realizó empleando el tampón de carrera Laemmli 1x (Tris base 3 g/l, glicina 14,4 g/l, SDS 5%) a una intensidad de 100-150 V durante 1,5-2 horas. Se empleó el sistema de electroforesis "Mini Protean 3" de BioRad siguiendo las recomendaciones de la casa suministradora.

En otras ocasiones las muestras se cargaron en geles de gradiente de poliacrilamida comerciales (3-8% NuPAGE® Tris-Acetate Gels o 4-12% NuPAGE® SDS-PAGE Gels, Life Technologies) y se empleó el sistema de electroforesis Novex® Mini-Cell de Life Technologies siguiendo las recomendaciones de la casa suministradora. La electroforesis de los geles se realizó con el tampón MES-SDS Running Buffer (FORMEDIUM), empleando un voltaje de 150 V durante un período de aproximadamente 1,5 horas en frío.

En ambos casos la transferencia de proteínas a membranas de PVDF (Immobilon™-P, Millipore) para su posterior detección con anticuerpos. Se llevó a cabo mediante el sistema "Mini Trans Blot" (BioRad) usando el tampón de transferencia Tris-Glicina (Tris base 3 g/l, glicina 14,4 g/l, metanol 10%), durante unas 2 horas a 100 V. Para evitar el calentamiento excesivo del tampón se mantuvo la cubeta en un baño agua-hielo durante todo el proceso.

Con el fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo empleada fue leche en polvo desnatada (Sveltesse-Nestlé) al 5% disuelta en TBST (Tris base 2,5g/l, NaCl 9 g/l, Tween-20 al 0,025%).

Después del bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario pertinente diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente la membrana se lavó 2 veces durante 10 minutos con TBST para eliminar el anticuerpo que no se había unido, y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente en la solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se efectuaron otros dos lavados con TBST como en el caso del anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **tabla V** (Anexo).

Para el revelado se recurrió a la detección de la actividad peroxidasa (enzima ligada al anticuerpo secundario) por quimioluminiscencia, empleando el kit "WesternBright™ ECL" (Advansta). Cuando la intensidad era muy débil se utilizó el kit "ECL Select" (Amersham Pharmacia). En ambos casos se siguieron las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. La luminiscencia se detectó en películas fotosensibles (Fuji Medical Ray-X Film, Fujifilm).

5.3 Co-inmunoprecipitación

Para realizar este tipo de experimentos se partió de cultivos en condiciones de conjugación de 200 ml. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con 25 ml de tampón "STOP" (154 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaN₃, 10 mM NaF) con el objetivo de parar el metabolismo celular. A continuación se enjuagaron con 4,5 ml de una solución de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7,5 y 5 mM EDTA). Seguidamente se resuspendieron en 1,5 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 µl/ml aprotinina, leupeptina y pepstatina; 10 µl/ml PMSF) y se congelaron en N₂ líquido. La rotura celular se realizó por lisis mecánica en N₂ líquido empleando un molino criogénico (FREEZER/MILL® 6670), lo que permitió mantener las muestras congeladas en todo momento evitándose así su degradación. Se sometieron a 2 ciclos de rotura de 1 minuto cada uno a una intensidad de 12 cps (rango 1-15) con un preenfriamiento de 1 minuto. Las muestras se mantuvieron a -80°C toda la noche. Al día siguiente se dejaron descongelar en hielo, se pasaron a

tubos de 1,5 ml y se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 rpm a 4°C para eliminar las paredes y los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a tubos para ultracentrífuga (Beckman coulter optima TLX) y se centrifugó durante 30 minutos a 100.000 xg para recoger las membranas celulares. A continuación las membranas se resuspendieron en 1 ml de tampón IP [50 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1mM EDTA; 2 µl/ml aprotinina, leupeptina y pepstatina; 10 µl/ml PMSF, Digitonina 2% (Sigma), Tritón X-100 2% (Sigma)] y se incubaron durante 1 hora a 4°C en agitación para la extracción de las proteínas de la membrana. Este tampón se preparaba el día anterior y se mantenía a temperatura ambiente sin añadir el tritón X-100. Para disolver la digitonina, la solución se calentaba en el microondas hasta ebullición. Al día siguiente se calentaba durante 5 minutos a 100°C y se dejaba enfriar, primero a temperatura ambiente y posteriormente en hielo, para a continuación añadir el tritón X-100. Después de la extracción de las proteínas de membrana en el tampón IP, las muestras se volvían a centrifugar a 100.000 xg durante 30 minutos para recoger los restos de membranas que no se hubieran extraído y evitar así falsos positivos de proteínas presentes en un mismo fragmento de membrana. A continuación se valoró la concentración de proteína en los sobrenadantes mediante el método Bradford, como se ha detallado anteriormente, y se llevó cada muestra hasta un volumen final de 1,1 ml. Se separaron 100 µl, se mezclaron con 33 µl de tampón de carga SB4x (Tris HCl pH 6,8 200 mM, SDS 4%, β-Mercaptoetanol 4%, glicerol 36% y azul de bromofenol) y se calentaron durante 10 minutos a 65°C. Estas muestras se denominaron "extractos totales" y se mantuvieron en hielo. Con el resto de las muestras se procedió a la purificación de las proteínas marcadas con el epítipo HA o con la GFP utilizando el kit µMACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kit (Miltenyi Biotec) siguiendo las indicaciones proporcionadas por la casa comercial. Para facilitar la desnaturalización de las proteínas una vez purificadas, se añadió DTT a una concentración final de 10 mM al tampón de elución proporcionado por la casa comercial antes de su utilización. A continuación, todas las muestras se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65°C y se centrifugaron durante 1 minuto a 13.200 rpm para eliminar posibles agregados. La electroforesis de proteínas de los "extractos totales" (10 µl en un gel para revelar con el anticuerpo anti-GFP y 20 µl en un segundo gel para revelar usando el anticuerpo anti-HA) y las muestras de inmunoprecipitado (20 µl en cada uno de los geles) se analizaron mediante un ensayo *Western-blot* tal y como se ha explicado anteriormente. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **tabla V** (Anexo).

6. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Valoración de la actividad CAT:

Para la realización del ensayo TOXCAT se procedió a la valoración de la actividad de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) como medida indirecta de la fuerza de

interacción de dos hélices dentro de la membrana plasmática. El ensayo se basa en las siguientes premisas: la enzima CAT confiere resistencia al cloranfenicol (CAM) ya que cataliza su acetilación a partir de acetil coenzima A (ACoA). Como resultado, el grupo sulfhidrilo (-SH) del ACoA queda libre, siendo susceptible de reaccionar con DTNB (reactivo de Ellman). Esta reacción genera un compuesto de color amarillo que se cuantifica por espectrofotometría (Hsin et al., 2011).

Para el ensayo se utilizó la estirpe MM39 de *E. coli* transformada con el vector pccKAN que porta la hélice transmembrana objeto de estudio. Se partió de un cultivo de 3 ml que había crecido durante toda la noche en LB con ampicilina a 37°C. A la mañana siguiente se reinocularon 50 µl del cultivo en 3 ml de medio fresco y el cultivo se dejó crecer durante ~1,5 horas hasta que el valor de la D.O.₆₀₀ llegara a 0,8-1. En este momento se tomó 1 ml del cultivo y se mantuvo en hielo durante 20 minutos con el objetivo de parar el crecimiento celular. A continuación las células se recogieron por centrifugación a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4°C, y se resuspendieron en 500 µl de tampón de sonicación (25 mM Tris-HCl pH 8 y 2 mM EDTA). La rotura celular se llevó a cabo con un sonicador (Labsonic-M) aplicando un ciclo de 2 minutos de duración a una amplitud del 70%. A continuación las muestras se centrifugaron 10 minutos a 13.200 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se realizó una medida continua en el espectrofotómetro (BioRad Smart Spec™ Plus) durante un total de 6 minutos cada 3 segundos, a una longitud de onda de 417 nm. Para ello se mezclaron en la cubeta 750 µl del tampón de reacción [0,1 M Tris-HCl pH 8; 0,4 mg/ml DTNB (Sigma)], 250 µl de ACoA a 0,4 mM (Sigma) y 40 µl de la muestra. La reacción se dejó estabilizar a temperatura ambiente durante 3 minutos y a continuación se procedió a su medida en el espectrofotómetro durante 2 minutos. Esta medida corresponde a lo que se ha denominado "línea base". Transcurrido este tiempo se añadieron a la misma cubeta 40 µl de CAM 25 mM (Sigma). Esta mezcla de reacción se dejó estabilizar y se contabilizó la medida de la D.O.₄₁₇ durante 4 minutos (desde el segundo 150 al 360). El ensayo se realizó 3 veces con tres replicados biológicos. Los controles previamente establecidos corresponden a la hélice transmembrana de la glicoforina A (GpA) silvestre (control positivo) y un mutante de la misma (G83I) (control negativo) (Russ y Engelman, 1999). La glicoforina A es una proteína transmembrana de tipo I de los eritrocitos humanos (Chasis y Mohandas, 1992).

La actividad CAT se calculó como la pendiente de la recta obtenida al representar el valor de la D.O. respecto al tiempo. Para obtener el valor de la actividad CAT relativa se restó la pendiente de la línea base a la pendiente de la recta obtenida después de la adición del CAM. Este valor se normalizó con respecto a la D.O.₆₀₀ del cultivo de cada replicado biológico y se normalizó nuevamente respecto al valor de actividad CAT del control positivo. Los resultados se muestran como porcentaje de actividad CAT de cada muestra de interés respecto a la actividad del control positivo, GpA, al cual se le asigna un valor del 100%.

7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE DATOS

Para los estudios *in silico* de los genes y de las proteínas de interés se utilizaron los siguientes programas bioinformáticos y bases de datos, que están disponibles *on line* en las direcciones electrónicas que aparecen a continuación:

- SGD (base de datos de *S. cerevisiae*): <http://www.yeastgenome.org/>
- PomBase (base de datos de *S. pombe*):
<http://www.genedb.org/genedb/pombe/index.jsp>
- PDB (banco de datos de proteínas): <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- UniProt (base de datos de proteínas): <http://www.uniprot.org/>
- BLAST (alineamiento de secuencias y búsqueda/comparación con las proteínas y genes depositados en las bases de datos): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- CLUSTALW (programa de alineamiento múltiple para ADN y proteínas):
<http://ebi.ac.uk/clustalw/>
- Expasy (análisis de la secuencia y estructura de las proteínas): <http://www.expasy.org/>
- Simfit (programa de análisis estadístico de datos):
<http://www.simfit.org.uk/download.html>

Para comprobar la significación estadística de los resultados obtenidos se realizaron los test *t-Student* y *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

- GraphPad Prism (programa de análisis estadístico de datos): se utilizó para la comparación múltiple mediante el método *Holm-Šidák* de las gráficas obtenidas de las cuantificaciones de cada *line-scan*.

Tabla III. Estirpes de *E. coli* empleadas en el este trabajo

NOMBRE	GENOTIPO	PROCEDENCIA
DH5 α	<i>supE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Invitrogen
CJ236	<i>dut-1, ung-1, thi-1, relA-1; pCJ104 (Cm^r)</i>	BioRad
DH10B	F ⁺ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsd RMS-mcr BC</i>), Φ 80 <i>dlac Z</i> Δ M15, Δ <i>lacX74, end A1, rec A1, deoR</i> Δ (<i>ara, leu</i>) 7697, <i>araD139 galU galK nupG rpsL</i> λ -	Invitrogen
MM39	<i>araD, lacI, ΔU1269, malE444, Str^r</i>	A. Senes

Tabla IV. Estirpes de *S. pombe* utilizadas en el presente trabajo

NOMBRE	GENOTIPO	PROCEDENCIA
HVP30	<i>leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Colección HVM
HVP75	pREP3x <i>leu1-32 h⁻</i>	Colección HVM
HVP117	<i>leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁺</i>	Colección HVM
HVP281	<i>leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP289	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁻</i>	P. Nurse
HVP423	<i>fus1-HA leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Colección HVM
HVP424	<i>fus1-HA leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁺</i>	Colección HVM
HVP484	<i>fus1::LEU2 ura4Δ-18 h⁹⁰</i>	O. Nielsen
HVP758	<i>dni1::KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP781	<i>dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP839	<i>dni1::KAN leu1-32 ura4Δ-18 his3Δ-1 h⁻</i>	Colección HVM
HVP840	<i>dni1::KAN leu1-32 ura4Δ-18 his3Δ-1 h⁺</i>	Colección HVM
HVP841	pREP3xdni1 ⁺ <i>leu1-32 h⁻</i>	Colección HVM
HVP865	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁻</i>	Colección HVM
HVP866	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ dni1::KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁻</i>	Colección HVM
HVP899	<i>fus1::ura4⁺ dni1-GFP:leu1⁺</i>	Colección HVM
HVP940	<i>fus1-GFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP1000	<i>agn1-GFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	C. Rodríguez
HVP1028	<i>agn1-GFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁺</i>	Colección HVM
HVP1077	<i>dni1::KAN dni2::ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP1083	<i>dni2::ura4⁺ leu1-32, ade6-M210, his3Δ-1 h⁻</i>	Colección HVM
HVP1084	<i>dni2::ura4⁺ leu1-32, ade6-M210, his3Δ-1 h⁺</i>	Colección HVM
HVP1113	<i>dni2::ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP1167	<i>dni2::ura4⁺ dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP1413	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ dni2-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁻</i>	Colección HVM
HVP1426	<i>fus1-HA:ura4⁺ dni2-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM

HVP1697	<i>Pmap4⁺:GFP:Tmap4⁺:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Colección HVM
HVP1711	<i>end4⁺:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 h⁹⁰</i>	K. Takegawa
HVP2105	<i>Psy1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP 2127	<i>atb2-GFP</i>	
HVP2185	<i>prm1⁺:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2256	<i>dni1⁺:KAN prm1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2257	<i>dni2⁺:ura4⁺ prm1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2258	<i>dni1⁺:KAN dni2⁺:ura4⁺ prm1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2259	<i>cfr1⁺:his3⁺ prm1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2260	<i>prm1⁺:KAN prm1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2262	<i>dni2⁺:ura4⁺ dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2264	<i>prm1⁺:KAN Pmap4⁺:GFP:Tmap4⁺:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2268	<i>prm1⁺:KAN dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2269	<i>dni1⁺:KAN psy1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2279	<i>dni1⁺:KAN pREP3xdni1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2280	<i>dni2⁺:ura4⁺ pREP3xdni1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2281	<i>prm1⁺:KAN pREP3xdni1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2282	<i>dni1⁺:KAN pREP3xdni2⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2283	<i>dni2⁺:ura4⁺ pREP3xdni2⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2290	<i>prm1⁺:KAN pREP3xdni2⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2291	<i>dni1⁺:KAN pREP3x leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2292	<i>dni2⁺:ura4⁺ pREP3x leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2294	<i>prm1⁺:KAN pREP3x leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2296	<i>dni1⁺:KAN dni2-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2297	<i>prm1⁺:KAN dni2-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2313	<i>dni1⁺:KAN dni1C58S:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2324	<i>dni1⁺:KAN dni1C68S:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2325	<i>dni1⁺:KAN dni1Δ-31:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2326	<i>dni2⁺:ura4⁺ dni2C85S:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2333	<i>pALmap3-GFP leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2334	<i>dni2⁺:ura4⁺ dni2Δ-37:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2335	<i>dni2⁺:ura4⁺ dni2C74S:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2380	<i>cyr1⁺:ura4⁺ sxa⁺:ura4⁺ pALmap3-GFP leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h</i>	Este trabajo
HVP2421	<i>prm1⁺:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h</i>	Este trabajo
HVP2436	<i>dni2⁺:ura4⁺ dni2Δ-37-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2437	<i>dni2⁺:ura4⁺ dni2C74S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2438	<i>dni2⁺:ura4⁺ dni2C74SC85S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2446	<i>prm1⁺:KAN pREP3X his3Δ-1 leu1-32 ura4Δ-18 ade6 h</i>	Este trabajo
HVP2447	<i>prm1⁺:KAN pREP3Xdni1⁺ his3Δ-1 leu1-32 ura4Δ-18 ade6 h</i>	Este trabajo
HVP2448	<i>prm1⁺:KAN pREP3Xdni2⁺ his3Δ-1 leu1-32 ura4Δ-18 ade6 h</i>	Este trabajo
HVP 2516	<i>prm1⁺:KAN dni2⁺:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2521	<i>cherry-psy1:KAN pREP3Xdni1⁺ leu1-32 h</i>	Este trabajo
HVP2525	<i>dni1⁺:KAN pREP3Xdni1-GFP leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2526	<i>pREP3Xdni1-GFP leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2531	<i>cherry-psy1:KAN pREP3X leu1-32 h</i>	Este trabajo

HVP2540	<i>dni::ura4⁺ pREP3Xdni1-GFP leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2558	<i>dni2::ura4⁺ dni1-GFP:KAN dni2Δ-37 leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2567	<i>dni1::KAN dni1C58S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2568	<i>dni1::KAN dni1C68S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2569	<i>dni1::KAN dni1Δ-31-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2579	<i>dni1::KAN dni1-RFP:leu1⁺ dni2-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2581	<i>dni1::KAN dni1C58SC68S:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2586	<i>dni1::KAN dni1C58SC68S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2591	<i>prm1::KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2605	<i>dni2::ura4⁺ pREP3xprm1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2606	<i>dni1::KAN pREP3xprm1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2607	<i>dni1::KAN pREP3x pREP4x</i>	Este trabajo
HVP2684	<i>prm1::KAN pREP3xprm1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2691	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ prm1::KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2744	<i>dni2::ura4⁺ dni1-GFP:KAN dni2C74S leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2745	<i>dni2::ura4⁺ dni2C85S:leu1⁺ dni1-GFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2836	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ dni2::ura4⁺ dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2842	<i>dni1-mCherry:leu1⁺ prm1-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2867	<i>dni2::ura4⁺ fus1-GFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2868	<i>fus1-GFP:KAN dni1-mCherry:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP2885	<i>dni1::KAN pREP3x leu1-32 ura4Δ-18 his3Δ-1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2887	<i>dni1::KAN pREP3xprm1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 his3Δ-1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2888	<i>dni2::ura4⁺ pREP3xprm1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 his3Δ-1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP2953	<i>pREP3x pREP3hisdni1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 his3Δ-1 h⁺</i>	Este trabajo
HVP3019	<i>sur4-mCherry:NAT pREP3x leu⁻ ura⁻</i>	Este trabajo
HVP3020	<i>sur4-mCherry:NAT pREP3xdni1⁺ leu⁻ ura⁻</i>	Este trabajo
HVP3059	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ dni1::KAN pALmap3-GFP leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁺</i>	Este trabajo
HVP3064	<i>LactC2-GFP:NAT leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3074	<i>prm1::KAN LactC2-GFP:NAT leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3092	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ dni1-GFP:KAN prm1-mCherry leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁺</i>	Este trabajo
HVP3125	<i>dni1::KAN dni1Δ-31:leu1⁺ dni2-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3134	<i>dni1::KAN dni1C68S:leu1⁺ dni2-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3156	<i>dni1::KAN dni1C58SC68S:leu1⁺ dni2-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3168	<i>LactC2-GFP:NAT mCherry-Bgs4:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3170	<i>prm1::KAN LactC2-GFP:NAT mCherry-Bgs4:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3193	<i>dni1::KAN dni1C75S:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3194	<i>dni1::KAN dni1C58SC68SC75S:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3219	<i>ire1::KAN pREP3xdni1⁺ leu1⁻ ura⁻ ade⁻ h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3220	<i>ire1::KAN pREP3x leu1⁻ ura⁻ ade⁻ h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3224	<i>dni1::KAN dni1C58SC68SC75S:leu1⁺ dni2-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3225	<i>dni1::KAN dni1C75S:leu1⁺ dni2-GFP:ura4⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo

HVP3231	<i>gpt1::KAN pREP3x leu1⁻ ura⁻ ade⁻ h⁻</i>	Este trabajo
HVP 3232	<i>gpt1::KAN pREP3xdni1⁺ leu1⁻ ura⁻ ade⁻ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3234	<i>dni1::KAN dni1C75S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3235	<i>dni1::KAN dni1C58SC68SC75S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3285	<i>fus1::LEU2 prm1::KAN ura4Δ-18 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3299	<i>dni2::ura4⁺ dni2-GFP:leu⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3412	<i>fus1::ura4⁺ LactC2-GFP:NAT ura4Δ-18 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3415	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ LactC2-GFP:NAT leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3416	<i>cyr1::ura4⁺ sxa::ura4⁺ prm1::KAN LactC2-GFP:NAT leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M704 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3432	<i>LactC2-GFP:NAT mCherry-Psy1:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3434	<i>prm1::KAN LactC2-GFP:NAT mCherry-Psy1:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3466	<i>prm1::KAN agn1-GFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6-</i>	Este trabajo
HVP3516	<i>pREP3x pREP3xhis leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3517	<i>pREP3x pREP3xhisdni1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3518	<i>pREP3xdni2⁺ pREP3xhis leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3519	<i>pREP3xdni2⁺ pREP3xhisdni1⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP 3541	<i>spm1::NAT pREP3x leu⁻ ura⁻ ade6⁻ h⁻</i>	Este trabajo
HVP 3542	<i>spm1::NAT pREP3xdni1⁺ leu⁻ ura⁻ ade6⁻ h⁻</i>	Este trabajo
HVP3550	<i>GFP-Psy1:leu⁺ Hht1-mRFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3552	<i>prm1::KAN GFP-Psy1:leu⁺ Hht1-mRFP:KAN leu1-32 ura4Δ-18 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3560	<i>dni2::ura4⁺ prm1::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3635	<i>sty1::ura4⁺ pREP3x leu1 ade 6M216 h⁺</i>	Este trabajo
HVP3636	<i>sty1::ura4⁺ pREP3xdni1⁺ leu1 ade 6M216 h⁺</i>	Este trabajo
HVP3647	<i>pREP3xC58SC68SC75S leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3648	<i>pREP3xdni1Δ-31 leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3658	<i>pREP3xdni1⁺ pREP3xhisdni2⁺ leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3666	<i>pREP3xdni1⁺ pREP3xhis leu1-32 his3-Δ1 ura4Δ-18 ade6-M210 h⁻</i>	Este trabajo
HVP3756	<i>dni2::NAT leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3788	<i>dni1::KAN dni2::NAT leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3790	<i>dni1::KAN dni2::NAT psy1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3792	<i>dni2::NAT psy1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3927	<i>dni1::KAN end4::ura4⁺ dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3968	<i>dni1::KAN dni1S110LG114LS118L:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3969	<i>dni2::NAT dni2A158LA162L:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3970	<i>dni2::NAT dni2A189LG193LS197L:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3972	<i>dni1::KAN dni2::NAT dni1-HA:ura4⁺ dni2Δ-37-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP3973	<i>dni1::KAN dni2::NAT dni1-HA:ura4⁺ dni2C74SC85S-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4051	<i>dni2::NAT dni2A158LA162L-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4053	<i>dni2::NAT dni2A189LG193LS197L-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4054	<i>dni1::KAN dni2::NAT dni1-GFP:ura4⁺ dni2A158LA162L:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4055	<i>dni1::KAN dni2::NAT dni1-GFP:ura4⁺ dni2A189LG193LS197L-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4115	<i>dni1::KAN dni1L199AL200A-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo

HVP4161	<i>dni1::KAN end4::ura4⁺ dni1Δ-31-GFP:leu1⁺ h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4207	<i>dni1::KAN myo52::ura4⁺ dni1-GFP:leu1⁺ leu1-32 ade6 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP 4220	<i>dni1::KAN dni2::NAT dni1-HA:ura4⁺ dni2-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4261	<i>pREP41xCHD-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4262	<i>dni1::KAN pREP41xCHD-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4263	<i>dni2::NAT pREP41xCHD-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4264	<i>dni1::KAN dni2::NAT pREP41xCHD-GFP:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4419	<i>dni2::NAT dni1-HA:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo
HVP4483	<i>dni1::KAN dni1G192LS196L:leu1⁺ leu1-32 ura4Δ-18 ade6-M216 h⁹⁰</i>	Este trabajo

Tabla V. Soluciones stock utilizadas en el presente trabajo

PRODUCTO	SOLUCION STOCK	PROCEDENCIA
ACoA	0,4 mM en agua	Sigma
Ampicilina	25 mg/ml en agua	Roche
BAPTA	10 mM en MES	Sigma
Brefeldina A	5 mg/ml en etanol	Sigma
Calcofluor	10 mg/ml en PBS	Bayer Corporation
Cl ₂ Ca 3/2 H ₂ O	2,5 M en agua	PROBUS
Cloranfenicol	25 mM en etanol	Sigma
Complejo Filipina	5 mg/ml en DMSO	Sigma
DTT	1 M en agua	FORMEDIUM
Duramicina	1 mM en metanol:agua 1:1	Santa Cruz Biotechnology
EGTA	0,5 M en agua	Sigma
Factor P	5 mg/ml en metanol	Isogen
Kanamicina	25 mg/ml en agua	FORMEDIUM
Latrunculina A	5 mM en DMSO	Sigma
Lectina	5 mg/ml en agua	Sigma
Lucifer Yellow	40 µg/ml en agua	Biotium
MBC	5 mg/ml en DMSO	Sigma
Miconazol	10 mM en DMSO	Sigma
Miriocina	1 mg/ml en etanol	Sigma
Nourseotricina	50 mg/ml en agua	WERNER BioAgents
Papuamida B	0,5 mg/ml en metanol:agua 1:1	Flintbox
Tiamina	20 mg/ml en agua	Sigma
Tritón X-100	10% en agua	Merck

Tabla VI. Anticuerpos empleados en el presente trabajo

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
anti-HA monoclonal, 12C5A	1:5000	Roche
anti-GFP monoclonal, JL8	1:3000	BD Living Colors
anti-Cdc2 p34, Y100.4	1:4000	Santa Cruz Biotechnology
anti-MBP monoclonal, Ab	1:10000	New England Biolabs
anti-ratón	1:10000	BioRad

Tabla VII. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	UTILIDAD
Prm1Apa-F	GGGCCCCAAGTGGTAGCCATTGTTATAGCT	Clonación del gen <i>prm1⁺</i>
Prm1Eco-R	CCAGGGTGATATCCAACACTGT	Clonación del gen <i>prm1⁺</i>
PrmBam-F	GGATCCTATTAGAAGTCTACATAGATTCTA	Clonación del gen <i>prm1⁺</i>
PrmScKp-R	GAGCTCGGTACCGGAAAAGGTAATCCTTGAGTTTTG	Clonación del gen <i>prm1⁺</i>
Prm1 SnaBI	GATATGAAGACGCCATTACGTATACAGGCTGTTTCGATCTC	Introducción de un sitio <i>SnaBI</i> en posición -1 en <i>prm1⁺</i>
Prm1 2582-F	GAATTACCTCTTTTACCTACTGATATT	PCR semicuantitativa del gen <i>prm1⁺</i>
Prm1 3150-R	TCTATCCTGTTTTCTTTCAATAAATATGTTGTC	PCR semicuantitativa del gen <i>prm1⁺</i>
Act 820-F	CATGCTATCATGCGTCTTGATCTG	PCR semicuantitativa del gen <i>act1⁺</i>
Act Stp-R	GAAGCACTTACGGTAAACGATACC	PCR semicuantitativa del gen <i>act1⁺</i>
Dni1 1810-F	CTCTTGCAACTAACGTAG	PCR semicuantitativa del gen <i>dni1⁺</i>
Dni1 2310-R	GTATCGTCTTACGAATCTTC	PCR semicuantitativa del gen <i>dni1⁺</i>
Dni2 1980-F	CACCGTAGACGTCGGTTTCTTTGG	PCR semicuantitativa del gen <i>dni2⁺</i>
Dni2 2480-R	CAAGCTAAATGAGAGAGATG	PCR semicuantitativa del gen <i>dni2⁺</i>
Prm5'-F	GCTGTAGTCTTCGAATTGTATC	Comprobación de la delección <i>prm1Δ</i>
Prm1200-R	GGGCTATCAAGGAGAATGTCG	Comprobación de la delección <i>prm1Δ</i>
Prm2900-F	CCTGTTACGAAGTCGTGTAGGCCT	Comprobación de la delección <i>prm1Δ</i>
K2	GTCGCACCTGATTGCCCGAC	Comprobación de la delección <i>prm1Δ</i>
K3	TTGGACGAGTCGGAATCGCAG	Comprobación de la delección <i>prm1Δ</i>

Prm3'-R	ACTCAGAGGTCCTAATGTTATGGG	Comprobación de la delección <i>prm1Δ</i>
PrmCTNot	GAATCTATGTAGACTTCTAGCGGCCCATATCTATCCTGTTTTTC	Introducción de un sitio <i>NotI</i> antes del codón de parada en <i>prm1+</i>
Dni1C58S	CGCATTAGCAGAAAAGTACACTCATGTTAAAATACCCAACG	Mutagénesis Cys conservada en <i>dni1+</i>
Dni1C68S	GGACAACCAGTAAATTGAGGTTTGCTGATCAGCGTCGCATTAGC	Mutagénesis Cys conservada en <i>dni1+</i>
Dni1C75S	AGTCAACCCAGGAGAACCAGTAAATTG	Mutagénesis Cys conservada en <i>dni1+</i>
Dni1Dct	CTTACGAATCTTCTTGTTCTGCGGCCGCTGAAGTAACC AAAAGAATAATAGA	Delección del extremo C-terminal de <i>dni1+</i>
Dni2C74S	GAATTAATAGCTTGATCACTCACTCCAAAGAAACC	Mutagénesis Cys conservada en <i>dni1+</i>
Dni2C85S	CCAATTTGGAAGCTCATGGCTAACTCGAGACGT	Mutagénesis Cys conservada en <i>dni1+</i>
Dni2Dct	GCTTGTTTCGTTCAATAGTGCGGCCGCCCAAAGTCCCAAATGTATTAG	Delección del extremo C-terminal de <i>dni1+</i>
Dni1 L198-199A	CTTGTTCTTGAAGTAACCGCAGCAATAATAGAATCCGT	Mutagénesis motivo di-Leu de <i>dni1+</i>
Dni1 L198-199A Not	GCGGCCGCTGAAGTAACCGCAGCAATAATAGAATCCGT	Introducción de un sitio <i>NotI</i> en el mutante di-Leu de <i>dni1+</i>
Dni1-small	CAAACGCCCTATTAAGGGAAGGAGGGAAACAACAAGCAT AAGAAATAGAACACCGCATACGCAAATGA	Mutagénesis motivo small-xxx-small hélice 2 de <i>dni1+</i>
Dni1-small-H4	TGAAGTAACCAAAGAATAATAAGATCCGTGATAAGTGTT AATGTCACAAGTCCCAT	Mutagénesis motivo small-xxx-small hélice 4 de <i>dni1+</i>
Dni2-small-3	ATTAGCCGAAATATGAGCTAAAAGCATTGGAGTAGTAAA AGCAAACAGGCGGCTGT	Mutagénesis motivo small-xxx-small hélice 3 de <i>dni2+</i>
Dni2-small-4	TAGCGAAAATAGCAAAAAGAATCCAAGGGAAATCCACAGA AAAACTGCTAGAGCTACCCCAAATTTGCTGTAGC	Mutagénesis motivo small-xxx-small hélice 4 de <i>dni2+</i>
Dni1 H2-F	<u>CTAGCTGGATGATTGTCTTTTTCATTTTGCATGCGGTGTT TCATTTCTTATGGGTGTTGTTTCCAGCCTTCCCGG</u>	Hélice 2 de <i>dni1+</i> para TOXCAT
Dni1 H2-R	<u>GATCCCGGGAAGGCTGGAACAACACCCATAAGAAATGA AACACCGCATACGCAAATGAAAAGACAATCATCCAG</u>	Hélice 2 de <i>dni1+</i> para TOXCAT
Dni1 H4-F	<u>CTAGCATGATCTTTTTATGGTGTCTATGGGACTTGTGACA TTAACAGGTATCACGGATTCTATTATTCTTTTGGG</u>	Hélice 4 de <i>dni1+</i> para TOXCAT
Dni1 H4-R	<u>GATCCCAAAGAATAATAAGATCCGTGATACCTGTTAAT GTCACAAGTCCCATAGAACACCATAAAAAGATCATG</u>	Hélice 4 de <i>dni1+</i> para TOXCAT
Dni1 H4 mut - F	<u>CTAGCATGATCTTTTTATGGTGTCTATGGGACTTGTGACA TTAACACTTATCACGGATCTTATTATTCTTTTGGG</u>	Hélice 4 mutada de <i>dni1+</i> para TOXCAT
Dni1 H4 mut - R	<u>GATCCCAAAGAATAATAAGATCCGTGATAAGTGTTAAT GTCACAAGTCCCATAGAACACCATAAAAAGATCATG</u>	Hélice 4 mutada de <i>dni1+</i> para TOXCAT
H3-F (2)	<u>CTAGCTGGTCAATAAGTTGTTAACTACTAGTACAGCCGC CTGTTTGCTTTTAGCACTCCAAATGGCTTTAGCTGG</u>	Hélice 3 de <i>dni2+</i> para TOXCAT
H3-R (2)	<u>GATCCAGCTAAAGCCATTTGGAGTGCTAAAAGCAAACAG GCGGCTGTACTAGTAGTTAAACAACCTATTGACCAG</u>	Hélice 3 de <i>dni2+</i> para TOXCAT
H4F-F (2)	<u>CTAGCGCAGCAGTTTTTGGGTGATTTCAGTGATTCTT TTTGCTATTTTCGTAATACATTTGGGACTTTGGGG</u>	Hélice 4 de <i>dni2+</i> para TOXCAT
H4F-R (2)	<u>GATCCCAAAGTCCCAAATGTATTAGCGAAAATAGCAAA AAGAATCCACTGGAATCCACCCAAAACCTGCTGCG</u>	Hélice 4 de <i>dni2+</i> para TOXCAT
H3-F mut	<u>CTAGCTGGTCAATAAGTTGTTAACTACTAGTACAGCCGC CTGTTTGCTTTTACTACTCCAAATGCTTTTAGCTGG</u>	Hélice 3 mutada de <i>dni2+</i> para TOXCAT
H3-R mut	<u>GATCCAGCTAAAAGCATTGGAGTAGTAAAAGCAAACAG GCGGCTGTACTAGTAGTTAAACAACCTATTGACCAG</u>	Hélice 3 mutada de <i>dni2+</i> para TOXCAT

H4-F mut	<u>CTAGCCTAGCAGTTTTTCTGTGGATTTCCCTTGGATTCTTT</u> <u>TTGCTATTTTCGCTAATACATTTGGGACTTTGGGG</u>	Hélice 4 mutada de <i>dni2⁺</i> para TOXCAT
H4-R mut	<u>GATCCCCCAAAGTCCCAAATGTATTAGCGAAAATAGCAAA</u> <u>AAGAATCCAAGGGAAATCCACAGAAAACTGCTAGG</u>	Hélice 4 mutada de <i>dni2⁺</i> para TOXCAT
ToxR-F	GCCATTTGACTCTGCGC	Comprobación de los plásmidos para TOXCAT
ToxR-F(2)	GAGCAAGGTTTTGAAGTCGATGAT	Comprobación de los plásmidos para TOXCAT
MBP-R	GCCGTTAATCCAGATTTACCA	Comprobación de los plásmidos para TOXCAT
Dni1-134F	GCTTACTGAAGGCTTTCACG	Comprobación mutagénesis <i>dni1⁺</i>
Dni1RIF	GGGCGTTTGGAATTCCTGAGAAAC	Comprobación mutagénesis <i>dni1⁺</i>
Dni1+2638R	GTTTCAAGTGCGGTAAGTAGA	Comprobación mutagénesis <i>dni1⁺</i>
Dni2-130F	GTCCTCGAAGACAAAGAAAC	Comprobación mutagénesis <i>dni2⁺</i>
Dni2+2854R	GGCATATACATCTGATCGTTTGG	Comprobación mutagénesis <i>dni2⁺</i>

En los oligos que codifican las hélices clonadas en el vector pccKAN que fueron utilizados para el ensayo TOXCAT se marcan con subrayado la secuencia resultante de las digestión con las enzimas *NheI* y *BamHI*. También se resalta en negrita la G adicional que se ha añadido para evitar la modificación de la ORF en el vector.



Bibliografía

- Abmayr, S. M. and Pavlath, G. K.** (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**, 641-56.
- Aghamohammadzadeh, S. and Ayscough, K. R.** (2009). Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat Cell Biol* **11**, 1039-42.
- Aguilar, P. S., Baylies, M. K., Fleissner, A., Helming, L., Inoue, N., Podbilewicz, B., Wang, H. and Wong, M.** (2013). Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet* **29**, 427-37.
- Aguilar, P. S., Engel, A. and Walter, P.** (2007). The plasma membrane proteins Prm1 and Fig1 ascertain fidelity of membrane fusion during yeast mating. *Mol Biol Cell* **18**, 547-56.
- Aguilar, P. S., Heiman, M. G., Walther, T. C., Engel, A., Schwudke, D., Gushwa, N., Kurzchalia, T. and Walter, P.** (2010). Structure of sterol aliphatic chains affects yeast cell shape and cell fusion during mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4170-5.
- Ales, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G.** (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* **1**, 40-4.
- Alvarez, F. J., Douglas, L. M. and Konopka, J. B.** (2009). The Sur7 protein resides in punctate membrane subdomains and mediates spatial regulation of cell wall synthesis in *Candida albicans*. *Commun Integr Biol* **2**, 76-7.
- Alvarez, F. J., Douglas, L. M., Rosebrock, A. and Konopka, J. B.** (2008). The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **19**, 5214-25.
- Anderson, R. G. and Jacobson, K.** (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**, 1821-5.
- Antony, B.** (2006). Membrane deformation by protein coats. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 386-94.
- Arita, Y., Nishimura, S., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Usui, T., Boone, C. and Yoshida, M.** (2011). Microarray-based target identification using drug hypersensitive fission yeast expressing ORFeome. *Mol Biosyst* **7**, 1463-72.
- Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P. and Drubin, D. G.** (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* **137**, 399-416.
- Bagatolli, L. A., Ipsen, J. H., Simonsen, A. C. and Mouritsen, O. G.** (2010). An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog Lipid Res* **49**, 378-89.
- Bagnat, M. and Simons, K.** (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14183-8.
- Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R.** (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-951.
- Berepiki, A., Lichius, A. and Read, N. D.** (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol* **9**, 876-87.
- Bigay, J. and Antony, B.** (2012). Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev Cell* **23**, 886-95.
- Blaise, S., de Parseval, N., Benit, L. and Heidmann, T.** (2003). Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13013-8.
- Boos, W. and Shuman, H.** (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 204-29.
- Brand, A., Shanks, S., Duncan, V. M., Yang, M., Mackenzie, K. and Gow, N. A.** (2007). Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Curr Biol* **17**, 347-52.
- Breitenbach, M., Ralser, M., Perrone, G. G., Iglseder, B., Rinnerthaler, M. and Dawes, I. W.** (2013). Oxidative stress and neurodegeneration: the yeast model system. *Front Biosci (Landmark Ed)* **18**, 1174-93.

- Bretou, M., Jouannot, O., Fanget, I., Pierobon, P., Larochette, N., Gestraud, P., Guillon, M., Emiliani, V., Gasman, S., Desnos, C. et al.** (2014). Cdc42 controls the dilation of the exocytotic fusion pore by regulating membrane tension. *Mol Biol Cell* **25**, 3195-209.
- Brizzio, V., Gammie, A. E., Nijbroek, G., Michaelis, S. and Rose, M. D.** (1996). Cell fusion during yeast mating requires high levels of α -factor mating pheromone. *J Cell Biol* **135**, 1727-1739.
- Calleja, G. B., Yoo, B. Y. and Johnson, B. F.** (1977). Conjugation-induced lysis of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **130**, 512-515.
- Cappellaro, C., Hauser, K., Mrsa, V., Watzele, M., Watzele, G., Gruber, C. and Tanner, W.** (1991). *Saccharomyces cerevisiae* a- and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction. *Embo J* **10**, 4081-8.
- Cartagena-Lirola, H., Duran, A. and Valdivieso, M. H.** (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* *cfr1*⁺ gene participates in mating through a new pathway that is independent of *fus1*⁺. *Yeast* **23**, 375-88.
- Catty, P., de Kerchove d'Exaerde, A. and Goffeau, A.** (1997). The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett* **409**, 325-32.
- Cavinder, B. and Trail, F.** (2012). Role of Fig1, a component of the low-affinity calcium uptake system, in growth and sexual development of filamentous fungi. *Eukaryot Cell* **11**, 978-88.
- Clemente-Ramos, J. Á.** (2006). Estudio del papel del gen *dni2*⁺ en la conjugación de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesina de Licenciatura de la Universidad de Salamanca.
- Clemente-Ramos, J. A., Martin-Garcia, R., Sharifmoghadam, M. R., Konomi, M., Osumi, M. and Valdivieso, M. H.** (2009). The tetraspan protein Dni1p is required for correct membrane organization and cell wall remodelling during mating in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **73**, 695-709.
- Cleves, A. E., Cooper, D. N., Barondes, S. H. and Kelly, R. B.** (1996). A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **133**, 1017-26.
- Colegio, O. R., Van Itallie, C., Rahner, C. and Anderson, J. M.** (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1346-54.
- Contreras, F. X., Ernst, A. M., Wieland, F. and Brugger, B.** (2011). Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Cortes, J. C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sanchez, Y., Duran, A. and Ribas, J. C.** (2005). The novel fission yeast (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci* **118**, 157-74.
- Cortes, J. C., Ishiguro, J., Duran A., and Ribas J.C.** (2002). Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* **115**, 4081-4096.
- Cosson, P., Perrin, J. and Bonifacino, J. S.** (2013). Anchors aweigh: protein localization and transport mediated by transmembrane domains. *Trends Cell Biol* **23**, 511-7.
- Curto, M. A., Sharifmoghadam, M. R., Calpena, E., De Leon, N., Hoya, M., Doncel, C., Leatherwood, J. and Valdivieso, M. H.** (2014). Membrane organization and cell fusion during mating in fission yeast requires multipass membrane protein Prm1. *Genetics* **196**, 1059-76.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chamoun-Emanuelli, A. M., Pecheur, E. I., Simeon, R. L., Huang, D., Cremer, P. S. and Chen, Z.** (2013). Phenothiazines inhibit hepatitis C virus entry, likely by increasing the fluidity of cholesterol-rich membranes. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 2571-81.
- Chapa, Y. L. B., Lee, S., Regan, H. and Sudbery, P.** (2011). The mating projections of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* show key characteristics of hyphal growth. *Fungal Biol* **115**, 547-56.
- Chasis, J. A. and Mohandas, N.** (1992). Red blood cell glycophorins. *Blood* **80**, 1869-79.
- Chen, E. H., Grote, E., Mohler, W. and Vignery, A.** (2007). Cell-cell fusion. *FEBS Lett* **581**, 2181-93.
- Chen, P., Sapperstein, S. K., Choi, J. D. and Michaelis, S.** (1997). Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone a-factor. *J Cell Biol* **136**, 251-69.

- Cheng, X., Zhang, X., Yu, L. and Xu, H.** (2015). Calcium signaling in membrane repair. *Semin Cell Dev Biol* **45**, 24-31.
- Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M.** (2005). Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* **123**, 375-82.
- Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M.** (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 675-83.
- Chernomordik, L. V. and Zimmerberg, J.** (1995). Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 541-7.
- Daleke, D. L.** (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* **44**, 233-42.
- Davey, J.** (1998). Fusion of a fission yeast. *Yeast* **14**, 1529-1566.
- Davies, M. J., Miranda, E., Roussel, B. D., Kaufman, R. J., Marciniak, S. J. and Lomas, D. A.** (2009). Neuroserpin polymers activate NF-kappaB by a calcium signaling pathway that is independent of the unfolded protein response. *J Biol Chem* **284**, 18202-9.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. and Klis, F. M.** (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slit2/Mpk1 MAP kinase and in an Slit2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146 (Pt 9)**, 2121-32.
- Dorer, R., Boone, C., Kimbrough, T., Kim, J. and Hartwell, L. H.** (1997). Genetic analysis of default mating behavior in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **146**, 39-55.
- Douglas, L. M., Wang, H. X., Keppler-Ross, S., Dean, N. and Konopka, J. B.** (2012). Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*. *MBio* **3**.
- Doyle, A., Martin-Garcia, R., Coulton, A. T., Bagley, S. and Mulvihill, D. P.** (2009). Fission yeast Myo51 is a meiotic spindle pole body component with discrete roles during cell fusion and spore formation. *J Cell Sci* **122**, 4330-40.
- Dragsten, P. R., Blumenthal, R. and Handler, J. S.** (1981). Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* **294**, 718-22.
- Dudin, O., Bendezu, F. O., Groux, R., Laroche, T., Seitz, A. and Martin, S. G.** (2015). A formin-nucleated actin aster concentrates cell wall hydrolases for cell fusion in fission yeast. *J Cell Biol* **208**, 897-911.
- Elia, L. and Marsh, L.** (1996). Role of the ABC transporter Ste6 in cell fusion during yeast conjugation. *J Cell Biol* **135**, 741-51.
- Elion, E. A.** (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**, 573-81.
- Elion, E. A., Grisafi, P. L. and Fink, G. R.** (1990). FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* **60**, 649-64.
- Elion, E. A., Trueheart, J. and Fink, G. R.** (1995). Fus2 localizes near the site of cell fusion and is required for both cell fusion and nuclear alignment during zygote formation. *J Cell Biol* **130**, 1283-96.
- Engel, A., Aguilar, P. S. and Walter, P.** (2010). The yeast cell fusion protein Prm1p requires covalent dimerization to promote membrane fusion. *PLoS One* **5**, e10593.
- Engel, A. and Walter, P.** (2008). Membrane lysis during biological membrane fusion: collateral damage by misregulated fusion machines. *J Cell Biol* **183**, 181-6.
- Findley, M. K. and Koval, M.** (2009). Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* **61**, 431-7.
- Finger, C., Escher, C. and Schneider, D.** (2009). The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Sci Signal* **2**, ra56.
- Fink, A., Sal-Man, N., Gerber, D. and Shai, Y.** (2011). Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: principles, advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 974-83.
- Fleet, G. H.** (1991). Cell walls. In *The Yeasts*, vol. 4 (ed. A. H. Rose, Harrison, J.,S.), pp. 199-277. London: Academic Press.

- Fleissner, A., Diamond, S. and Glass, N. L.** (2009). The *Saccharomyces cerevisiae* PRM1 homolog in *Neurospora crassa* is involved in vegetative and sexual cell fusion events but also has postfertilization functions. *Genetics* **181**, 497-510.
- Forster, C.** (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* **130**, 55-70.
- Frost, A., Unger, V. M. and De Camilli, P.** (2009). The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**, 191-6.
- Fujimura, H.** (1990). Molecular cloning of the DAC2/FUS3 gene essential for pheromone-induced G1-arrest of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **18**, 395-400.
- Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A.** (2002). Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* **157**, 1071-81.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K. and Takai, Y.** (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 1221-33.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S.** (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-50.
- Gammie, A. E., Brizzio, V. and Rose, M. D.** (1998). Distinct morphological phenotypes of cell fusion mutants. *Mol Biol Cell* **9**, 1395-410.
- Garcia-Marques, S., Randez-Gil, F., Dupont, S., Garre, E. and Prieto, J. A.** (2016). Sng1 associates with Nce102 to regulate the yeast Pkh-Ypk signalling module in response to sphingolipid status. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 1319-33.
- Garcia-Parajo, M. F., Cambi, A., Torreno-Pina, J. A., Thompson, N. and Jacobson, K.** (2014). Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization. *J Cell Sci* **127**, 4995-5005.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M. et al.** (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-7.
- Golub, E. I.** (1988). 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **16**, 1641.
- Gong, Y., Renigunta, V., Zhou, Y., Sunq, A., Wang, J., Yang, J., Renigunta, A., Baker, L. A. and Hou, J.** (2015). Biochemical and biophysical analyses of tight junction permeability made of claudin-16 and claudin-19 dimerization. *Mol Biol Cell* **26**, 4333-46.
- Gordon, L. M., Sauerheber, R. D. and Esgate, J. A.** (1978). Spin label studies on rat liver and heart plasma membranes: effects of temperature, calcium, and lanthanum on membrane fluidity. *J Supramol Struct* **9**, 299-326.
- Gorman, A. M., Healy, S. J., Jager, R. and Samali, A.** (2012). Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* **134**, 306-16.
- Grebekamper, K. and Galla, H. J.** (1994). Translational diffusion measurements of a fluorescent phospholipid between MDCK-I cells support the lipid model of the tight junctions. *Chem Phys Lipids* **71**, 133-43.
- Grote, E.** (2010). Secretion is required for late events in the cell-fusion pathway of mating yeast. *J Cell Sci* **123**, 1902-12.
- Gulino-Debrac, D.** (2013). Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function. *Tissue Barriers* **1**, e24180.
- Gunzel, D. and Yu, A. S.** (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* **93**, 525-69.
- Gutz, H.** (1967). "Twin meiosis" and other ambivalences in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Science* **158**, 796-8.
- Harris, B. Z. and Lim, W. A.** (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**, 3219-31.
- He, B., Chen, P., Chen, S. Y., Vancura, K. L., Michaelis, S. and Powers, S.** (1991). RAM2, an essential gene of yeast, and RAM1 encode the two polypeptide components of the farnesyltransferase that prenylates a-factor and Ras proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11373-7.

- Heiman, M. G., Engel, A. and Walter, P.** (2007). The Golgi-resident protease Kex2 acts in conjunction with Prm1 to facilitate cell fusion during yeast mating. *J Cell Biol* **176**, 209-22.
- Heiman, M. G. and Walter, P.** (2000). Prm1p, a pheromone-regulated multispreading membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. *J Cell Biol* **151**, 719-730.
- Hemler, M. E.** (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 801-11.
- Horisberger, M. and Rouvet-Vauthey, M.** (1985). Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* **41**, 748-750.
- Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A. S., Hou, M., Paul, D. L., Waldegger, S. and Goodenough, D. A.** (2009). Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15350-5.
- Hsin, J., LaPointe, L. M., Kazy, A., Chipot, C., Senes, A. and Schulten, K.** (2011). Oligomerization state of photosynthetic core complexes is correlated with the dimerization affinity of a transmembrane helix. *J Am Chem Soc* **133**, 14071-81.
- Huberman, L. B. and Murray, A. W.** (2014). A model for cell wall dissolution in mating yeast cells: polarized secretion and restricted diffusion of cell wall remodeling enzymes induces local dissolution. *PLoS One* **9**, e109780.
- Ibarguren, M., Lopez, D. J. and Escriba, P. V.** (2014). The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1518-28.
- Imai, Y. and Yamamoto, M.** (1994). The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner. *Genes Dev* **8**, 328-38.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- Iwaki, T., Tanaka, N., Takagi, H., Giga-Hama, Y. and Takegawa, K.** (2004). Characterization of *end4+*, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **21**, 867-81.
- Jackson, M. B. and Chapman, E. R.** (2006). Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 135-60.
- Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C.** (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-33.
- Jeong, J. and Conboy, I. M.** (2011). Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* **414**, 9-13.
- Jin, H., Carlile, C., Nolan, S. and Grote, E.** (2004). Prm1 prevents contact-dependent lysis of yeast mating pairs. *Eukaryot Cell* **3**, 1664-73.
- Jin, H., McCaffery, J. M. and Grote, E.** (2008). Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. *J Cell Biol* **180**, 813-26.
- Kachar, B. and Reese, T. S.** (1982). Evidence for the lipidic nature of tight junction strands. *Nature* **296**, 464-6.
- Karunakaran, S., Sasser, T., Rajalekshmi, S. and Fratti, R. A.** (2012). SNAREs, HOPS and regulatory lipids control the dynamics of vacuolar actin during homotypic fusion in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* **125**, 1683-92.
- Khakhina, S., Johnson, S. S., Manoharlal, R., Russo, S. B., Blugeon, C., Lemoine, S., Sunshine, A. B., Dunham, M. J., Cowart, L. A., Devaux, F. et al.** (2015). Control of Plasma Membrane Permeability by ABC Transporters. *Eukaryot Cell* **14**, 442-53.
- Kim, J. H., Jin, P., Duan, R. and Chen, E. H.** (2015). Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr Opin Genet Dev* **32**, 162-70.
- Kinnunen, P. K. and Holopainen, J. M.** (2000). Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Biosci Rep* **20**, 465-82.
- Kolmar, H., Hennecke, F., Gotze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F. and Fritz, H. J.** (1995). Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *Embo J* **14**, 3895-904.

- Koval, M.** (2013). Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers* **1**, e24518.
- Kozlov, M. M., McMahon, H. T. and Chernomordik, L. V.** (2010). Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends Biochem Sci* **35**, 699-706.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J. and Blasig, I. E.** (2008). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 631-45.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-80.
- Krug, S. M., Schulzke, J. D. and Fromm, M.** (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol* **36**, 166-76.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. and Zakour, R. A.** (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- Kurahashi, H., Imai, Y. and Yamamoto, M.** (2002). Tropomyosin is required for the cell fusion process during conjugation in fission yeast. *Genes Cells.* **7**, 375-384.
- Kushner, R. S.** (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. Amsterdam: Elsevier.
- Laffian, I. and Hallett, M. B.** (2007). Lipid-protein cargo transfer: a mode of direct cell-to-cell communication for lipids and their associated proteins. *J Cell Physiol* **210**, 336-42.
- Lahiri, S., Toulmay, A. and Prinz, W. A.** (2015). Membrane contact sites, gateways for lipid homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 82-7.
- Lal-Nag, M. and Morin, P. J.** (2009). The claudins. *Genome Biol* **10**, 235.
- Lasserre, J. P., Dautant, A., Aiyar, R. S., Kucharczyk, R., Glatigny, A., Tribouillard-Tanvier, D., Rytka, J., Blondel, M., Skoczen, N., Reynier, P. et al.** (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech* **8**, 509-26.
- Launhardt, H., Hinnen, A. and Munder, T.** (1998). Drug-induced phenotypes provide a tool for the functional analysis of yeast genes. *Yeast* **14**, 935-42.
- Lee, D. B., Jamgotchian, N., Allen, S. G., Abeles, M. B. and Ward, H. J.** (2008). A lipid-protein hybrid model for tight junction. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F1601-12.
- Lemmon, M. A.** (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 99-111.
- Leupold, U.** (1949). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. Zurich. Thesis. Zurich
- Leupold, U.** (1958). Studies on recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **23**, 161-70.
- Lindau, M. and Almers, W.** (1995). Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 509-17.
- Liu, H. and Bretscher, A.** (1992). Characterization of TPM1 disrupted yeast cells indicates an involvement of tropomyosin in directed vesicular transport. *J Cell Biol* **118**, 285-99.
- Lock, A., Forfar, R., Weston, C., Bowsher, L., Upton, G. J., Reynolds, C. A., Ladds, G. and Dixon, A. M.** (2014). One motif to bind them: A small-XXX-small motif affects transmembrane domain 1 oligomerization, function, localization, and cross-talk between two yeast GPCRs. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 3036-51.
- Lopez-Marques, R. L., Poulsen, L. R., Hanisch, S., Meffert, K., Buch-Pedersen, M. J., Jakobsen, M. K., Pomorski, T. G. and Palmgren, M. G.** (2010). Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase complex reside in the catalytic ALA alpha-subunit. *Mol Biol Cell* **21**, 791-801.
- Marco, E., Wedlich-Soldner, R., Li, R., Altschuler, S. J. and Wu, L. F.** (2007). Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell* **129**, 411-22.
- Marsh, D.** (2008). Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1545-75.

- Martens, S. and McMahon, H. T.** (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 543-56.
- Martin, S. G. and Chang, F.** (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol* **16**, 1161-70.
- Mata, J. and Bahler, J.** (2006). Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15517-22.
- Mata, J., Lyne, R., Burns, G. and Bähler, J.** (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nature Genet.* **32**, 143-147.
- Mattila, P. K., Feest, C., Depoil, D., Treanor, B., Montaner, B., Otipoby, K. L., Carter, R., Justement, L. B., Bruckbauer, A. and Batista, F. D.** (2013). The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling. *Immunity* **38**, 461-74.
- Maundrell, K.** (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130.
- McLaughlin, S. and Murray, D.** (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**, 605-11.
- McLeod, M., Stein, M. and Beach, D.** (1987). The product of the *mei3+* gene, expressed under control of the mating- type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *Embo J* **6**, 729-736.
- Merlini, L., Dudin, O. and Martin, S. G.** (2013). Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol* **3**, 130008.
- Mitchison, J. M. and Nurse, P.** (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **75**, 357-376.
- Mitic, L. L., Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M.** (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G250-4.
- Mohler, W. A., Shemer, G., del Campo, J. J., Valansi, C., Opoku-Serebuoh, E., Scranton, V., Assaf, N., White, J. G. and Podbilewicz, B.** (2002). The type I membrane protein EFF-1 is essential for developmental cell fusion. *Dev Cell* **2**, 355-62.
- Moreno, M. B., Duran, A. and Ribas, J. C.** (2000). A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* **16**, 861-72.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. and Tsukita, S.** (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 511-6.
- Mulvihill, D. P. and Hyams, J. S.** (2002). Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci* **115**, 3575-86.
- Muller, E. M., Locke, E. G. and Cunningham, K. W.** (2001). Differential regulation of two Ca(2+) influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **159**, 1527-38.
- Muller, E. M., Mackin, N. A., Erdman, S. E. and Cunningham, K. W.** (2003). Fig1p facilitates Ca²⁺ influx and cell fusion during mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **278**, 38461-38469.
- Nern, A. and Arkowitz, R. A.** (2000). G proteins mediate changes in cell shape by stabilizing the axis of polarity. *Mol Cell* **5**, 853-64.
- Nicolson, G. L.** (1976). Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim Biophys Acta* **458**, 1-72.
- Nicolson, G. L.** (2013). The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1451-66.
- Nielsen, O.** (2004). Mating-type control and differentiation. In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*, (ed. R. Egel), pp. 281-296. Heidelberg: Springer.
- Norman, L. L., Brugues, J., Sengupta, K., Sens, P. and Aranda-Espinoza, H.** (2010). Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells. *Biophys J* **99**, 1726-33.

- Obara, T., Nakafuku, M., Yamamoto, M. and Kaziro, Y. (1991). Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein alpha subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating and sporulation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5877-81.
- Olivera-Couto, A. and Aguilar, P. S. (2012). Eisosomes and plasma membrane organization. *Mol Genet Genomics* **287**, 607-20.
- Olmo, V. N. and Grote, E. (2010a). Prm1 functions as a disulfide-linked complex in yeast mating. *J Biol Chem* **285**, 2274-83.
- Olmo, V. N. and Grote, E. (2010b). Prm1 targeting to contact sites enhances fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **9**, 1538-48.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. and Rothstein, R. J. (1983). Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods Enzymol* **101**, 228-245.
- Otsubo, Y. and Yamamoto, M. (2012). Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *J Cell Sci* **125**, 2789-93.
- Pahl, H. L. (1999). Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol Rev* **79**, 683-701.
- Palma-Guerrero, J., Leeder, A. C., Welch, J. and Glass, N. L. (2014). Identification and characterization of LFD1, a novel protein involved in membrane merger during cell fusion in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **92**, 164-82.
- Palma-Guerrero, J., Zhao, J., Goncalves, A. P., Starr, T. L. and Glass, N. L. (2015). Identification and characterization of LFD-2, a predicted fringe protein required for membrane integrity during cell fusion in *neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **14**, 265-77.
- Pandey, K. N. (2010). Small peptide recognition sequence for intracellular sorting. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 611-20.
- Parton, R. G. and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185-94.
- Paszek, M. J., DuFort, C. C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J. K., Godula, K., Hudak, J. E., Lakins, J. N., Wijekoon, A. C., Cassereau, L. et al. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* **511**, 319-25.
- Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**, 191-203.
- Petersen, J., Heitz, M. J. and Hagan, I. M. (1998a). Conjugation in *S. pombe*: identification of a microtubule-organising centre, a requirement for microtubules and a role for Mad2. *Curr. Biol.* **8**, 963-966.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R. and Hagan, I. M. (1998b). F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **111**, 867-876.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R. and Hagan, I. M. (1998c). FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J Cell Biol* **141**, 1217-1228.
- Petersen, J., Weilguny, D., Egel, R. and Nielsen, O. (1995). Characterization of *fus1* of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol Cell Biol* **15**, 3697-3707.
- Pfau, S. J. and Amon, A. (2012). Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO Rep* **13**, 515-27.
- Phillips, J. and Herskowitz, I. (1997). Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **138**, 961-974.
- Phillips, G. N., Jr. (1992). What is the pitch of the alpha-helical coiled coil? *Proteins* **14**, 425-9.
- Piontek, J., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., Yu, D., Turner, J. R., Gehring, C., Rahn, H. P. et al. (2011). Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3903-18.
- Podbilewicz, B. (2014). Virus and cell fusion mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 111-39.
- Pomorski, T., Hrafnsdottir, S., Devaux, P. F. and van Meer, G. (2001). Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 139-48.
- Popa, C., Coll, N. S., Valls, M. and Sessa, G. (2016). Yeast as a Heterologous Model System to

Uncover Type III Effector Function. *PLoS Pathog* **12**, e1005360.

Proszynski, T. J., Klemm, R., Bagnat, M., Gaus, K. and Simons, K. (2006). Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. *J Cell Biol* **173**, 861-6.

Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y. and Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 559-91.

Qin, H., Diener, D. R., Geimer, S., Cole, D. G. and Rosenbaum, J. L. (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J Cell Biol* **164**, 255-66.

Quiroga, R., Trenchi, A., Gonzalez Montoro, A., Valdez Taubas, J. and Maccioni, H. J. (2013). Short transmembrane domains with high-volume exoplasmic halves determine retention of Type II membrane proteins in the Golgi complex. *J Cell Sci* **126**, 5344-9.

Riezman, H. (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell* **40**, 1001-9.

Roberts, R. L. and Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**, 2974-2985.

Ron, D. and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-29.

Rossa, J., Ploeger, C., Vorreiter, F., Saleh, T., Protze, J., Gunzel, D., Wolburg, H., Krause, G. and Piontek, J. (2014). Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (ECL2) segments. *J Biol Chem* **289**, 7641-53.

Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 202-11.

Russ, W. P. and Engelman, D. M. (1999). TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 863-8.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor laboratory press.

Sapir, A., Choi, J., Leikina, E., Avinoam, O., Valansi, C., Chernomordik, L. V., Newman, A. P. and Podbilewicz, B. (2007). AFF-1, a FOS-1-regulated fusogen, mediates fusion of the anchor cell in *C. elegans*. *Dev Cell* **12**, 683-98.

Sartorel, E., Barrey, E., Lau, R. K. and Thorner, J. (2014). Plasma membrane aminoglycerolipid flippase function is required for signaling competence in the yeast mating pheromone response pathway. *Mol Biol Cell* **26**, 134-50.

Sato, M., Dhut, S. and Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **22**, 583-91.

Scott, B. J., Neidt, E. M. and Kovar, D. R. (2011). The functionally distinct fission yeast formins have specific actin-assembly properties. *Mol Biol Cell* **22**, 3826-39.

Schneider, D., Finger, C., Prodohl, A. and Volkmer, T. (2007). From interactions of single transmembrane helices to folding of alpha-helical membrane proteins: analyzing transmembrane helix-helix interactions in bacteria. *Curr Protein Pept Sci* **8**, 45-61.

Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., Voss, C. and Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol* **187**, 525-36.

Senes, A., Gerstein, M. and Engelman, D. M. (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* **296**, 921-36.

Shaner, N. C., Steinbach, P. A. and Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-9.

Sharifmoghadam, M. R., Bustos-Sanmamed, P. and Valdivieso, M. H. (2006). The fission yeast Map4 protein is a novel adhesin required for mating. *FEBS Lett* **580**, 4457-62.

Sharifmoghadam, M. R. and Valdivieso, M. H. (2008). The *Schizosaccharomyces pombe* Map4 adhesin is a glycoprotein that can be extracted from the cell wall with alkali but not with beta-glucanases and requires the C-terminal DIPSY domain for function. *Mol Microbiol* **69**, 1476-90.

- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C. and Snyder, M.** (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 4053-69.
- Sieber, J. J., Willig, K. I., Kutzner, C., Gerding-Reimers, C., Harke, B., Donnert, G., Rammner, B., Eggeling, C., Hell, S. W., Grubmuller, H. et al.** (2007). Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* **317**, 1072-6.
- Simons, K. and Fuller, S. D.** (1985). Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 243-88.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72.
- Simske, J. S.** (2013). Claudins reign: The claudin/EMP/PMP22/gamma channel protein family in *C. elegans*. *Tissue Barriers* **1**, e25502.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31.
- Sipiczki, M.** (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* **1**, REVIEWS1011.
- Snaith, H. A. and Sawin, K. E.** (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**, 647-51.
- Steinberg, G.** (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell* **6**, 351-60.
- Stern, B. and Nurse, P.** (1997). Fission yeast pheromone blocks S-phase by inhibiting the G1 cyclinB-p34cdc2 kinase. *EMBO J.* **16**, 534.
- Sutovsky, P.** (2009). Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev Mol Med* **11**, e11.
- Teese, M. G. and Langosch, D.** (2015). Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry* **54**, 5125-35.
- Teissier, E. and Pecheur, E. I.** (2007). Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur Biophys J* **36**, 887-99.
- Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M.** (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* **5**, 60-73.
- Trimble, W. S. and Grinstein, S.** (2015). Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *J Cell Biol* **208**, 259-71.
- Trueheart, J., Boeke, J. D. and Fink, G. R.** (1987). Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol* **7**, 2316-2328.
- Turi, T. G., Webster, P. and Rose, J. K.** (1994). Brefeldin A sensitivity and resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. Isolation of multiple genes conferring resistance. *J Biol Chem* **269**, 24229-24236.
- Turner, J. R., Buschmann, M. M., Romero-Calvo, I., Sailer, A. and Shen, L.** (2014). The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Semin Cell Dev Biol* **36**, 204-12.
- van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., Vermeij-Keers, C., Schutte, B., Borgers, M. and Ramaekers, F. C.** (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci* **114**, 3631-42.
- Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M.** (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* **68**, 403-29.
- Van Leeuwen, M. R., Smant, W., de Boer, W. and Dijksterhuis, J.** (2008). Filipin is a reliable *in situ* marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation. *J Microbiol Methods* **74**, 64-73.
- van Meer, G., Gumbiner, B. and Simons, K.** (1986). The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature* **322**, 639-41.
- van Meer, G. and Simons, K.** (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* **36**, 51-8.
- Vance, J. E.** (2008). Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J Lipid Res* **49**, 1377-87.

- Viaud, J., Mansour, R., Antkowiak, A., Mujalli, A., Valet, C., Chicanne, G., Xuereb, J. M., Terrisse, A. D., Severin, S., Gratacap, M. P. et al.** (2016). Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie*.
- Vida, T. A. and Emr, S. D.** (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-92.
- Wachtler, V., Rajagopalan, S. and Balasubramanian, M. K.** (2003). Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**, 867-74.
- Wang, H. X., Douglas, L. M., Vesela, P., Rachel, R., Malinsky, J. and Konopka, J. B.** (2016). Eisosomes promote the ability of Sur7 to regulate plasma membrane organization in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*.
- White, J. M. and Rose, M. D.** (2001). Yeast mating: getting close to membrane merger. *Curr Biol* **11**, R16-20.
- Wong, J. L., Koppel, D. E., Cowan, A. E. and Wessel, G. M.** (2007). Membrane hemifusion is a stable intermediate of exocytosis. *Dev Cell* **12**, 653-9.
- Wood, V. Gwilliam, R. Rajandream, M. A. Lyne, M. Lyne, R. Stewart, A. Sgouros, J. Peat, N. Hayles, J. Baker, S. et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-80.
- Yamamoto, M., Imai, Y. and Watanabe, Y.** (1997). Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 3, Cell cycle and cell biology (eds J. R. Pringle J. R. Broach and E. W. Jones), pp. 1037-1106. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M. and Sanchez-Madrid, F.** (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* **19**, 434-46.
- Ydenberg, C. A., Stein, R. A. and Rose, M. D.** (2012). Cdc42p and Fus2p act together late in yeast cell fusion. *Mol Biol Cell* **23**, 1208-18.
- Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A. and Grinstein, S.** (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* **319**, 210-3.
- Young, M. E., Karpova, T. S., Brugger, B., Moschenross, D. M., Wang, G. K., Schneiter, R., Wieland, F. T. and Cooper, J. A.** (2002). The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol* **22**, 927-34.
- Zaitsevskaya-Carter, T. and Cooper, J. A.** (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *Embo J* **16**, 1318-31.
- Zajchowski, L. D. and Robbins, S. M.** (2002). Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem* **269**, 737-52.
- Zhang, N. N., Dudgeon, D. D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E. and Cunningham, K. W.** (2006). Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol Biol Cell* **17**, 3409-22.
- Zhang, S., Zheng, H., Long, N., Carbo, N., Chen, P., Aguilar, P. S. and Lu, L.** (2013). FigA, a putative homolog of low-affinity calcium system member Fig1 in *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in growth and asexual and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **13**, 295-303.
- Zhou, C., Yang, Y. and Jong, A. Y.** (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173.
- Ziolkowska, N. E., Christiano, R. and Walther, T. C.** (2012). Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol* **22**, 151-8.

“Todo llega, todo pasa”

ecd/

