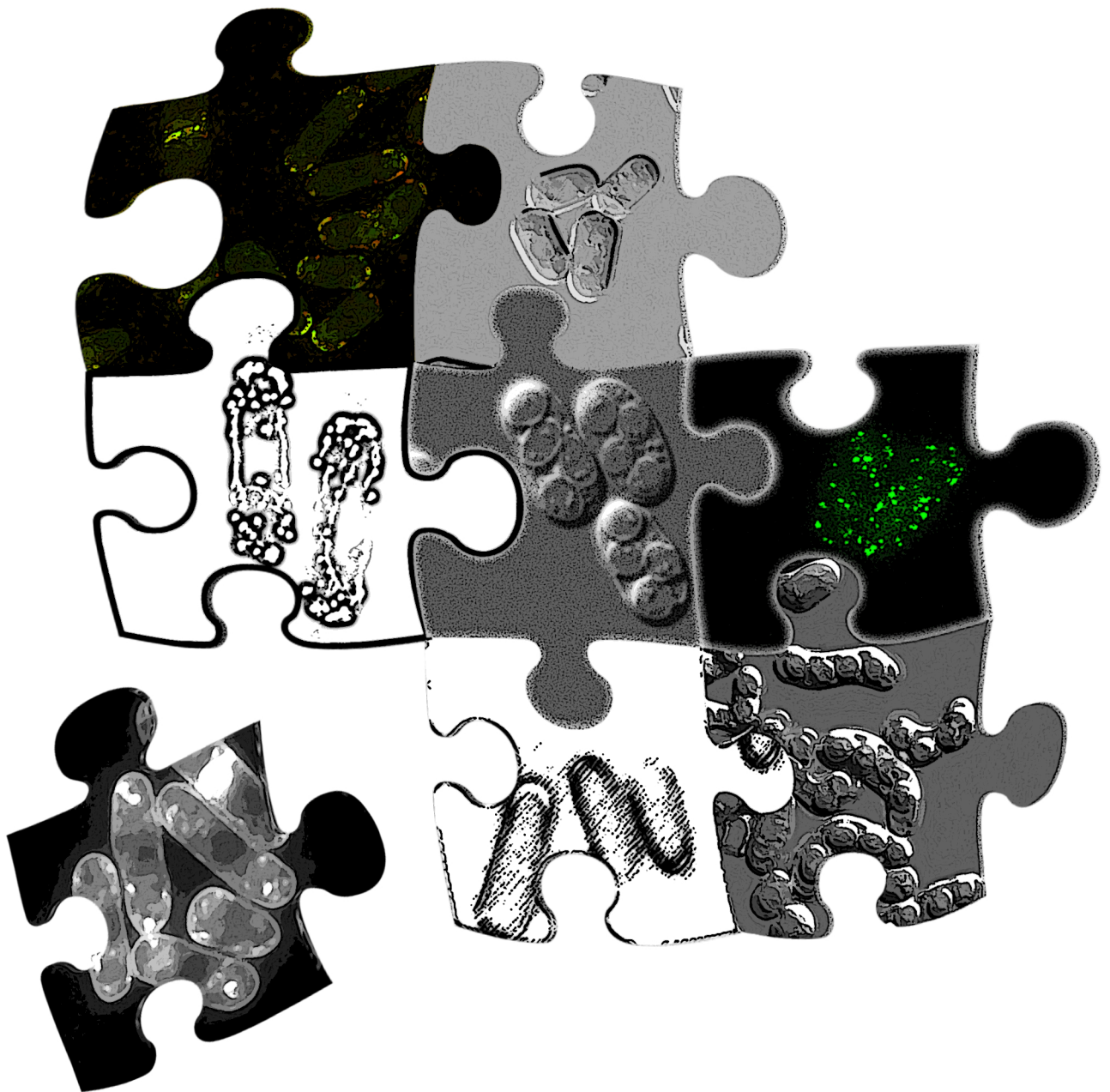




Caracterización de la $\beta(1,3)$ -endoglucanasa *eng2* en *Schizosaccharomyces pombe*. Dehiscencia y crecimiento polarizado



Agradecimientos

A los Dres. Francisco J. del Rey Iglesias y Carlos Rodríguez-Vázquez de Aldana, por elegirme, por confiar en mí y por darme la oportunidad de llegar a este momento. A Paco, porque aunque “*Mesi es Dios y Ronaldo sólo un Cristiano*” o “*lo único INEQUÍVOCO es que el Barça es muy superior al Madrid*”, estos cuatro años de Tesis han sido como un “recreo”. A Carlos, por tu infinita paciencia y disponibilidad, por tu ayuda y apoyo en todo momento (jamás olvidaré el e-mail de mi primera presentación en inglés), por dejarme hacer, por darme una “*colleja*” en el momento preciso, por TODO.

Al Director del IMB, Dr. Ángel Durán, por intentar que todo funcione lo mejor posible. A todo el personal del IMB: Alegría, Paco Soriano, Miguel, Manolo, Paco Alonso, Carlos Belinchón, las chicas de cocina, Carmen Castro, todo sería mucho más difícil sin vosotros.

A mis compañeros de laboratorio: a Encarna (porque para todos nosotros siempre serás nuestra “*Reina Madre*”), a Evita y a María (porque sin vosotras esto no habría sido ni la mitad de divertido), a Yoli (porque cuatro manos hacen más que dos y dos cabezas piensan más que una), a Ana Belén (por dejar el listón tan alto), a Alberto (por el gobierno en mayoría), a Belén y “*Doña Dianita*” (por ayudarme en lo más complicado de la Tesis, las portadas).

Al Dr. Fernando Leal, porque si todas las oportunidades son importantes la primera es la más valiosa, de no haber sido por aquellos “*bichillos malolientes*” yo no habría llegado a Doctor. Al Dr. José Manuel Fernández Ábalos, que me enseñó que media hora de charla científica alrededor de una cerveza vale más que una semana haciendo “*mini-prep*”. A mis compañeros de café: Jorge, Ana, Ana MTG, Marga, Sergio, Laura, Javi lentejas, Diego, Andrea, Barrera y alguno que se seguro que se me olvida, sois la leche.

A todos los becarios y compañeros del IMB, que no se apague nunca el “*espíritu becario*”. A la Dra. Pilar Pérez, siempre dispuesta a prestar una cepa, compartir información o discutir una idea. Al Dr. Ken Sawin, con el que aprendí la importancia de una buena microscopía y su pasión por la ciencia es un ejemplo para mí.

A Patri, por tu cariño, por tu apoyo, por tus ideas, por soportarme en esta “*montaña rusa*” que ha sido la Tesis sin importarte si era de día o de noche. Simplemente GRACIAS.

A mi familia, porque aunque no siempre pensemos de la misma manera sé que todo lo que soy y lo que llegue a ser os lo debo a vosotros. Os quiero.

Abreviaturas, acrónimos y siglas

ACF = *Assembly Complementing Factor*

ADP = Adenosin di-fosfato

AMPc = Adenosin mono-fosfato cíclico

arp = *actin-related protein*

ATP = Adenosin tri-fosfato

BAR = *Bin/Amphiphysin/Rvs-homology*

CAZy = *Carbohydrate-Active Enzymes*

CC = *Coiled-Coil*

cdc = Ciclo de División Celular (*Cell Division Cycle*)

CDK = Kinasa Dependiente de Ciclina (*Cyclin-Dependent Kinase*)

CFP = Proteína Fluorescente Cian

DAD = *Diaphanous Autoregulatory Domain*

DD = Dominio de Dimerización

DIC = *Differential Interference Contrast*

DID = *Diaphanous Inhibitory Domain*

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DRF = *Diaphanous-Related Formin*

DYRK = *Dual specificity - tYrosine - phosphorylation Regulated protein Kinase*

FH1 = *Formin Homology 1*

FH2 = *Formin Homology 2*

GAP = *GTPase Activating Protein*

GBD = Dominio de unión a GTPasas

GBP = Proteína de unión a glucanos

GEF = *Guanine nucleotide Exchange Factor*

GFP = Proteína Fluorescente Verde

GH81 = Glicosil Hidrolasas de la familia 81

GST = Glutation S Transferasa

Kb = Kilobase

Isb = *Las17 Binding Protein*

Mb = Megabase

MBC = Metil 2-Benzimidazol Carbamato

mCherry = Versión de la Proteína Fluorescente Roja (RFP)

MDa = MegaDaltons

MOPS = Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

MTOC = Centro organizador de microtúbulos (*Microtubule Organizing Centres*)

NETO = Inicio de crecimiento por el polo nuevo (*New End Take Off*)

NPF = *Nucleation Promoting Factor*

N-WASP = *Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*

OETO = Inicio de crecimiento por el polo viejo (*Old End Take Off*)

PAA = Distribución de microtúbulos tras anafase (*Post-Anaphase Array*)

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PBS = Tampón Fosfato Salino

PCH = *Pombe Cdc15 Homology*

PIP₂ = Fosfoinositósidos

PNPG = Paranitrofenil-β-D-glucopiranososa

RNA = Ácido ribonucleico

SCAR/WAVE = *Suppressor of cAR/ WASP family Verprolin-homologous protein (Nucleation Promoting Factor)*

SH3 = Dominio de homología a Src3 (*Src Homology 3*)

SPB = Cuerpo polar del huso (*Spindle Pole Body*)

TAE = Tampón Tris-acético EDTA

ts = Termosensible

WASP = *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*

WD40 = *WD or β-transducin repeats*

WH2 = *WASP Homology 2*

WIP = *WASP-Interacting Protein*

YFP = Proteína Fluorescente Amarilla

NOTA: A lo largo de los siguientes capítulos, las proteínas de *S. pombe* serán referidas en minúsculas (eng2), mientras que las proteínas de *S. cerevisiae* serán referidas en mayúsculas (Eng2/Acf2). En caso de que exista algún posible conflicto, las proteínas irán precedidas del prefijo Sp para *S. pombe*, Sc para *S. cerevisiae*, Ca para *C. albicans* o Af para *A. fumigatus*.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. La ciencia de hoy | 1 |
| 2. Las levaduras, el primer microorganismo domesticado | 1 |
| 2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Schizosaccharomyces pombe</i>. Leland H. Hartwell y Sir Paul Nurse | 1 |
| 3. Las levaduras de fisión | 2 |
| 3.1 <i>S. pombe</i>, el origen de un organismo modelo | 3 |
| 3.2 El genoma de <i>S. pombe</i> | 3 |
| 3.3 Un mundo de posibilidades | 4 |
| 4. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i> | 4 |
| 4.1 Ciclo vegetativo | 5 |
| 4.2 Red molecular que “regula” el ciclo vegetativo | 7 |
| 4.2.1 Maquinaria de polarización celular | 8 |
| a) Complejo <i>tea1-tea4</i> , la primera piedra | 8 |
| b) Activación del crecimiento | 11 |
| c) <i>mal3-moe1-for3</i> , una alternativa al complejo <i>tea1-tea4</i> | 13 |
| 4.2.2 Citoesqueleto de actina | 13 |
| a) Mecanismo de acción de las forminas | 13 |
| b) Forminas en <i>S. pombe</i> | 15 |
| - Cables de actina y <i>for3</i> | 15 |
| - Anillo contráctil de actomiosina y <i>cdc12</i> | 17 |
| c) El complejo <i>arp2/3</i> : estructura y mecanismo de acción | 18 |
| - Estructura cristalográfica del complejo <i>arp2/3</i> | 18 |
| - Cambios conformacionales del complejo. Activación e inactivación | 19 |
| - Interacción filamento-complejo <i>arp2/3</i> . Ramificación | 20 |
| - Factores Promotores de la Nucleación (NPFs) | 22 |
| - El complejo <i>arp2/3</i> a nivel celular. Endocitosis | 23 |
| d) El complejo <i>arp2/3</i> y la endocitosis en <i>S. pombe</i> | 25 |
| e) Otras proteínas relacionadas con la actina | 26 |
| 4.2.3 Microtúbulos | 28 |
| a) El complejo de la γ -tubulina | 28 |
| b) <i>mto1</i> y <i>mto2</i> | 29 |
| c) Los microtúbulos y su función celular | 29 |
| 4.3 Ciclo sexual | 30 |
| 4.4 Programa transcripcional del ciclo sexual | 31 |
| 4.5 Regulación transcripcional en cascadas | 32 |
| 4.5.1 <i>ste11</i> , control de la respuesta a cambios nutricionales | 32 |
| 4.5.2 <i>rep1</i> regula la expresión de los genes tempranos | 32 |
| 4.5.3 <i>mei4</i> , el epicentro de la cascada | 32 |
| 4.5.4 Control de los genes tardíos | 32 |
| 4.6 Morfogénesis durante el ciclo sexual | 33 |

| | |
|--|------------|
| 5. Enzimas hidrolíticas, β-glucanasas | 34 |
| 5.1 Familia 81 de las glicosil hidrolasas | 36 |
| 5.2 Familia 81 de las glicosil hidrolasas en <i>S. pombe</i> . <i>eng1</i> y <i>eng2</i> | 37 |
| OBJETIVOS | 39 |
| RESULTADOS | 41 |
| CAPÍTULO I: <i>eng2</i> participa en la organización del citoesqueleto de actina, el crecimiento polarizado y la endocitosis en <i>S. pombe</i> | |
| 1. Introducción y antecedentes | 43 |
| 2. Análisis de la estructura y secuencia de <i>eng2</i> en <i>S. pombe</i> | 44 |
| 3. <i>eng2</i> participa en la transición del crecimiento monopolar a bipolar | 45 |
| 4. <i>eng2</i> no afecta a la localización del polarisoma, pero sí a otras proteínas relacionadas con el crecimiento polarizado | 50 |
| 5. Localización y estudio de la dinámica de <i>eng2</i> durante el ciclo vegetativo | 52 |
| 6. El extremo amino de <i>eng2</i> es esencial para su función durante el ciclo vegetativo | 59 |
| 7. <i>eng2</i> interacciona con una de las subunidades del complejo arp2/3 | 63 |
| 8. <i>eng2</i> forma parte de la cascada de regulación del complejo arp2/3 | 66 |
| 9. La movilidad del complejo arp2/3 depende de <i>eng2</i> | 69 |
| 10. <i>eng2</i> participa en los procesos de endocitosis en <i>S. pombe</i> | 72 |
| CAPÍTULO II: La β-glucanasa <i>eng2</i> es necesaria para la disolución de la pared del asca durante el proceso de esporulación en <i>S. pombe</i> | |
| Antecedentes | 79 |
| Objetivos | 79 |
| Resultados. | 79 |
| 1.- <i>eng2</i> se induce durante el proceso de esporulación en <i>S. pombe</i> | 79 |
| 2.- <i>eng2</i> no presenta un papel relevante durante las primeras etapas del ciclo sexual | 79 |
| 3.- <i>eng2</i> es necesaria para la disolución de la pared del asca | 80 |
| 4.- La actividad $\beta(1,3)$ -glucanasa durante esporulación depende de <i>eng2</i> y es necesaria para la liberación de las esporas | 80 |
| 5.- <i>eng2</i> se localiza en el epiplasma de la célula desde donde lleva a cabo su función | 81 |
| β -glucanase <i>eng2</i> is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 83 |
| DISCUSIÓN | 93 |
| <i>eng2</i> interviene en la regulación del crecimiento polarizado en <i>S. pombe</i> | 94 |
| <i>eng2</i> , una nueva proteína implicada en el proceso de endocitosis | 97 |
| Localización de <i>eng2</i> durante el ciclo vegetativo | 99 |
| <i>eng2</i> y el complejo arp2/3 | 101 |
| <i>eng2</i> durante el ciclo vegetativo en <i>S. pombe</i> , modelo espacio-temporal | 104 |
| <i>eng2</i> funciona como una $\beta(1,3)$ -endoglucanasa durante el ciclo sexual en <i>S. pombe</i> | 106 |
| <i>eng2</i> es una proteína multifuncional o “moonlighting protein” en <i>S. pombe</i> | 107 |
| CONCLUSIONES | 111 |

| | |
|--|------------|
| MATERIALES Y MÉTODOS | 113 |
| 1. Microorganismos utilizados | 113 |
| 2. Medios y condiciones de cultivo | 113 |
| 2.1. Crecimiento de <i>S. pombe</i> | 113 |
| 2.1.1. Crecimiento vegetativo de <i>S. pombe</i> | 113 |
| 2.1.2. Sincronización de los cultivos celulares de <i>S. pombe</i> durante el crecimiento vegetativo | 113 |
| 2.1.3. Conjugación y esporulación de <i>S. pombe</i> | 114 |
| 2.2. Crecimiento de <i>E. coli</i> | 114 |
| 3. Procedimientos generales de clonación molecular. Vectores de <i>S. pombe</i> | 114 |
| 3.1. Obtención de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 114 |
| 3.2. Manipulación del DNA. | 115 |
| 3.3 Plásmidos utilizados en el estudio de <i>eng2</i>. | 115 |
| 3.4. Transformación de bacterias y levaduras | 116 |
| 3.4.1. Transformación de <i>E. coli</i> . | 116 |
| 3.4.2. Transformación de levaduras | 116 |
| 4. Métodos genéticos | 116 |
| 4.1. Reemplazamientos génicos. | 116 |
| 5. Detección y análisis de proteínas | 116 |
| 5.1. Obtención de los extractos proteicos y valoración de la concentración de proteínas. | 116 |
| 5.2. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas (Western-blot). | 117 |
| 6. Técnicas microscópicas | 117 |
| 6.1. Microscopía óptica. | 117 |
| 6.2. Microscopía de fluorescencia <i>in vivo</i>. | 118 |
| 6.3. Microscopía confocal. | 119 |
| 7. Recursos bioinformáticos | 119 |
| | |
| ANEXO I | 121 |
| | |
| ANEXO II | 125 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 127 |

Introducción

1. La ciencia de hoy

Muy posiblemente, la ciencia no se podría haber desarrollado tal y como hoy la conocemos de no haber sido por los llamados “*Organismos Modelo*”, un grupo de seres vivos que han sido seleccionados por los investigadores, de entre millones de posibilidades, por presentar una característica común, “*ser prácticos*”. Un organismo modelo debe ser barato y abundante, con una gran facilidad para propagarse gracias a unos cortos periodos de gestación y una prolífica descendencia, fácil de manipular en el laboratorio y con un genoma relativamente sencillo y pequeño.

Muchos son los organismos que podrían caer dentro de esta descripción; sin embargo, sólo algunos han sido seleccionados. Dentro de ellos cabe destacar a *Escherichia coli*, una bacteria presente en la flora intestinal capaz de generar problemas gastrointestinales; *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, dos levaduras con una gran importancia desde el punto de vista científico y biotecnológico; *Caenorhabditis elegans*, un pequeño gusano utilizado como modelo desde principios de los años 60; *Drosophila melanogaster*, la omnipresente mosca de la fruta; *Danio rerio*, huésped habitual de infinidad de acuarios de todo el mundo; *Arabidopsis thaliana*, una pequeña planta que sirve de modelo para todo el reino vegetal; o *Mus musculus*, un pequeño roedor alrededor del cual se mueven más de 200 millones de dólares al año.

Cada uno de estos organismos modelo es distinto del anterior y, sin embargo, todos ellos contribuyen al progreso en el conocimiento de la biología celular en particular y de la ciencia en general.

2. Las levaduras, el primer microorganismo domesticado

La importancia de estos organismos va más allá de lo puramente científico, ya que han sido capaces de saciar el hambre en el mundo o animar cualquier reunión social gracias a los productos de su fermentación. A pesar de tener

sólo una décima parte del tamaño de un leucocito, muchas de las funciones celulares de organismos superiores están presentes en las levaduras; aproximadamente 200 genes involucrados en enfermedades humanas presentan homólogos en su genoma (Cho y Hofmann, 2004; Foury y Kucej, 2002; Hartwell, 2004; Phillips *et al.*, 2006; Steinmetz *et al.*, 2002).

Muchos científicos han intentado llegar al conocimiento uniendo diferentes piezas como si de un puzzle se tratara. Otros, utilizando técnicas de metagenómica tratan de dibujar un esquema general de los procesos celulares. Tanta es la importancia y conocimientos que se tienen, que actualmente se sabe más del control del ciclo celular gracias a las levaduras que a cualquier otro organismo modelo (Fig. 1).

2.1 *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Leland H. Hartwell y Sir Paul Nurse

Desde que a principios de los años 40 Herschel Roman llegase a Seattle con intención de estudiar la genética del maíz y el clima sombrío de la ciudad se lo impidiera, mucho se ha avanzado en el estudio de la levadura *S. cerevisiae*. A finales de los 60 otro investigador, Leland H. Hartwell, encumbró a *S. cerevisiae* dentro de los organismos modelo. Mediante estudios de microscopía, identificó unos 50 mutantes de ciclo celular que fueron definidos como mutantes *cdc* (“*cell division cycle*”). De entre ellos, el mutante *cdc28* ha adquirido una especial relevancia, ya que mostraba alterada su salida de la fase S del ciclo celular. Cdc28 es la subunidad catalítica de la principal proteína quinasa dependiente de ciclo (CDK), que coordina la mayoría de los eventos del ciclo celular, controlando la división celular mediante el control de la tasa y fidelidad de cada uno de los eventos mitóticos (Hartwell *et al.*, 1970; Hartwell *et al.*, 1973; Mendenhall y Hodge, 1998). De forma casi paralela a Hartwell, otro investigador, Sir Paul Nurse, comenzó con el estudio del ciclo celular pero utilizando la levadura de fisión *S. pombe*. Esta levadura, tan distinta genéticamente de *S. cerevisiae* como ambas del ser humano, se divide por fisión (en lugar de por gemación), de

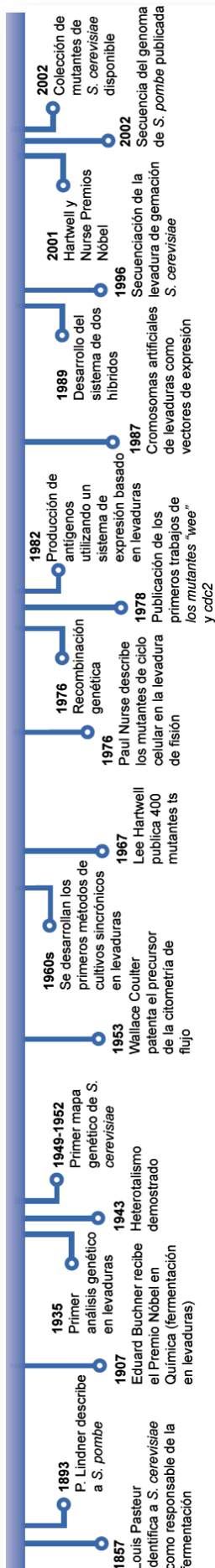


Figura 1.- Cronograma de algunos de los "hitos" más importantes de la historia de la ciencia relacionados con levaduras.

forma similar a como lo hacen las células de eucariotas superiores. *S. pombe* en la naturaleza adopta un estado de vida haploide, en el que la mayor parte de su tiempo lo pasa en fase G2, donde las células disponen de mecanismos para comprobar si la síntesis y reparación del DNA ha ocurrido de forma adecuada.

Mediante el estudio de la tasa de división y el contenido de DNA, el Dr. Nurse identificó una serie de genes implicados en el control de la división, los genes "wee" (pequeño en escocés). De entre ellos cabe destacar el gen *wee1+*, cuya pérdida de función adelanta la entrada en mitosis, por lo que estaría implicado en inhibir la mitosis hasta que la célula alcanza un tamaño apropiado. En escrutinios posteriores se identificó el gen *cdc2+*, una quinasa dependiente de ciclo homóloga a Cdc28 de *S. cerevisiae* y que es capaz de bloquear el ciclo celular tanto en su transición G1-S como en G2-M. Una nueva búsqueda, esta vez con una genoteca de cDNA humano, permitió el aislamiento del gen *CDC2Hs* (también llamado *CDK1*), capaz de corregir el defecto del mutante *cdc2* de *S. pombe*. Todos estos resultados apuntaban hacia la idea de que las bases moleculares del ciclo celular se habían conservado a lo largo de la evolución (Nurse y Thuriaux, 1980; Nurse *et al.*, 1976; Russell y Nurse, 1987).

Por sus trabajos de ciclo celular en levaduras los Drs. Hartwell y Nurse recibieron el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 2001.

3. Las levaduras de fisión

Habitualmente, las levaduras se definen como hongos unicelulares (ocasionalmente dimórficos) sin cuerpos fructíferos, los cuales se

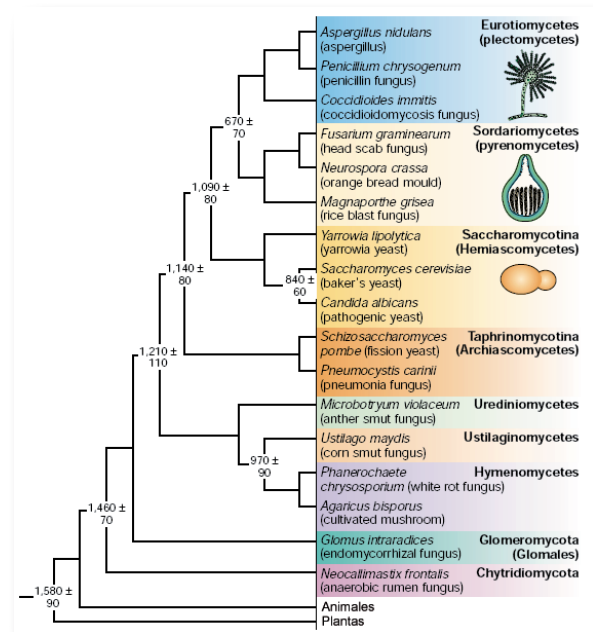


Figura 2.- Clasificación filogenética de "hongos modelo". La longitud de los brazos no es proporcional al tiempo, la divergencia entre las distintas ramas se muestra en millones de años ± el error estándar. Tomado de Hedges (2002).

propagan por gemación (como en el caso de *S. cerevisiae*) o mediante fisión (como *S. pombe*). Dentro de esta definición se podrían incluir una gran variedad de organismos, pertenecientes a los *Ascomycetos* y *Basidiomicetos*, con orígenes filogenéticos muy heterogéneos.

La especie *S. pombe* fue la primera levadura de fisión descrita en 1893 por P. Lindner, y sobre ella se fundó el género *Schizosaccharomyces*. La mayoría de los sistemas taxonómicos incluyen dentro de las levaduras de fisión a *S. pombe* (capaz de generar cuatro esporas), además de *S. japonicus* y *S. octosporus* (capaces de formar ocho esporas). El nombre taxonómico para el género hace referencia a que se trata de una levadura (*-saccharomyces*) y que se divide por fisión (*Schizo-*). En cuanto a la especie, la palabra “*pombe*” proviene del Swahili y su significado es cerveza. Las levaduras del género *Schizosaccharomyces* se han incluido dentro del *phylum Ascomycota*, uno de los mayores *phylum* (con 47420 especies) de hongos verdaderos (Hedges, 2002; Sipiczki, 2000) (Fig. 2).

Mediante el análisis de la secuencia génica, se estima que la distancia evolutiva de las levaduras de fisión con las plantas es de unos 1200 millones de años, de 1000 millones de años con los animales y de entre 330-420 millones de años con la levadura de gemación *S. cerevisiae* (Sipiczki, 2000; Yanagida, 2002). Estudios basados en la secuencia aminoacídica de unas 100 proteínas arrojan unos resultados algo diferentes, estableciendo en unos 1580 millones de años la distancia con plantas, 1460 millones de años con animales y en torno a los 1140 millones de años con *S. cerevisiae* (mediante este tipo de análisis, la distancia entre *S. cerevisiae* y *Candida albicans* se estima en 840 millones de años) (Heckman *et al.*, 2001; Hedges, 2002).

3.1 *S. pombe*, el origen de un organismo modelo

Esta especie fue descrita por primera vez en 1893 por P. Lindner (que la aisló a partir de una cerveza del Este de África) como una levadura cilíndrica, de extremos redondeados, que en ocasiones presentaba tres o más ascosporas

en su interior. En condiciones de carencia de nutrientes adquiriría un menor tamaño, que la hacía similar a la levadura de gemación *S. cerevisiae*.

En la actualidad, la mayoría de las cepas y mutantes utilizados en el laboratorio provienen de la cepa aislada por A. Osterwalder a partir de un vino Francés en 1924. Esta cepa fue identificada como *S. pombe var. liquefaciens*, aunque posteriormente se renombró como *S. pombe var. pombe*. Fue depositada en la colección de levaduras de Delft (Holanda), a partir de la cual, en 1946 y 1947 Urs Leupold reaisló las cepas estándar de *S. pombe* utilizadas en la actualidad como tres tipos sexuales diferentes: una cepa homotálica (o auto-fecundable) con una elevada capacidad fértil capaz de generar un 90% de esporas en condiciones limitantes de nitrógeno (posteriormente denominada como h⁹⁰) y dos cepas heterotálicas de tipo sexual opuesto (llamadas h⁺ y h⁻).

3.2 El genoma de *S. pombe*

En 2002, Wood y colaboradores completaron la secuenciación de su genoma, concluyendo que se trataba del organismo eucariota analizado hasta la fecha con el menor número de genes, 4824 (frente a los aproximadamente 5600 de *S. cerevisiae*). Las 13,8 Mb de su genoma se distribuyen en tres cromosomas: cromosoma I (5,7 Mb), cromosoma II (4,6 Mb) y cromosoma III (3,5 Mb), junto con 20 Kb de genoma mitocondrial. La zona promotora de sus genes presenta, por término medio, un tamaño mayor a la de *S. cerevisiae*, pudiendo indicar la existencia de regiones de control más extensas. Además, el 43% de los genes contienen intrones frente al 5% mostrado por *S. cerevisiae*. Este relativamente alto número de intrones proporcionaría a *S. pombe* la oportunidad de llevar a cabo un “*splicing*” o procesamiento alternativo, que le permitiría generar distintas proteínas con funciones diferentes y así aumentar la variedad de proteínas presentes en la célula.

Por otra parte, la comparación de su genoma consigo mismo y con el de otros eucariotas reveló resultados interesantes. La redundancia génica es menor a la observada para el caso de *S.*

cerevisiae, con tan sólo 361 genes redundantes frente a los 716 de *S. cerevisiae*. En cuanto a su comparación con otros eucariotas, alrededor de las dos terceras partes de las proteínas (3281) de *S. pombe* presentan un gen homólogo en *S. cerevisiae* y *C. elegans*. Otro dato a tener en cuenta fue la identificación de 289 genes que codifican proteínas similares a las mutadas, amplificadas o delecionadas en enfermedades humanas, revelando así el enorme potencial de *S. pombe* como modelo para el estudio de las mismas (Wood *et al.*, 2002).

3.3 Un mundo de posibilidades

S. pombe como organismo modelo ha contribuido de forma vital en la mejora de nuestro conocimiento en campos tan variados como el ciclo celular y su regulación (Clotet y Posas, 2007; Nurse, 1996; Nurse, 2000), la formación de los microtúbulos (Hagan y Petersen, 2000; Sawin y Tran, 2006), la diferenciación meiótica (Mata *et al.*, 2007), la morfogénesis celular y la polaridad (Almeida y Tyers, 2009; Brunner y Nurse, 2000b; Hayles y Nurse, 2001; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009; Sawin, 2009), los mecanismos de respuesta a estrés o respuesta a daño en el genoma (Alao y Sunnerhagen, 2008; Clotet y Posas, 2007). El avance de nuestro conocimiento gracias a *S. pombe* no sólo se ha conseguido por su elevada tasa de crecimiento, su estilo de vida haploide o su genoma relativamente sencillo y pequeño. Otros factores, como su manejabilidad en el laboratorio o la gran cantidad de “*herramientas moleculares*” de las que se disponen, han sido decisivos para alcanzar estos conocimientos.

Desde 2006 está disponible una colección de mutantes de genes no esenciales. Además, en *S. pombe* es posible llevar a cabo mutaciones condicionales en aquellos genes que no pueden ser delecionados generando mutantes termosensibles (ts). De esta manera, se pueden generar proteínas funcionales a temperaturas no restrictivas (normalmente 25°C) pero que presentan un fenotipo mutante a temperatura restrictiva (36°C). Una vez identificada la mutación y su fenotipo, mediante vectores de

clonación y genotecas se pueden determinar proteínas capaces de complementar los fenotipos mostrados.

Además, existe un conjunto de promotores regulables para modular la expresión de los genes y analizar sus efectos (*adh1*⁺, genera altos niveles de expresión de forma constitutiva; *fvp1*⁺, sensible a la fuente de carbono; *nmt1*⁺, reprimible por tiamina y que ofrece tres versiones diferentes con distintos niveles de expresión). La fusión de genes a la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde o sus distintas versiones permite realizar estudios *in vivo* para determinar la localización subcelular de proteínas y así poder inferir su función (Matsuyama *et al.*, 2006; Sawin, 1999). Además, la utilización de mutantes condicionales de ciclo celular es una herramienta muy valiosa a la hora de conseguir cultivos sincrónicos.

Estas y otras muchas herramientas moleculares, como cassettes de deleción o mutagénesis aleatoria basada en técnicas de PCR (Bahler *et al.*, 1998b; Krawchuk y Wahls, 1999; Matsuyama *et al.*, 2008; Van Driessche *et al.*, 2005), hacen de *S. pombe* un organismo modelo con “*un mundo de posibilidades*”, todas ellas a nuestro alcance gracias a la multitud de bases de datos y páginas Web que en estos momentos se encuentran disponibles (Wixon, 2002; Wixon y Wood, 2006).

4. Ciclo de vida de *S. pombe*

La levadura de fisión presenta un ciclo de vida sencillo, en el que las fases haploide y diploide se alternan en función de una serie de factores ambientales y de la interacción entre células de tipo sexual opuesto.

Durante la fase haploide, las células sufren sucesivas rondas de división mitótica, en las que se pueden diferenciar las fases G1 (preparación de la maquinaria necesaria para la duplicación del DNA), S (duplicación de la información genética), G2 (preparación para el inicio de la mitosis) y M (el DNA se reparte de forma equivalente entre las células hijas). Aunque se trata de un ciclo mitótico normal, en el caso de *S. pombe* presenta algunas peculiaridades, ya que la fase G1 es muy corta,

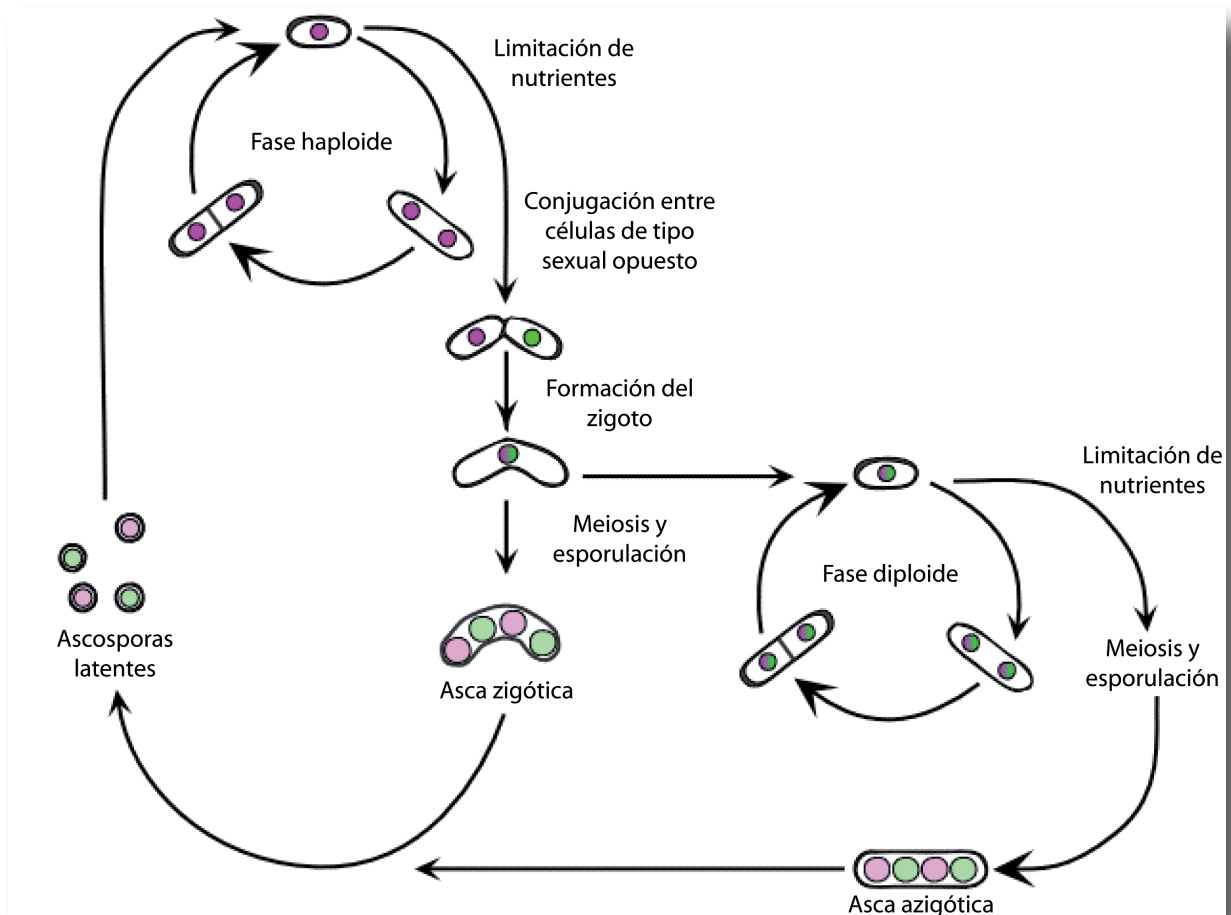


Figura 3.- Ciclo biológico de la levadura de fisión, *S. pombe*. Se muestran tanto las fases haploide y diploide, como la generación de ascas zigóticas y azigóticas.

apenas un 10% del total del ciclo, mientras que la fase G2 se extiende durante el 70% del ciclo celular. La fase diploide sólo aparece cuando dos células de tipo sexual opuesto, sometidas a determinadas condiciones (limitantes en nitrógeno), conjugan formando un cigoto que rápidamente sufrirá meiosis y esporulación para dar lugar a un asca con cuatro ascosporas en su interior. Cuando las condiciones son favorables, las ascosporas germinan entrando de nuevo en la fase haploide del ciclo (Fig. 3).

4.1 Ciclo vegetativo

Las células de *S. pombe* presentan una morfología cilíndrica que se mantiene a lo largo del ciclo celular. Crecen de forma polarizada gracias a la extensión apical, mientras que su grosor se mantiene constante a lo largo del ciclo (en torno a 3-4 μm). Al alcanzar un tamaño aproximado de unas 14 μm , se lleva a cabo la

citoquinesis y formación del septo de división, que posteriormente será degradado permitiendo la separación celular y generando dos células hijas de igual tamaño (7-8 μm) (Fig. 4).

Este patrón de crecimiento polarizado no es idéntico en ambos polos de la célula, ya que aunque ambos presentan una tasa de crecimiento similar, uno de ellos está activo durante G1/S y toda la fase G2, mientras que el otro sólo se activa a partir de un determinado momento de la fase G2, al cual se le ha denominado “*New End Take Off*” o NETO (Mitchison y Nurse, 1985).

Tras la citoquinesis y división celular, las células inician el crecimiento por el “polo viejo” o polo preexistente en la célula madre. A este momento en el que las células crecen por un único polo se le conoce con el nombre de “*Old End Take Off*” u OETO. Este periodo coincide con las fases G1/S y principio de G2, durante el cual los parches de actina se localizan mayoritariamente

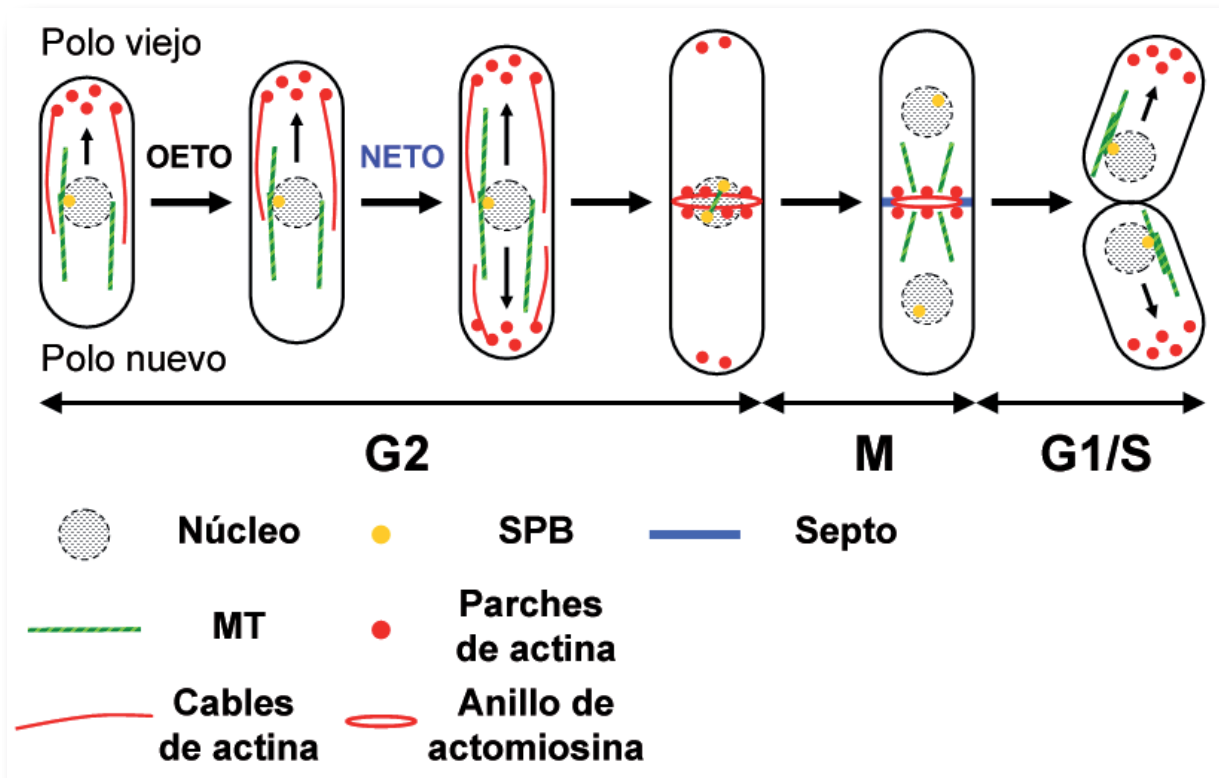


Figura 4.- Ciclo morfológico y celular de *S. pombe* durante el crecimiento vegetativo. Una vez completada la separación celular, las células comienzan a crecer por el polo viejo, en el que se concentran la mayoría de los parches de actina (OETO). Cuando las células alcanzan el tamaño adecuado, se produce la transición al crecimiento bipolar o NETO. Durante esta fase los parches de actina se reorganizan de manera homogénea en ambos polos. Los microtúbulos se organizan como haces dinámicos a lo largo de interfase. Todos estos acontecimientos tienen lugar durante la fase G2 del ciclo celular. Durante la fase M, el citoesqueleto de actina forma un anillo contráctil en la región central de la célula. Además, los microtúbulos forman el huso mitótico necesario para la segregación cromosómica, que se desensambla al final de mitosis para formar el "Post Anafase Array". En las fases G1/S se completa la contracción del anillo, además de la formación y disolución del septo de separación.

en el polo viejo. La activación del crecimiento por el "polo nuevo" o polo generado durante la división celular se produce durante G2. Para que se lleve a cabo el NETO, es necesario que las células hayan alcanzado un tamaño mínimo (alrededor de 9 μm) y completado la fase S. Durante NETO se produce una reorganización de los parches de actina, que a partir de este momento se distribuyen de manera homogénea en ambos polos. El último paso del ciclo es la mitosis y separación celular, momento en que las células dejan de crecer y se produce una nueva reorganización del citoesqueleto de actina. Los parches se concentran en la región central de la célula alrededor del anillo contráctil. De forma coordinada con la contracción del anillo de actina se produce la síntesis del septo de división, que separará las dos células hijas. Posteriormente, se completa el ciclo mediante la disolución controlada del septo (Fig. 4) (Chang y Peter,

2003; Hayles y Nurse, 2001; Martin y Chang, 2005; Mata y Nurse, 1998; Verde, 1998).

En conclusión, la transición de crecimiento monopolar a bipolar o NETO es el resultado de la acción combinada de distintos marcadores de polaridad, proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina y la reorganización del mismo. Todos estos cambios permiten a la célula adquirir un tamaño mínimo y completar la fase S del ciclo celular, antes de comenzar el crecimiento bipolar.

Además de este patrón de crecimiento, recientemente se ha descrito que en determinadas condiciones *S. pombe* puede presentar un crecimiento invasivo en forma de "micelio". Los primeros estudios a este respecto indicaron que la combinación de: a) condiciones limitantes en nitrógeno, b) una fuente de carbono accesible, c) una ruta del AMP cíclico funcional y d) una temperatura en torno

a 30 °C, favorecen la formación de estructuras multicelulares ramificadas (Amoah-Buahin *et al.*, 2005). Estudios posteriores han demostrado que este crecimiento invasivo también tiene lugar en medios ricos en nutrientes y bajo un amplio rango de condiciones, siendo la presencia de una fuente de carbono y una alta densidad de células (aunque este último requerimiento no está muy claro) las principales condiciones necesarias para inducir el crecimiento micelial.

Además, se han identificado otra serie de factores implicados en la formación, adhesión e invasión de estos micelios. Así, concentraciones de galactosa 1M bloquean completamente los procesos de adhesión. Mutantes relacionados con el citoesqueleto de actina o el uso de Latrunculina A (droga que despolimeriza el citoesqueleto de actina) hacen que las células sean capaces de adherirse al medio, pero la

invasión del mismo se encuentra bloqueada, indicando que el citoesqueleto de actina podría tener alguna función en los procesos de invasión. Por último, la delección de genes relacionados con los microtúbulos genera células capaces de adherirse e invadir el medio, aunque presentan alteraciones morfológicas como truncamientos, engrosamientos o filamentos retorcidos (Dodgson *et al.*, 2009).

4.2 Red molecular que “regula” el ciclo vegetativo

Las células eucariotas presentan la capacidad de crecer de forma polarizada en respuesta a dos tipos de señales: a) intrínsecas, generadas por la propia célula y b) extrínsecas, generadas por factores externos a la célula (interacciones célula-célula, hormonas, factores de crecimiento, etc.). La levadura de fisión *S. pombe* también responde

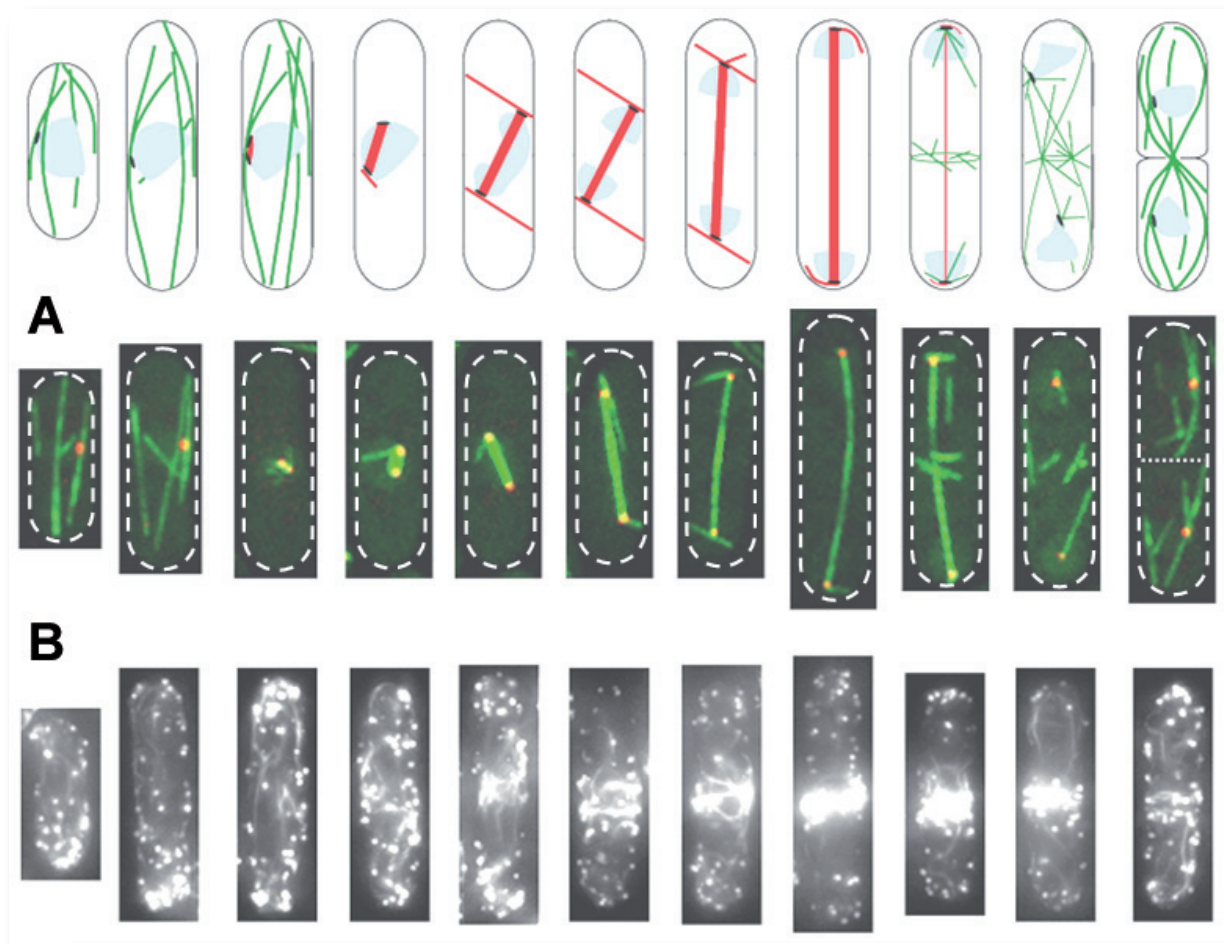


Figura 5.- Dinámica del citoesqueleto de actina y los microtúbulos durante el ciclo vegetativo de *S. pombe*. A. Dinámica del citoesqueleto de microtúbulos a lo largo del ciclo vegetativo. En rojo se muestra el cuerpo polar del huso, en verde los microtúbulos. B. Dinámica del citoesqueleto de actina a lo largo del ciclo vegetativo. Modificado de Hagan (1998).

a ambos tipos de estímulos. Factores extrínsecos, como la presencia de feromonas, regulan el crecimiento durante el ciclo sexual, mientras que factores intrínsecos, formados por una compleja red de interacciones entre la maquinaria de polarización celular, los microtúbulos y el citoesqueleto de actina, controlan el crecimiento durante el resto del ciclo biológico.

Durante el ciclo vegetativo, la organización de los microtúbulos varía en función de la progresión por las distintas etapas del ciclo celular. Durante interfase, se organizan formando haces que se disponen longitudinalmente a lo largo del eje mayor de la célula (normalmente entre tres y cuatro). Presentan dos extremos bien diferenciados (- o negativo y + o positivo); el extremo negativo se encuentra normalmente orientado hacia el centro de la célula, mientras que el positivo se orienta hacia los polos. En mitosis desaparecen los microtúbulos citoplasmáticos y aparecen dos nuevas formas de organización, los microtúbulos intranucleares (coincidentes con el huso mitótico) y los microtúbulos astrales (en la cara citoplasmática del cuerpo polar del huso, SPB). Al final de mitosis se produce una nueva reorganización de los microtúbulos, formándose una estructura transitoria denominada como “*Post-Anaphase Array*” o PAA. Esta estructura se forma durante la división celular coincidiendo con la síntesis del septo de separación (Fig. 5A).

En cuanto al citoesqueleto de actina, tres son las formas de organización del mismo: cables, parches y en forma de anillo contráctil durante la división celular. Los cables, al igual que los microtúbulos, se organizan de forma más o menos longitudinal a lo largo del eje mayor de la célula, estando relacionados con la secreción polarizada. Los parches están localizados de forma mayoritaria en los polos y su función principal se relaciona con la endocitosis. Estas dos estructuras son muy dinámicas, tanto en su generación, ya que se polimerizan y despolimerizan de forma continua, como en su distribución. En cuanto al anillo contráctil, al igual que el PAA, es una estructura transitoria que se origina durante la división celular y que tiene una

importancia capital en el proceso de citoquinesis (Fig. 5B).

4.2.1 Maquinaria de polarización celular

Para que el crecimiento se produzca de manera adecuada, es necesario que todos los componentes de la maquinaria de polarización celular estén presentes. Este es un proceso altamente complejo en el que participan numerosas proteínas estructurales, que deben ensamblarse e interaccionar siguiendo un orden preciso, y proteínas reguladoras que coordinan los cambios con la progresión del ciclo celular. A continuación se hará un resumen de los principales mecanismos implicados en el crecimiento polarizado, siguiendo el orden temporal de actuación de las distintas proteínas.

a) Complejo *tea1-tea4*, la primera piedra

Uno de los primeros componentes de la maquinaria de polarización celular identificado fue la proteína *tea1* (Mata y Nurse, 1997). Esta proteína, de 1147 aminoácidos, presenta seis repeticiones “*kelch*” en su extremo N-terminal y una serie de regiones “*coiled coil*” en su extremo C-terminal que están implicadas en la interacción con otras proteínas. *tea1* forma un complejo con *tea4*, que presenta un dominio SH3 en su extremo N-terminal. La interacción entre estas dos proteínas se lleva a cabo entre los dominios

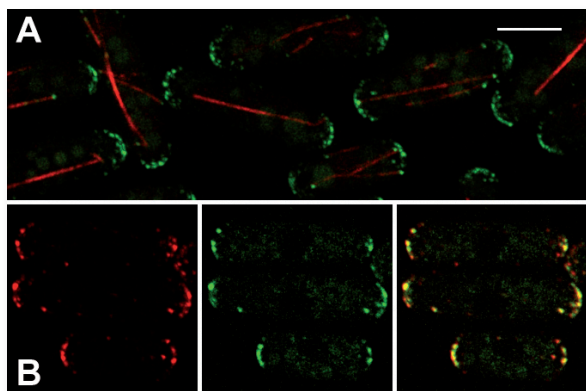


Figura 6.- Localización de *tea1* y *tea4* durante el ciclo vegetativo. A. La proteína *tea1* es transportada hasta los polos celulares por los microtúbulos, anclada al polo positivo de los mismos. B. *tea1* y *tea4* co-localizan a lo largo del ciclo vegetativo formando un complejo. Barra de escala, 5 μ m.

“*coiled-coil*” de *tea1* y las dos terceras partes del extremo C-terminal de *tea4* (quedando el dominio SH3 excluido de esta interacción) (Martin *et al.*, 2005). Durante el ciclo vegetativo, *tea1* y *tea4* colocalizan en ambos polos celulares, actuando como marcadores posicionales de las regiones de crecimiento activo. Se ha demostrado que su localización en estas regiones depende de los microtúbulos, ya que *tea1* y *tea4* son transportadas hasta los polos ancladas al polo positivo de los microtúbulos (Fig. 6A). Una vez que los microtúbulos contactan con la membrana plasmática de los polos, *tea1* y *tea4* se anclan a la misma mientras los microtúbulos sufren “*catástrofe*” y se desorganizan (Fig. 6B).

Los mutantes carentes de cualquiera de estas dos proteínas presentan defectos morfológicos similares, con células monopolares, curvadas o con forma de “T” y con el plano de división ligeramente desplazado del centro. Además, el mutante doble *tea1Δ tea4Δ* presenta los mismos defectos que los mutantes simples, lo que indica que ambas proteínas funcionan en la misma ruta (Martin, 2009; Martin y Chang, 2005; Martin *et al.*, 2005). Sin embargo, existen resultados que indican que existen diferencias entre ellas, ya que en el mutante *tea1Δ* los microtúbulos no se desorganizan al llegar a los polos, sino que se curvan y rodean el mismo, mientras que el mutante *tea4Δ* no presenta ningún defecto en los microtúbulos (Behrens y Nurse, 2002; Martin *et al.*, 2005; Mata y Nurse, 1997). Además, diversos autores defienden un modelo en el que la interacción *tea1-tea4* sería suficiente para el anclaje y funcionalidad en el polo viejo (o de crecimiento), mientras que en el polo nuevo la interacción *tea1-tea4* sería dependiente de *tea3* (Snaith *et al.*, 2005).

La llegada y anclaje de *tea1-tea4* a los polos depende, además de los microtúbulos, de una serie de proteínas con funciones diferentes. En primer lugar, el anclaje de *tea1-tea4* en el polo positivo de los microtúbulos depende de las proteínas *tea2*, *tip1* y *mal3*. *tea2* es una quinesina que presenta regiones “*coiled coil*” en su extremo C-terminal (las proteínas de esta familia interactúan con los microtúbulos a través de su

dominio motor situado en el extremo N-terminal, mientras que en el extremo C-terminal presentan regiones de interacción con otras proteínas). Durante interfase, *tea2* se concentra en los polos, como puntos intensos a lo largo de los microtúbulos y en el polo positivo de los mismos. Durante la mitosis, la cantidad de proteína en los polos celulares disminuye. Los microtúbulos son necesarios para el transporte de *tea2* hasta el polo celular, pero no para su mantenimiento en el mismo (Browning *et al.*, 2000; Busch *et al.*, 2004). *tip1*, homóloga a CLIP-170, se localiza en los polos celulares y en el polo positivo de los microtúbulos donde participa previniendo la desorganización de los mismos. En ausencia de *tip1*, los microtúbulos sufren “*catástrofe*” de forma prematura al chocar con las paredes laterales de la célula. Como resultado, los microtúbulos son más cortos que en una cepa silvestre, quedando localizados en la región próxima al núcleo (Brunner y Nurse, 2000a; Busch y Brunner, 2004; Busch *et al.*, 2004). *mal3*, homóloga a EB1, está relacionada con el mantenimiento y estabilización de los microtúbulos mediante el control de la tasa de despolimerización. El mutante *mal3Δ* presenta microtúbulos cortos y una frecuencia de “*catástrofe*” dos veces superior a la del silvestre. A diferencia de *tea2* y *tip1*, *mal3* se distribuye a lo largo de los microtúbulos, siendo especialmente abundante en el polo positivo y en los Centros

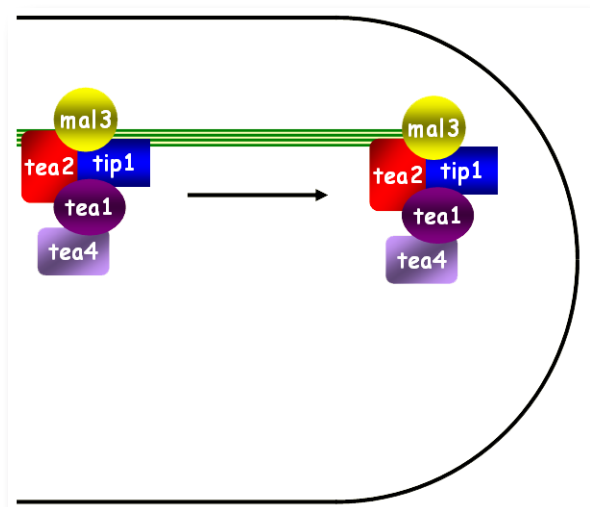


Figura 7.- Maquinaria de polarización celular. Paso 1. El complejo *tea1-tea4* es transportado hasta los polos celulares en un proceso dirigido por los microtúbulos y regulado por las proteínas *tip1*, *tea2* y *mal3*.

Organizadores de Microtúbulos, MTOCs (ver sección 4.2.3. Microtúbulos). Durante mitosis, *mal3* se detecta en los microtúbulos astrales, el huso mitótico y ambos SPBs (Busch y Brunner, 2004; Sandblad *et al.*, 2006). *tea1* y *tea4* son incapaces de anclarse de forma eficiente al polo positivo de los microtúbulos en los mutantes *tea2Δ*, *tip1Δ* y *mal3Δ*, quedando localizadas a lo largo de los mismos.

Distintos estudios han propuesto el siguiente modelo para el anclaje de *tea1* y *tea4* al polo positivo de los microtúbulos (Fig. 7). *tip1* y *mal3* son necesarios para promover el crecimiento y mantenimiento de los microtúbulos a lo largo de la célula, evitando su desorganización cuando chocan contra las paredes laterales de la célula. Ambas proteínas se regulan a través de un sistema de retroalimentación, en el que la localización de *tip1* en el polo positivo de los microtúbulos es dependiente de *mal3*, y *tip1* es necesario para la asociación de *mal3* a la punta de los microtúbulos en la zona central de la célula (ensayos de co-inmunoprecipitación confirman esta interacción). Por otra parte, *tea2* actúa como una quinesina promoviendo el transporte de *tip1* hacia las zonas de crecimiento de los microtúbulos (a través de su dominio motor). Se ha demostrado que existe una interacción entre *tea2* y *tip1*, y también entre *tea2* y *mal3*, lo que sugiere que estas tres proteínas actúan en una misma ruta responsable de la organización de los microtúbulos durante interfase (Browning *et al.*, 2000; Brunner y Nurse, 2000a; Busch y Brunner, 2004; Busch *et al.*, 2004). *tip1* también interacciona con *tea1* a través de sus dominios “*coiled-coil*” (Feierbach *et al.*, 2004), permitiendo la asociación del complejo *tea1-tea4* a los microtúbulos y su transporte hasta el extremo positivo dependiente de la quinesina *tea2* (Feierbach *et al.*, 2004; Snaith *et al.*, 2005). De esta manera, el complejo *tea1-tea4* es capaz de anclarse al extremo positivo de los microtúbulos y ser transportado hasta los polos de la célula, donde se anclará gracias a la asociación con otra serie de factores.

Entre las proteínas responsables del anclaje de *tea1-tea4* al córtex celular se encuentran

mod5 y *tea3*. *mod5* es una proteína muy rica en serinas, treoninas y prolinas que se localiza unida a la membrana en los polos celulares gracias a una secuencia de prenilación situada en su extremo C-terminal. Su localización es parcialmente dependiente de los microtúbulos e independiente del citoesqueleto de actina. En ausencia de *mod5*, las células muestran un patrón de crecimiento similar al silvestre, aunque el 35-40% de ellas presentan defectos en el crecimiento. Estos mutantes son defectivos en el anclaje de *tea1* a los polos, por lo que la mayor parte de *tea1* permanece retenida en los microtúbulos (Snaith y Sawin, 2003). *tea3* presenta una cierta similitud con *tea1*. En su extremo N-terminal posee 5-6 repeticiones “*kelch*”, mientras que en el extremo C-terminal se ubican los dominios “*coiled-coil*”. Se localiza en ambos polos celulares, concentrándose en mayor media en el polo nuevo. Esta localización es dependiente de los microtúbulos e independiente del citoesqueleto de actina. El mutante *tea3Δ*, presenta un crecimiento monopolar y defecto en NETO (Arellano *et al.*, 2002).

Varios estudios han confirmado la interacción entre *tea1*, *tea3* y *mod5*. La región central de *mod5* es necesaria para la interacción con *tea1*

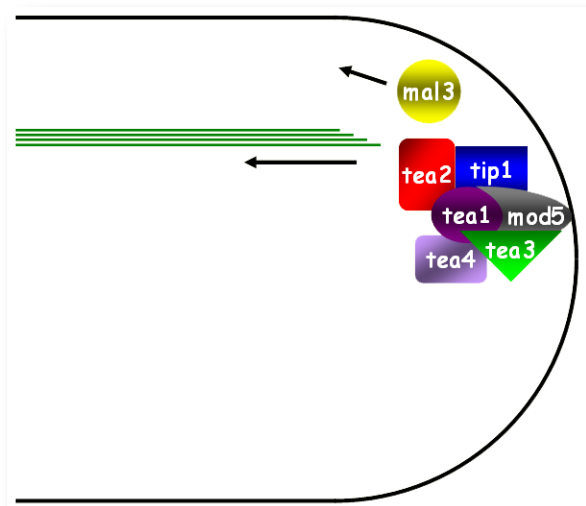


Figura 8.- Maquinaria de polarización celular. Paso 2. Una vez en los polos celulares, *mal3* se desensambla y los microtúbulos se desorganizan en un proceso conocido como “catástrofe de los microtúbulos”. El complejo *tea1-tea4* (junto con *tea2* y *tip1*) queda anclado en los polos gracias a las proteínas *mod5* y *tea3*.

y tea3. La unión entre mod5 y tea1 depende de las repeticiones “*kelch*” de tea1, mientras que la unión mod5-tea3 está mediada por los dominios “*coiled-coil*” de tea3. La formación del complejo tea1-tea3 es dependiente de los dominios “*coiled-coil*” de ambas proteínas. La interacción entre dos de estas tres proteínas puede tener lugar en ausencia de la tercera, aunque su localización y funcionalidad quedan parcialmente alteradas.

En base a estos resultados se ha propuesto el siguiente modelo (Fig. 8): una vez que tea1 llega a los polos celulares asociada a los microtúbulos, interacciona con mod5 y queda anclada al córtex. Su localización también depende de tea3, al menos en el polo de no crecimiento (Snaith *et al.*, 2005). Por otra parte, tea1 estimula la localización de tea3 en los polos celulares, mientras que mod5 es responsable de su anclaje al córtex. De esta forma, tea1 queda anclada de forma estable a los extremos de la célula (Snaith *et al.*, 2005; Snaith y Sawin, 2003). Según este modelo, tea4 podría tener un papel similar al de tea3 en el polo viejo (Martin *et al.*, 2005; Tatebe *et al.*, 2005). Sin embargo, no se puede descartar la interacción de tea4 con otras proteínas, independientes de tea1, que fueran responsables de su funcionalidad y localización.

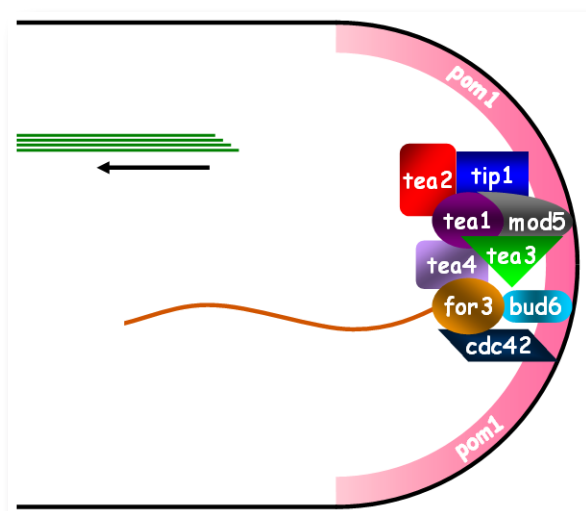


Figura 9.- Maquinaria de polarización celular. Paso 3. Una vez establecidos los polos de crecimiento, otras proteínas (for3, bud6, cdc42...) son reclutadas para formar el polarisoma. Una vez formado, éste dirige la síntesis de los cables de actina gracias a la formina for3.

b) Activación del crecimiento

La localización del complejo tea1-tea4 en los polos de la célula es una condición necesaria para marcar los puntos de crecimiento de la célula, pero no es suficiente para activar el crecimiento. De hecho, una de las funciones importantes del complejo tea1-tea4 es servir de punto de anclaje para que las proteínas implicadas en la activación del crecimiento se localicen en los polos. tea1 y tea4 actúan como estructura de andamiaje para la formación de un complejo que ha sido denominado polarisoma, compuesto por las proteínas for3, bud6 y cdc42, y que es el que activa el crecimiento celular en los polos (Fig. 9). Este complejo está implicado en multitud de procesos, como la organización del citoesqueleto de actina, la elección del lugar de gemación o la polaridad celular (Pruyne y Bretscher, 2000; Sheu *et al.*, 1998).

cdc42 es una proteína de la familia de las GTPasas esencial para la viabilidad celular, ya que regula funciones tan importantes como la organización del citoesqueleto de actina o el establecimiento del crecimiento polarizado (Adams *et al.*, 1990; Johnson y Pringle, 1990). La proteína cdc42 está conservada a lo largo de la evolución en eucariotas, llegando a presentar un 75% de identidad entre levaduras y humanos (Johnson, 1999). En *S. pombe*, cdc42 se localiza en las regiones de crecimiento, el sitio de división y en endomembranas. La pérdida de actividad de cdc42 provoca la formación de células redondeadas incapaces de conjugarse (Merla y Johnson, 2000; Miller y Johnson, 1994). Como otras GTPasas, su regulación depende de proteínas activadoras (los factores GEF como ral1/scd1 o gef1) y de proteínas que estimulan su actividad GTPasa intrínseca (los GAPs como rga4) (Coll *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 1994; Das *et al.*, 2007; Fukui y Yamamoto, 1988; Hirota *et al.*, 2003; Tatebe *et al.*, 2008). scd1 y gef1 son esenciales para la activación de cdc42. Las células carentes de scd1 muestran una morfología esférica, son incapaces de conjugarse y presentan defectos durante el proceso de endocitosis (Chang *et al.*, 1994; Murray y Johnson, 2001). La delección

de *gef1* conlleva un retraso en la citoquinesis y defectos en NETO (Coll *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito que la localización de *cdc42* activo está regulada por la quinasa *orb6* y que esta regulación se lleva a cabo a través de la localización de *gef1* en los polos celulares (Das *et al.*, 2009).

La segunda proteína que forma parte del polarisoma es *bud6*. Su función principal durante el ciclo vegetativo es reforzar el reclutamiento y activación de la formina *for3* en los polos de crecimiento (Martin, 2009; Martin *et al.*, 2007b). Los mutantes *bud6Δ* presentan una morfología normal, aunque el 50% de las células son incapaces de llevar a cabo la transición al crecimiento bipolar. Además, en combinación con el mutante *cdc11-123* (que a temperatura restrictiva es incapaz de realizar citoquinesis) forma un elevado porcentaje de células ramificadas o dobladas, sugiriendo una posible función como marcador de polaridad (Glynn *et al.*, 2001). *bud6* se encuentra presente en ambos polos durante interfase, localizándose en la región del septo durante mitosis. Esta localización es dependiente de *tea1* y del citoesqueleto de actina, e independiente de los microtúbulos.

Por último, la formina *for3* también es un componente del polarisoma. Como otras forminas, *for3* es necesaria para la polimerización de los cables de actina que parten de los polos, estando regulada por *cdc42*, *pob1* y *bud6* (Martin *et al.*, 2007b; Rincón *et al.*, 2009). El modo de acción de estas 3 proteínas así como sus interacciones serán revisadas con detalle en capítulos posteriores.

Además del polarisoma, otra proteína importante cuya localización depende de *tea1-tea4* es la DYRK (*Dual specificity - tYrosine - phosphorylation Regulated protein Kinase*) quinasa *pom1*, que ha sido asociada con muchos eventos del ciclo celular en *S. pombe*. Inicialmente fue relacionada con el crecimiento polarizado y la citoquinesis (Bahler y Nurse, 2001; Bahler y Pringle, 1998; Huang *et al.*, 2007; La Carbona y Le Goff, 2006); posteriormente, se comprobó su importancia en la regulación de la GTPasa *cdc42*,

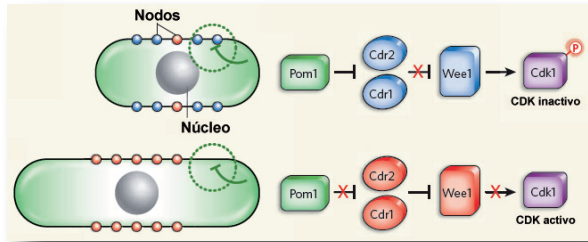


Figura 10.- *pom1* actúa como interlocutor entre el tamaño y el ciclo celular en *S. pombe*. Tomado de Sawin (2009).

y se propuso como enlace entre la maquinaria de polarización celular y la organización del citoesqueleto de actina en las zonas de crecimiento (Tatebe *et al.*, 2008) y más recientemente ha sido identificada como conexión entre el crecimiento celular y la entrada en mitosis a través de la ruta *cdr2-cdr1-wee1-cdk1* (Almeida y Tyers, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009; Sawin, 2009). En interfase, *pom1* se localiza formando un gradiente desde los polos hacia el centro de la célula, mientras que durante mitosis se concentra en la región central de la célula (Fig. 9). Esta localización es dependiente de los microtúbulos y del complejo *tea1-tea4* e independiente del citoesqueleto de actina. En ausencia de *pom1*, las células son ligeramente más pequeñas, crecen de manera monopolar por cualquiera de los polos y son incapaces de llevar a cabo NETO. Además, presentan septos desplazados y/o desorientados (Bahler y Nurse, 2001; Bahler y Pringle, 1998). Estudios recientes han relacionado a *pom1* con *rga4*, un GAP (GTPase-activating protein) de la GTPasa *cdc42*. *pom1* regula la fosforilación y localización de *rga4*, excluyéndola de las zonas de crecimiento y evitando la inactivación de *cdc42* en estas regiones. De esta manera, *cdc42* se mantiene activo en los polos de crecimiento regulando la actividad de la formina *for3* (Martin *et al.*, 2007b; Rincón *et al.*, 2009; Tatebe *et al.*, 2008). Así, una de las funciones de *pom1* es la regulación de la localización de proteínas corticales como *rga4* y *mid1*, limitando su presencia a las zonas de no crecimiento. Adicionalmente, varios estudios muy recientes, han relacionado a *pom1* con el control del ciclo celular (Fig. 10). *pom1* actúa como sensor del tamaño celular, regulando la progresión del

ciclo. En células de tamaño pequeño, los niveles de pom1 en la región central de la célula inhiben la actividad de la quinasa cdr2 retrasando la entrada en mitosis. Cuando aumenta la longitud de las células, los niveles de pom1 en la región central disminuyen, llegando un momento en el cual no son capaces de inhibir a cdr2, lo que permite la progresión del ciclo por inactivación de la quinasa wee1 (Almeida y Tyers, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009; Sawin, 2009).

c) mal3-moe1-for3, una alternativa al complejo tea1-tea4

Hasta la fecha, el complejo tea1-tea4 se había considerado como la única vía para promover el crecimiento polarizado durante el ciclo vegetativo. Estudios recientes han identificado una ruta alternativa, independiente del complejo tea1-tea4, y dependiente de los microtúbulos, mal3, moe1 y for3 (Minc *et al.*, 2009; Terenna *et al.*, 2008). Cambios morfológicos en células de *S. pombe* provocan la reorganización del citoesqueleto y una reorientación de la polaridad celular, generando polos de crecimiento ectópicos. Estos cambios en el citoesqueleto conducen a la alteración de la localización de la maquinaria de polaridad celular, ubicándose en lugares alejados de los polos, donde originan nuevos puntos de crecimiento. Esta ruta es independiente de tea1 y dependiente de los microtúbulos y moe1 (Minc *et al.*, 2009).

4.2.2 Citoesqueleto de actina

Una vez establecidos los polos de crecimiento, la célula comienza a crecer gracias al citoesqueleto de actina, que dirige la secreción polarizada de la nueva membrana y las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular a las regiones por las que se está alargando.

El citoesqueleto de actina en levaduras se organiza formando tres estructuras bien diferenciadas: a) cables, b) parches y c) el anillo contráctil. Cada una de ellas está relacionada con un proceso celular diferente. Así, los cables son necesarios para la secreción y el crecimiento polarizado, los parches están implicados en los

procesos de endocitosis y el anillo contráctil de actomiosina es una estructura necesaria para la citoquinesis. Existen numerosas proteínas, como ScBni1, ScBnr1, ScBee1/Las17, Spmyo2/myo4, Spfor3, Spcdc12, Spmyo52, Spwsp1 o el complejo arp2/3, que participan en la formación y regulación de cada una de estas estructuras en las distintas levaduras. En la levadura de fisión, tres son las proteínas que presentan un papel más relevante en la polimerización de la actina en las distintas regiones. La formina for3 es la responsable de la formación de los cables de actina (Feierbach y Chang, 2001), el complejo arp2/3 es el encargado de nuclear los parches de actina (Moreau *et al.*, 1996; Winter *et al.*, 1997), y la formina cdc12 que desempeña un papel fundamental en la formación del anillo contráctil durante la citoquinesis (Chang *et al.*, 1997; Streiblova *et al.*, 1984). La regulación de la actividad de estas tres proteínas depende de otros factores englobados en diferentes familias (GTPasas, proteínas de la familia WASP, miosinas, profilinas, cofilinas...), que se describirán en los siguientes apartados.

a) Mecanismo de acción de las forminas

Las forminas constituyen una familia de proteínas relacionadas con la formación de una amplia variedad de estructuras celulares (cables de actina, filopodios, fibras de estrés, anillo de actomiosina), y una amplia variedad de funciones (citoquinesis, polaridad celular, adhesión celular y migración, morfogénesis o endocitosis), todas ellas relacionadas con la polimerización de filamentos de actina no ramificados. El rasgo característico de las proteínas de esta familia es la presencia de una región de unos 400 aminoácidos (dominio FH2) que media en el ensamblaje de la actina. Aunque los dominios FH2 de levaduras son bastante divergentes en secuencia respecto a los de metazoos, su estructura y función parecen estar conservadas a lo largo de la evolución. El análisis filogenético de estos dominios ha permitido clasificar a las forminas en diferentes grupos, siendo el mejor estudiado el grupo de las forminas DRFs ("*Diaphanous-Related Formins*"), donde se puede incluir a for3 (Goode y Eck, 2007;

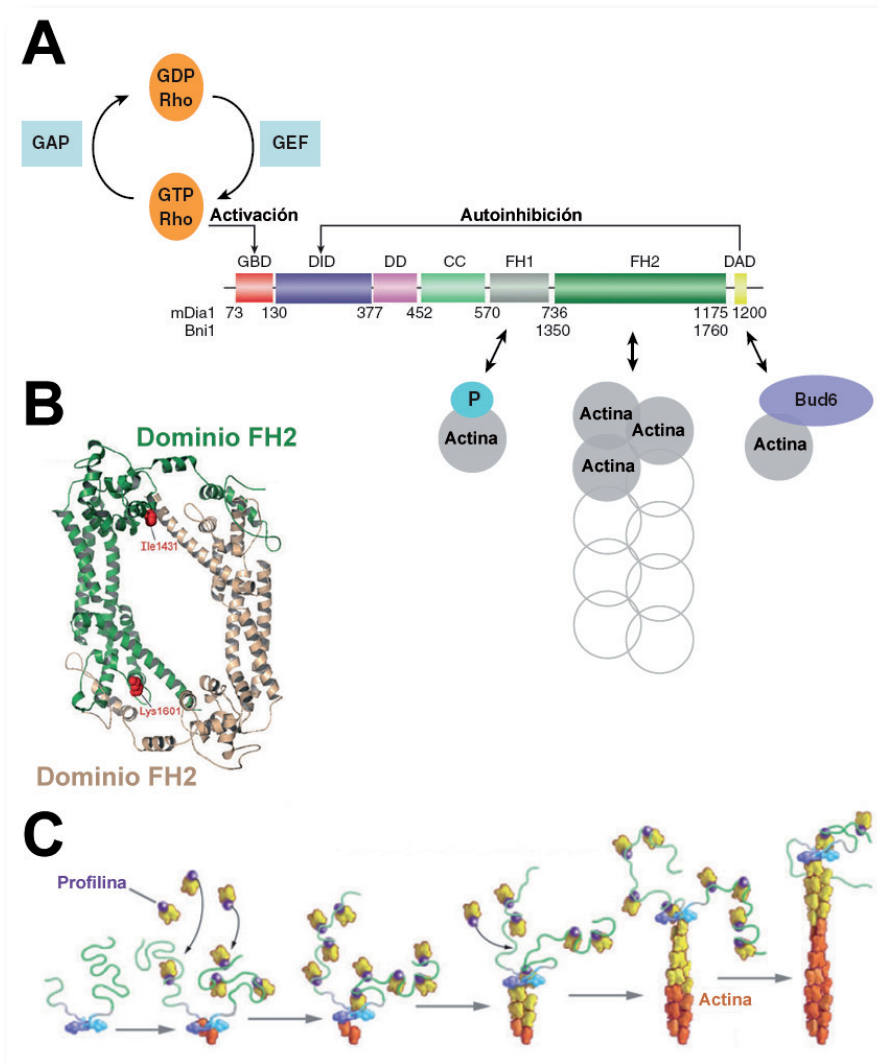


Figura 11.- Estructura y mecanismo de acción de las forminas. **A.** Diagrama de los diferentes dominios presentes en las forminas de tipo “*Diaphanous-Related Formins*”. **B.** Estructura cristalográfica de los dímeros FH2-FH2 necesarios para la formación de los filamentos de actina. **C.** Modelo propuesto para el mecanismo de acción de las forminas.

Martin *et al.*, 2007b; Rincón *et al.*, 2009).

Funcionalmente, estas proteínas pueden ser divididas en dos mitades. En el extremo C-terminal se encuentran los dominios responsables de la polimerización de los filamentos de actina mientras que en el extremo N-terminal contiene el dominio regulador. La región de ensamblaje de actina está compuesta por el dominio FH1 (dominio de unión a profilina), el dominio FH2 (dominio de unión a actina) y el dominio DAD (“*Diaphanous Autoregulatory Domain*”); mientras que la región reguladora se compone de cuatro dominios: el dominio de unión a GTPasas (GBD), el dominio DID (“*Diaphanous Inhibitory Domain*”), un dominio de dimerización (DD) y una región “*coiled-coil*” (CC) (Fig. 11A).

La determinación de la estructura de las forminas y de la actina ha permitido conocer

los detalles del mecanismo de polimerización del filamento de actina por las forminas (Fig. 11B y Material adicional: Video_1). La unión al “*barbed end*” de los filamentos de actina está mediada por el dominio FH2, que actúan como dímeros. Estos dímeros tienen la capacidad de moverse de manera oscilante, pasando de una configuración abierta a una configuración cerrada, de tal manera que mientras que una de las dos subunidades del dímero FH2 contacta con el “*barbed end*” del filamento, la otra subunidad interactúa con una molécula de actina que va a incorporarse al filamento. Gracias al movimiento oscilante de las dos subunidades, se produce la rápida incorporación de intermediarios de actina, en un proceso conocido como “*processive capping*”. Además, la interacción de las forminas con el extremo en crecimiento lo protege de la acción de las “*capping proteins*”, cuya función

es limitar el crecimiento de los filamentos y facilitar el movimiento de los parches durante la endocitosis (Kaksonen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Moseley y Goode, 2006; Xu *et al.*, 2004). Otro de los dominios conservados en la gran mayoría de las forminas es el dominio FH1, que está implicado en el uso de forma eficiente de las unidades de actina asociadas a la profilina y en el incremento de la tasa de elongación gracias a la interacción FH1-profilina. Los dominios FH1 de las forminas son capaces de unir uno o varios complejos profilina-actina, lo que aumenta la concentración localizada de complejos profilina-actina en el “*barbed end*” y acelera la velocidad de polimerización de las forminas (Fig. 11C).

Para que las forminas sean capaces de polimerizar los filamentos de actina, es necesario que se produzca su activación. En el caso de las DRFs, la regulación ocurre mediante un mecanismo autoinhibitorio en el que están implicados el dominio DAD (extremo C-terminal) y el dominio DID (extremo N-terminal) (Fig. 11A), que interactúan y mantienen a la formina en el estado inactivo. La liberación de la autoinhibición depende de la interacción del dominio GDB con las GTPasas de la familia Rho. En algunos casos, este mecanismo de activación por GTPasas es insuficiente, y necesita además de la participación de la profilina y Bud6 (Li y Higgs, 2003). En *S. cerevisiae*, Bud6 interactúa de forma específica con el dominio DAD de la formina Bni1, aumentando su actividad 2-3 veces, aunque no tiene ningún efecto sobre Bnr1 (Moseley y Goode, 2005; Moseley *et al.*, 2004). La estructura, función y regulación de bud6 en *S. pombe* se expondrá en apartados posteriores. En todo caso, la activación de las forminas es un proceso transitorio, ya que la activación por las GTPasas de la familia Rho produce su liberación de la membrana y posterior auto-transporte por los cables de actina, inactivándose durante este proceso. Este modelo ha sido estudiado de forma precisa en *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Kamasaki *et al.*, 2005; Kovar, 2006; Martin y Chang, 2006; Wang y Vavylonis, 2008), y en capítulos posteriores se describirá con detalle.

b) Forminas en *S. pombe*

En la levadura de fisión, hasta el momento se han descrito tres forminas implicadas en tres procesos que ocurren en momentos diferentes del ciclo celular:

- a) *for3*, necesaria para la formación de los cables de actina durante el crecimiento vegetativo (Feierbach y Chang, 2001; Martin *et al.*, 2007b)
- b) *cdc12*, relacionada con la formación del anillo contráctil de actomiosina durante citoquinesis (Chang, 1999; Chang *et al.*, 1997; Yonetani *et al.*, 2008)
- c) *fus1*, implicada en los procesos de conjugación y fusión celular durante el ciclo sexual (Petersen *et al.*, 1998c; Petersen *et al.*, 1995).

- Cables de actina y *for3*

for3 presenta los dominios característicos de las DRFs, se localiza en ambos polos y en el septo siguiendo un patrón similar al de los parches de actina y al crecimiento celular. Es extremadamente dinámica, tanto en la región de los polos, como en sus movimientos hacia el interior celular, lo que depende de la actina pero no de los microtúbulos. La delección del gen afecta tanto al tiempo de generación y la morfología celular, como al citoesqueleto de actina, los microtúbulos o la integridad celular. El mutante *for3Δ* presenta tiempos de generación de unas 5 horas en medio rico y la morfología de las células es variada, con fenotipos redondeados, curvados o en forma de botella. Además, tras la citoquinesis no genera dos células hijas equivalentes, siendo una de ellas más redondeada y con un NETO prematuro, y la otra alargada o doblada y carente de NETO (Feierbach y Chang, 2001). El defecto más característico del mutante *for3Δ* es la ausencia de cables de actina y una despolarización de los parches de actina. Además, la miosina de Clase V *myo52*, implicada en la secreción polarizada, se encuentra deslocalizada y exhibe un movimiento aleatorio (Mulvihill *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001). Por último, los microtúbulos también parecen estar desregulados, mostrando un mayor número de

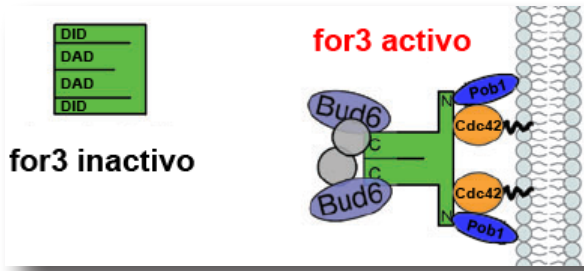


Figura 12.- Modelo de activación de la formina for3 en *S. pombe*.

haces por célula, aunque su tasa de crecimiento y estabilidad parecen normales (Feierbach y Chang, 2001).

La proteína for3 interactúa de forma directa con tea4 a través del extremo N-terminal de for3, pero no existe interacción directa con tea1. Por ello, se piensa que tea4 puede desempeñar un papel en el reclutamiento y mantenimiento de for3 en el polo nuevo para el establecimiento de la polaridad celular (Martin *et al.*, 2005). Resultados adicionales apuntan a que la formación del complejo tea1-tea4-for3 es condición necesaria y suficiente para el establecimiento de la polaridad celular y el ensamblaje de actina en el polo nuevo (Martin y Chang, 2005; Martin *et al.*, 2005).

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la proteína bud6 forma parte de la maquinaria de polarización celular, estando implicada en el reclutamiento y activación de for3 en los polos (Martin *et al.*, 2007b). La proteína bud6 se une de forma directa al extremo C-terminal de for3 (Feierbach *et al.*, 2004), llevando a cabo dos funciones: a) regular la autoinhibición de la formina, y b) anclar físicamente a for3, contribuyendo a su localización en los polos celulares (Martin *et al.*, 2007b). Por otra parte, estudios recientes han relacionado a cdc42 y pob1 (homólogo de Boi1 y Boi2 de *S. cerevisiae*) con la regulación y localización de for3 (Martin *et al.*, 2007b; Rincón *et al.*, 2009). for3 ha sido identificada como uno de los efectores de la GTPasa cdc42 activa, mientras que pob1 parece ser necesario para la localización de for3 en los polos y para la liberación de su autoinhibición dependiente de cdc42. La activación y localización

de for3 en los polos celulares depende de la liberación del estado autoinhibido, estado en el que se encuentra cuando los dominios DAD y DID están unidos (Fig.12). bud6 interactúa con el dominio DAD de for3, lo que contribuye a eliminar la autoinhibición y favorece la localización de for3. Además, la proteína cdc42 interactúa con el dominio DID de for3, permitiendo su correcta localización y completa activación. En este proceso, pob1 ayudaría a la activación y localización de for3 a través de cdc42 (Martin *et al.*, 2007b; Rincón *et al.*, 2009).

La localización de for3 en los polos y su activación es un proceso muy dinámico, en el que existen sucesivos ciclos de activación e inhibición de acuerdo con el siguiente modelo (Fig. 13) (Kamasaki *et al.*, 2005; Kovar, 2006; Martin y Chang, 2006; Wang y Vavylonis, 2008):

- a) for3 se une de manera transitoria a la región de los polos a través de la maquinaria de polarización celular.
- b) Allí, interactúa con cdc42, pob1 y bud6 pasando a su estado activo, y comenzando la polimerización de pequeños filamentos de actina.
- c) Estos filamentos se organizan en forma de haces formando cables. Proteínas como cdc8 o incluso for3 podrían favorecer este modo de organización.
- d) Unos segundos después, la formina asociada al “barbed end” del filamento es

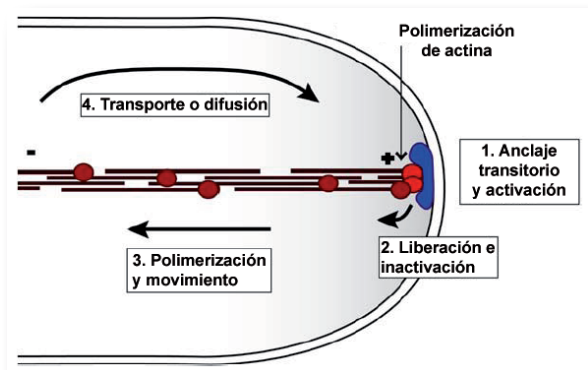


Figura 13.- Ciclo de activación/inactivación de la formina for3 durante la formación de los cables de actina en *S. pombe*. En rojo se muestra la formina for3, en azul se representan los distintos activadores de la misma. Modificado de Martin y Chang (2006).

liberada del polo y desplazada hacia el interior celular por el filamento de actina naciente.

- e) Finalmente, y tras la inactivación de la formina, ésta regresa al polo celular por difusión pasiva o transporte activo.

Este modelo sugiere que el flujo de cables establece un gradiente de concentración de for3 y la actina, que podría ser importante para el patrón global de crecimiento en la célula.

- Anillo contráctil de actomiosina y cdc12

La división celular en levaduras requiere de la formación de un anillo contráctil de actomiosina. El establecimiento del mismo tiene lugar durante las primeras etapas de la mitosis, seguido de un proceso de contracción desde la superficie celular hacia el centro de la célula (Marks *et al.*, 1986). Diferentes estudios han identificado unas 50 proteínas implicadas en el proceso de formación y contracción del anillo (Guertin *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Wu y Pollard, 2005); sin embargo, se mantienen pequeñas discrepancias en cuanto al proceso de formación del mismo. En este sentido, dos son las teorías o modelos actuales para explicar su ensamblaje:

- a) El primero de ellos propone que la acumulación de la formina cdc12 en uno o varios puntos en la región central de la célula permitiría el ensamblaje de una estructura en forma de “asterisco”, del que partiría un cable “guía” de filamentos de actina, que iría alargándose hasta rodear la región central de la célula y a partir del cual se formaría el anillo contráctil (Fig. 14A) (Arai y Mabuchi, 2002; Carnahan y Gould, 2003; Chang, 1999; Chang, 2000; Chang *et al.*, 1997; Kamasaki *et al.*, 2007; Motegi *et al.*, 2004; Yonetani *et al.*, 2008).
- b) El modelo alternativo defiende que la formina cdc12 y la miosina de Clase II myo2 (junto con otras proteínas) se organizan en una serie de nodos (alrededor de 50) en la región central de la célula. Estos nodos, mediante la acción coordinada de cdc12 y myo2,

se ensamblarían unos con otros dando lugar al anillo contráctil funcional (Fig. 14B) (Bahler *et al.*, 1998a; Bezanilla *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008; Motegi *et al.*, 2004; Motegi *et al.*, 2000; Paoletti y Chang, 2000; Vavylonis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006).

La formina cdc12, al igual que for3, presenta los dominios característicos de las DRFs; sin embargo, su regulación no se lleva a cabo mediante autoinhibición por interacción de los dominios DID y DAD (mutaciones en estos dominios no alteran su regulación) (Yonetani

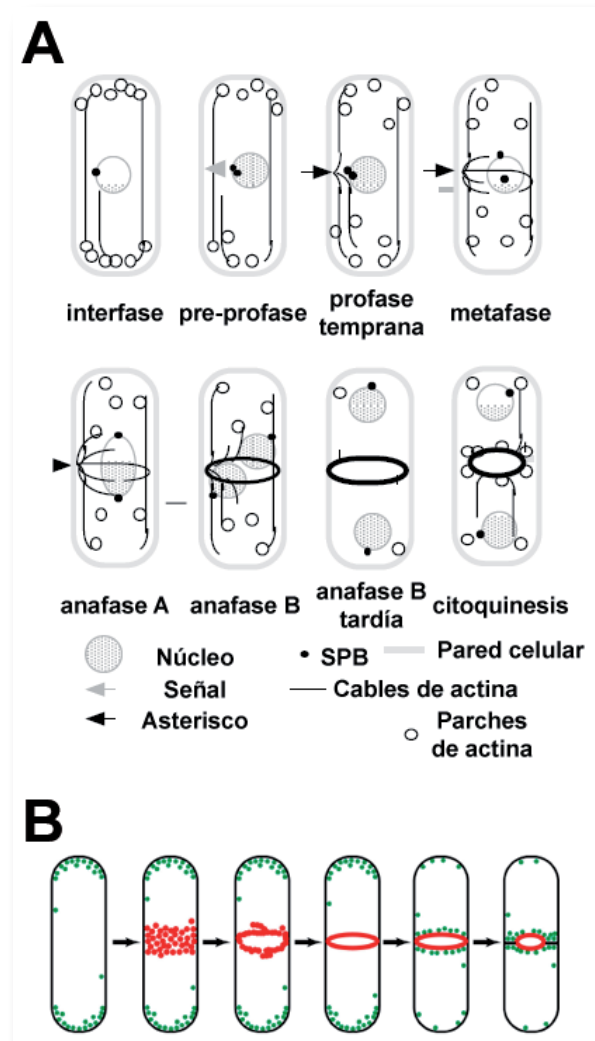


Figura 14.- Modelos propuestos para la formación del anillo de actomiosina en *S. pombe*. **A.** Modelo asterisco y cable guía: la formina cdc12 forma una estructura en forma de asterisco capaz de generar un cable conductor que finalmente da lugar al anillo contráctil. **B.** Modelo de nodos: la formina cdc12 forma una banda de nodos a partir de la cual se ensambla el anillo contráctil (verde = parches de actina; rojo = proteínas formadoras de nodos).

et al., 2008). La localización de *cdc12* también ha generado cierta polémica, ya que mientras algunos autores únicamente visualizan la proteína durante el proceso de citoquinesis en la región del anillo (Vavylonis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006), otros autores observan entre 1-5 puntos durante interfase además del anillo de citoquinesis (Chang, 1999; Chang, 2000; Kamasaki *et al.*, 2007; Yonetani *et al.*, 2008). Estos puntos alternan movimientos rápidos, lineales y direccionales de polo a polo, con otros más lentos y cortos en la región de los polos y el núcleo. Además, en ocasiones varios de estos pequeños puntos se fusionan para dar lugar a uno de mayor tamaño. La localización de *cdc12* es dependiente del citoesqueleto de actina y los microtúbulos, ya que *cdc12* pierde su movilidad únicamente cuando las células son tratadas con Latrunculina A y MBC (Chang, 1999; Chang, 2000; Kamasaki *et al.*, 2007; Yonetani *et al.*, 2008). Ensayos realizados en nuestro laboratorio indican que *cdc12* se comporta como uno o varios puntos durante interfase y en forma de anillo durante la citoquinesis.

En cualquier caso, la forma *cdc12* es necesaria para el ensamblaje de filamentos de actina durante la citoquinesis, filamentos que, ya sea mediante la formación de un cable guía o mediante la unión de distintos nodos, darán lugar a un anillo contráctil de actomiosina.

c) El complejo arp2/3: estructura y mecanismo de acción

Conservado a lo largo de la evolución desde levaduras hasta mamíferos, el complejo arp2/3 está formado por siete subunidades: dos proteínas relacionadas con actina, arp2 y arp3; y otras cinco proteínas que no presentan una gran homología con proteínas descritas hasta el momento, arpC1/p40/ARC40, arpC2/p35/ARC35, arpC3/p21/ARC18, arpC4/p20/ARC19 y arpC5/p15/ARC15. La primera subunidad identificada fue arp2 de *S. cerevisiae*, en base a su similitud con la actina (Schwob y Martin, 1992). Posteriormente, en el año 1997 se identificaron las otras seis subunidades que forman el complejo arp2/3 (Winter *et al.*, 1997). Todas las

subunidades del complejo son esenciales, ya que su ausencia produce graves defectos en el crecimiento o letalidad, con la excepción de arpC3 (Winter *et al.*, 1999b).

El complejo arp2/3 está relacionado con la formación de los parches de actina y la endocitosis en levaduras (Moreau *et al.*, 1997; Moreau *et al.*, 1996; Schwob y Martin, 1992; Winter *et al.*, 1997). Su función esencial es la de promover la ramificación de los filamentos de actina a partir de un filamento existente, lo que permite la formación de las intrincadas redes de actina presentes en los parches de levaduras, lamelopodios de amebas o células humanas en movimiento. El complejo arp2/3 se une a un filamento de actina madre y forma un filamento hijo lateralmente. Para que esto ocurra, son necesarios una serie de cambios conformacionales (activación) en la estructura del complejo arp2/3, que están controlados por proteínas reguladoras denominadas NPFs (*Nucleation Promoting Factors*). Todos los NPFs conocidos presentan tres dominios bien conservados necesarios para la activación:

- a) El dominio V o de homología a verprolina, también llamado WH2, que está formado por una hélice α de unos 20 residuos seguida de una lámina β .
- b) El dominio C o conector, que se une tanto a la actina como al complejo arp2/3.
- c) El dominio A o ácido, necesario para la unión al complejo arp2/3.

Los dominios VC presentan afinidad por la actina, mientras los dominios CA son importantes para la interacción con el complejo. Así, los dominios VCA y el complejo arp2/3 son capaces de incorporar la primera de las subunidades del filamento naciente durante el proceso de formación de los mismos (Panchal *et al.*, 2003; Pollard, 2007; Welch y Mullins, 2002).

- Estructura cristalográfica del complejo arp2/3

Uno de los hitos importantes en el estudio de la función del complejo arp2/3 fue la determinación de su estructura cristalográfica (Fig. 15), lo que ha permitido determinar la disposición de cada

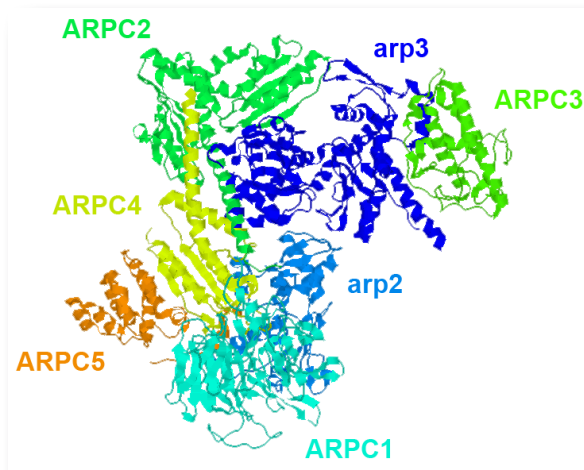


Figura 15.- Estructura cristalográfica del complejo arp2/3. Formado por 7 subunidades, arp2, arp3, arpC1/p40/ARC40, arpC2/p35/ARC35, arpC3/p21/ARC18, arpC4/p20/ARC19 y arpC5/p15/ARC15, se encuentra conservado a lo largo de la evolución en eucariotas.

una de las subunidades del complejo y conocer las posibles aportaciones a la función del mismo (Gournier *et al.*, 2001; Pollard y Beltzner, 2002; Robinson *et al.*, 2001). Las subunidades arpC2 y arpC4 forman el núcleo del complejo, adquiriendo una disposición en forma de C que sirve como molde para el anclaje del resto de las subunidades. Distintos experimentos en levaduras y eucariotas superiores han asignado un papel esencial a estas dos subunidades (Gournier *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 1999b). La proteína arpC1 presenta un dominio WD40, que generalmente está relacionado con funciones reguladoras/adaptadoras en la transducción de señales, procesamiento del RNA, ensamblaje del citoesqueleto, activación de la transcripción y regulación del ciclo celular. En este caso, le permite interactuar con las proteínas arp2, arp3 y arpC4, además de ser el principal mediador de las interacciones entre el complejo arp2/3 y las proteínas de la familia WASP (la pérdida de arpC1 conlleva una disminución de la afinidad entre el complejo y los dominios VCA de unas 5 a 10 veces). Además, arpC1 no sólo contribuye a la interacción entre el complejo y sus activadores, sino que también es necesaria para mantener la actividad nucleadora del complejo. Por último, al igual que algunos mutantes de la familia WASP (Lechler y Li, 1997), la delección de *arpC1* produce defectos en endocitosis y exocitosis (Pan *et*

al., 2004). La subunidad arpC3 presenta una conformación en forma de haz con cuatro hélices α conectadas por largas superficies en forma de giro. Un complejo carente de arpC3 muestra una ligera reducción en la frecuencia de ramificación de la actina. Si esto se combina con la ausencia de arp3, el complejo es incapaz de nuclear actina incluso en presencia de sus activadores. Estos resultados apuntan a que la proteína arpC3 podría regular la actividad del complejo, favoreciendo el correcto posicionamiento de otras subunidades o la interacción con los NPFs (Gournier *et al.*, 2001; Rouiller *et al.*, 2008). La subunidad arpC5 interacciona con las subunidades arpC4, arpC1 y arp2. La asociación con las subunidades arpC4 y arpC1 se establece a través del extremo amino, lo que al mismo tiempo podría reforzar la interacción entre estas dos subunidades y arp2, y actuar como elemento de comunicación entre ellas (Robinson *et al.*, 2001). Por otra parte, arpC5 envuelve a arp2, por lo que podría también contribuir a su anclaje al resto del complejo durante los distintos cambios conformacionales (Rouiller *et al.*, 2008). Finalmente, arp2 y arp3 forman un dímero que sirve como molde para la incorporación del primer monómero de actina del filamento hijo (Dalhaimer *et al.*, 2008; Nolen y Pollard, 2008; Rouiller *et al.*, 2008; Winter *et al.*, 1997).

- Cambios conformacionales del complejo. Activación e inactivación

El complejo arp2/3 es la "semilla" necesaria para la polimerización de un nuevo filamento de actina en el lateral de uno preexistente. No obstante, la actividad del complejo arp2/3 es bastante ineficiente, por lo que necesita de su interacción con los NPFs, los monómeros de actina y un filamento madre. Gracias a la determinación de la estructura cristalográfica del complejo (Robinson *et al.*, 2001), se han podido analizar las conformaciones que adopta en su forma activa e inactiva, así como los cambios que ocurren tras la unión de las distintas proteínas reguladoras. Trabajos recientes en eucariotas superiores han revelado la existencia de 3 conformaciones distintas, denominadas "abierta", "intermedia" y "cerrada" en base a la distancia

entre las subunidades arp2, arp3 y arpC3, que son las que sufren mayores cambios al pasar de una conformación a otra (Fig. 16A) (Rodal *et al.*, 2005b). La conformación “abierta” representa el estado inactivo del complejo, y en ella las subunidades arp2 y arp3 se encuentran demasiado alejadas como para formar el dímero necesario para la incorporación del primer monómero de actina. Por el contrario, la conformación “cerrada” es la forma activa, en la que arp2 y arp3 se aproximan permitiendo la unión de la actina, mientras que la forma “intermedia” es un estado de transición entre las dos anteriores. Estas conformaciones se encuentran conservadas desde levaduras a eucariotas superiores. Además, en este trabajo se obtienen tres conclusiones importantes:

- El complejo arp2/3 se encuentra en equilibrio entre las diferentes conformaciones.
- La transición al estado activo es un paso previo a la nucleación de actina.
- La subunidad arpC2 tiene una gran importancia en la regulación de la transición entre los estados “abierto” y “cerrado”.

Por otra parte, la transición entre las distintas estructuras está regulada por la interacción con proteínas reguladoras. Así, mientras el estado “cerrado” está relacionado con la interacción de arpC2 con el filamento madre y la interacción de arp2, arp3 y arpC1 con las proteínas de la familia WASP, la asociación de la coronina (crn1) a arpC2 produce el cambio a la conformación “abierta” (Fig. 16B). Sin embargo, la transición a la conformación activa no es suficiente para promover la nucleación de la actina, siendo necesario que las proteínas de la familia WASP proporcionen un monómero de actina al “*barbed end*” del filamento naciente (Welch y Mullins, 2002), y la alteración de la conformación de las subunidades arp para promover la nucleación (Dayel *et al.*, 2001; Dayel y Mullins, 2004; Le Clainche *et al.*, 2001; Le Clainche *et al.*, 2003).

- Interacción filamento-complejo arp2/3. Ramificación

El complejo arp2/3 promueve la formación de

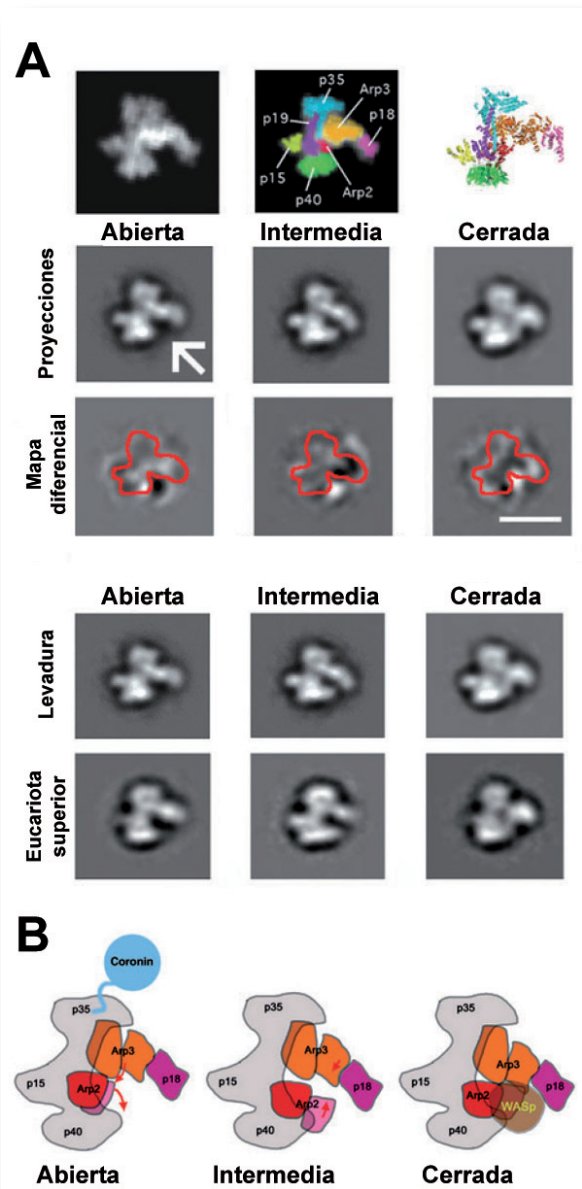


Figura 16.- Dinámica estructural del complejo arp2/3. **A.** El complejo arp2/3 presenta distintas conformaciones estructurales (abierta, intermedia, cerrada) relacionadas con su activación. Esta dinámica se encuentra conservada desde eucariotas inferiores hasta animales. **B.** Modelo de activación-inhibición del complejo arp2/3 en relación con su dinámica conformacional. Modificado de Rodal *et al.* (2005b).

filamentos de actina ramificados a partir de un filamento previo, lo que permite formar complejas redes de actina presentes en los parches de levaduras, lamelopodios de amebas o células humanas en movimiento. El complejo arp2/3 se une a un filamento preexistente o filamento madre orientando sus subunidades arp2 y arp3 como “*pointed end*” del filamento naciente o filamento hijo (Egile *et al.*, 2005), lo que genera un nuevo filamento con un ángulo de 70° con respecto al madre (Fig. 17A y Video_2). Para

que se produzca esta interacción y la formación de un nuevo filamento son necesarios una serie de cambios conformacionales en la estructura del complejo (Pollard, 2007; Rouiller *et al.*, 2008). Las proteínas arpC1, arpC2, arpC4 y arpC5 apenas sufren cambios, mientras que arp2 y arp3 se reorientan para formar las dos primeras subunidades del “pointed end” del nuevo filamento. En esta reorientación, arp2 se mueve hacia arp3 formando un dímero, lo que hace que se cierre el espacio existente entre ambas proteínas. Adicionalmente, los subdomios 3 y 4 de ambas proteínas giran unos 15° en relación con los subdomios 1 y 2. De esta manera, las regiones de interacción de arp2 con arpC1, arpC2 y arp3 cambian completamente, adaptándose al modelo de ramificación (Video_3). Estos cambios permiten una extensa interacción entre el complejo y el filamento madre. Cinco monómeros del filamento, M1-M4 y M6, y todas las subunidades del complejo participan en esta interacción (Fig. 17B). Los monómeros M2 y M4 interactúan con todas las subunidades del complejo excepto arp3. Un resumen de las interacciones y funciones de cada una de las subunidades se detalla a continuación:

a) arpC2 y arpC4 forman un heterodímero que provee la principal superficie de

interacción del complejo con el filamento madre y el sitio de anclaje de arp3. Este heterodímero es crucial para la formación de las ramificaciones (Gournier *et al.*, 2001).

- b) arpC3 forma un puente entre los monómeros M4 y M6 del filamento con arp3, regulando la transición “abierto-cerrado”. Esta regulación no es esencial, ya que la ausencia de arpC3 no afecta sustancialmente a la funcionalidad del complejo (Gournier *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 1999a).
- c) arpC5 parece contribuir a la ramificación de dos maneras. Por un lado, proporciona un ligero contacto con el filamento madre (subunidad M2) y por otro ayuda al anclaje de arp2 al resto del complejo durante los cambios conformacionales que posicionarán a arp2 como segunda subunidad del filamento hijo (Winter *et al.*, 1999a).
- d) arpC1 apenas contribuye al anclaje con el filamento madre, aunque tiene funciones esenciales en la activación del complejo (Kelly *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2004; Rodal *et al.*, 2005b).
- e) arp2 y arp3 forman un dímero que sirve

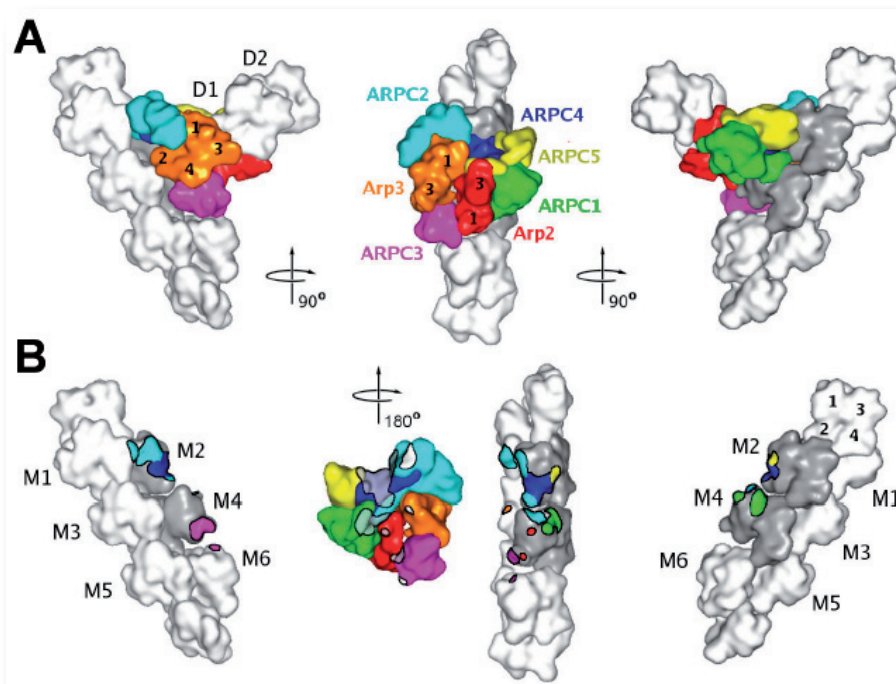


Figura 17.- Ramificación de los filamentos de actina. A. Modelo tridimensional de la interacción filamento madre-complejo arp2/3. D1-D2: primeras subunidades del filamento de actina naciente. **B.** M1-M6: subunidades del filamento madre que interactúan con el complejo arp2/3, el código de colores indica la subunidad del complejo con la que interactúan. Tomado de Rouiller *et al.* (2008).

como molde para la incorporación del primer monómero de actina del filamento hijo. arp3 reproduce la primera subunidad el dímero, mientras arp2 se coloca como segunda subunidad (Dalhaimer *et al.*, 2008; Nolen y Pollard, 2008; Rouiller *et al.*, 2008; Winter *et al.*, 1997).

- Factores Promotores de la Nucleación (NPFs)

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el complejo arp2/3 presenta una baja actividad, necesitando de otra serie de proteínas para realizar su función. Un grupo de especial importancia son los NPFs, proteínas capaces de conectar la actina con el complejo arp2/3 para aumentar su actividad.

En *S. cerevisiae* se han identificado cinco NPFs: Las17, Myo3, Myo5, Pan1 y Abp1 (Duncan *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2000; Goode *et al.*, 2001; Lechler *et al.*, 2000; Winter *et al.*, 1999a). Cada NPF posee un dominio A que facilita su interacción con el complejo arp2/3, y al mismo tiempo son capaces de interactuar con la actina (Las17 con la forma monomérica, transfiriéndola al filamento naciente y el resto de ellas con el filamento de la actina, favoreciendo la interacción entre el complejo arp2/3 y el filamento preexistente). Mediante distintas aproximaciones, se ha demostrado que los NPFs tienen funciones solapantes y con diferente nivel de relevancia. Así, mientras Las17 es el NPF más importante,

Pan1, Myo3 y Myo5 sólo llevan a cabo funciones auxiliares o complementarias (D'Agostino y Goode, 2005).

Las17, también llamado Bee1, fue el primer NPF identificado en levaduras en base a su similitud de secuencia con las proteínas de la familia WASP de mamíferos. En su extremo amino presenta un dominio EVH1, que está presente en las proteínas Ena/VASP de mamíferos y sirve para la interacción con otras proteínas. La región central de la proteína es rica en prolinas, lo que permite su interacción con los dominios SH3 de otras proteínas (Tong *et al.*, 2002). Finalmente, el extremo C-terminal contiene el dominio VA que interviene en la activación del complejo Arp2/3. Los tres dominios son necesarios para la activación del complejo (Fig. 18). La delección de *LAS17* provoca graves defectos en la organización de los parches, mientras que ensayos *in vitro* han demostrado que tiene un papel esencial en el ensamblaje de la actina (Lechler y Li, 1997; Li, 1997).

La mayoría de los miembros de la familia WASP (incluidas las proteínas SCAR/WAVE y N-WASP que no están conservadas en levaduras) presentan un mecanismo de regulación por autoinhibición (mediado por la interacción de los dominios amino y carboxilo) o trans-inhibición (mediado por interacción con otras proteínas) (Bompard y Caron, 2004; Moseley y Goode, 2006).

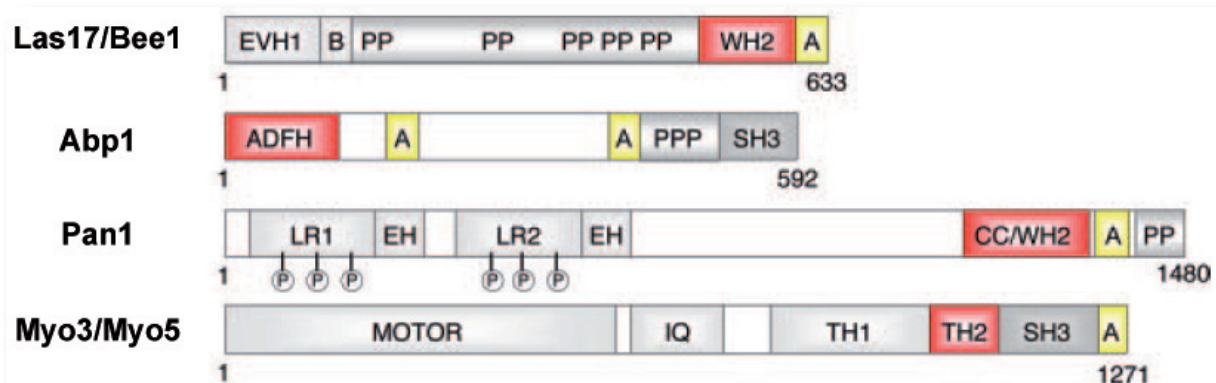


Figura 18.- Principales factores promotores de la nucleación (NPF) descritos en *S. cerevisiae*. Módulos presentes en cada uno de los NPF. **Las17/Bee1:** EVH1 (“Ena/VASP Homology”), B (Básico), PP (PoliProlinas), WH2 (“WASP Homology”), A (Ácido). **Abp1:** ADFH (“ADF/cofilin homology”), A (Ácido), PPP (PoliProlinas), SH3 (“Src homology 3”). **Pan1:** LR1 y 2 (“Long Repeat”), EH (“Eps15 Homology”), CC (“Coiled-Coil”), WH2 (“WASP Homology”), A (Ácido), PP (PoliProlinas). **Myo3/Myo5:** MOTOR (Dominio Motor), IQ (“IQ Binding”), TH1, 2 (“Tail Homology”), SH3 (“Src homology 3”), A (Ácido).

En cualquier caso, esta inhibición está regulada por las GTPasas de la familia Rho. Un ejemplo claro es la eliminación de la inhibición de las proteínas N-WASP por parte de Cdc42 mediante su interacción directa con el dominio GBD (GTPase-Binding Domain) de estas proteínas (Rohatgi *et al.*, 2000). Sin embargo, Las17 carece de este dominio de interacción con GTPasas, lo cual indicaría que está activa constantemente, y por tanto promoviendo la activación del complejo Arp2/3. Esta situación requiere de un sistema de regulación alternativo, y diversos trabajos han demostrado que proteínas como Sla1, Bbc1, Vrp1, Rvs167, Lsb1, Lsb2, Lsb3 y Lsb4 interactúan con Las17 y podrían contribuir a su regulación (Evangelista *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000; Li, 1997; Madania *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2009a; Tong *et al.*, 2002).

Otro NPF es Pan1, que en su extremo amino presenta dos dominios EH (de homología a Eps15) y dos regiones susceptibles de fosforilación, mientras que en el extremo carboxilo contiene una región “*coiled-coil*”, un dominio VA y un pequeño fragmento rico en prolinas (Fig. 18). Pan1 se ha relacionado con el reclutamiento del complejo Arp2/3 próximo al filamento madre, estimulando la nucleación y favoreciendo la ramificación (Moseley y Goode, 2006; Rodal *et al.*, 2005a). Además, interviene de manera esencial en los procesos de endocitosis y crecimiento polarizado.

Myo3 y Myo5 son dos miosinas de Clase I que participan en la activación del complejo Arp2/3. Ambas presentan una organización similar, con un dominio motor en el extremo N-terminal seguido de un dominio TH1 (de unión a lípidos), un dominio TH2 (de unión a actina), y finalmente un dominio SH3 (de interacción proteína-proteína) y un dominio A de unión al complejo Arp2/3 (Fig. 18). Los dominios TH2-SH3-A son suficientes para la activación del complejo *in vitro* (Lee *et al.*, 2000). Además de esta función en la activación del complejo Arp2/3, Myo3 y Myo5 se han relacionado con la escisión y movilidad de los parches durante la endocitosis (Idrissi *et al.*, 2008; Jonsdottir y Li, 2004). Myo3 y Myo5 forman parte

de un gran complejo implicado en la activación del complejo Arp2/3 y la endocitosis (Evangelista *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000).

Abp1 se compone de un dominio ADFH (ADF/cofilin Homology), un dominio de unión a actina, dos dominios A, una región rica en prolinas y un dominio SH3 en su extremo C-terminal (Fig. 18). Se le han asignado funciones en el desensamblaje de estructuras endocíticas y el reclutamiento del complejo Arp2/3 junto al filamento madre (con una sutil actividad como NPF) (Goode *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2005).

A parte de los NPFs descritos en *S. cerevisiae*, se han identificado otra serie de proteínas que también activan al complejo Arp2/3 en otros organismos modelo. Un ejemplo de ello son los miembros de una familia de proteínas ricas en prolinas, denominadas verprolinas (en levaduras) o proteínas WIP (“WASP-Interacting Protein”) en eucariotas superiores. En levaduras, las verprolinas coordinan la actividad de las proteínas WASP y miosinas Clase I en el ensamblaje del complejo arp2/3 (Sirotkin *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). En mamíferos, existen evidencias de que las proteínas WIP son necesarias para el correcto funcionamiento de las proteínas WASP (Rajmohan *et al.*, 2006). Otras proteínas relacionadas con este proceso son las incluidas en la familia PCH. En la levadura de fisión, cdc15 participa en los procesos de endocitosis y citoquinesis (Carnahan y Gould, 2003). En la levadura de gemación, la proteína Bzz1 forma parte del complejo Las17-Myo3-Myo5-Vrp1 que se concentra en los parches de actina (Soulard *et al.*, 2002). En mamíferos, proteínas de esta familia activan el complejo N-WASP-WIP, que estimula la polimerización de actina a través del complejo Arp2/3 (Ho *et al.*, 2004).

- El complejo arp2/3 a nivel celular. Endocitosis

La participación de los parches de actina en la endocitosis en levaduras es uno de los procesos celulares mejor estudiados. El modelo actual de endocitosis propone la intervención secuencial de

cinco módulos con diferente dinámica y funciones (Galletta y Cooper, 2009; Kaksonen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Tonikian *et al.*, 2009):

1. Módulo de lípidos: formado por fosfoinositósidos (PIP_2), recubre la membrana endocítica y recluta a las proteínas que van a intervenir en los pasos sucesivos.
2. Módulo de cubierta: su principal componente es la clatrina, que se acumula en la región donde se va formar la vesícula e interacciona con el PIP_2 y otras proteínas adaptadoras. Estas proteínas de la cubierta anclan y regulan los filamentos de actina, a la vez que confieren una curvatura a la región de la vesícula.
3. Módulo de WASP/MYO: Está compuesto por las proteínas de la familia WASP y las miosinas de Clase I. Este módulo de proteínas se mantiene asociado a la membrana e inicia la polimerización de la actina, permitiendo el reclutamiento de las proteínas del módulo de actina.
4. Módulo de actina: Las proteínas que componen este módulo son las responsables de la polimerización de la actina y de generar la fuerza necesaria para la invaginación de la vesícula. Sus componentes más destacados son la

actina y el complejo arp2/3.

5. Módulo de escisión: responsable de la escisión de la vesícula, estas proteínas llegan a los sitios de endocitosis después de que haya empezado la polimerización de la actina, participando en las etapas finales en las que la vesícula endocítica se separa de la membrana. Durante su actuación, estas proteínas se mueven hacia el interior del citoplasma acompañando a la vesícula. Este módulo está formado por las proteínas Rvs161 y Rvs167 (en *S. cerevisiae*).

El proceso de endocitosis comienza con la acumulación de PIP_2 en una región concreta de la membrana plasmática, a la que se unen las proteínas de la cubierta (Fig. 19, Estado 1). Usando como anclaje estas proteínas, se ensamblan las proteínas del complejo WASP/MYO, dando comienzo la polimerización de una pequeña red de actina que sirve de andamiaje para otras proteínas (Estado 2). La síntesis de la actina de los parches por parte del complejo arp2/3, junto con la fuerza motora de las miosinas empuja y deforma la membrana, creando una invaginación en la misma. Proteínas con dominios BAR se unen a los PIP_2 presentes en esta invaginación evitando su defosforilación por las fosfatasa (Estado 3-4). Sin embargo, la

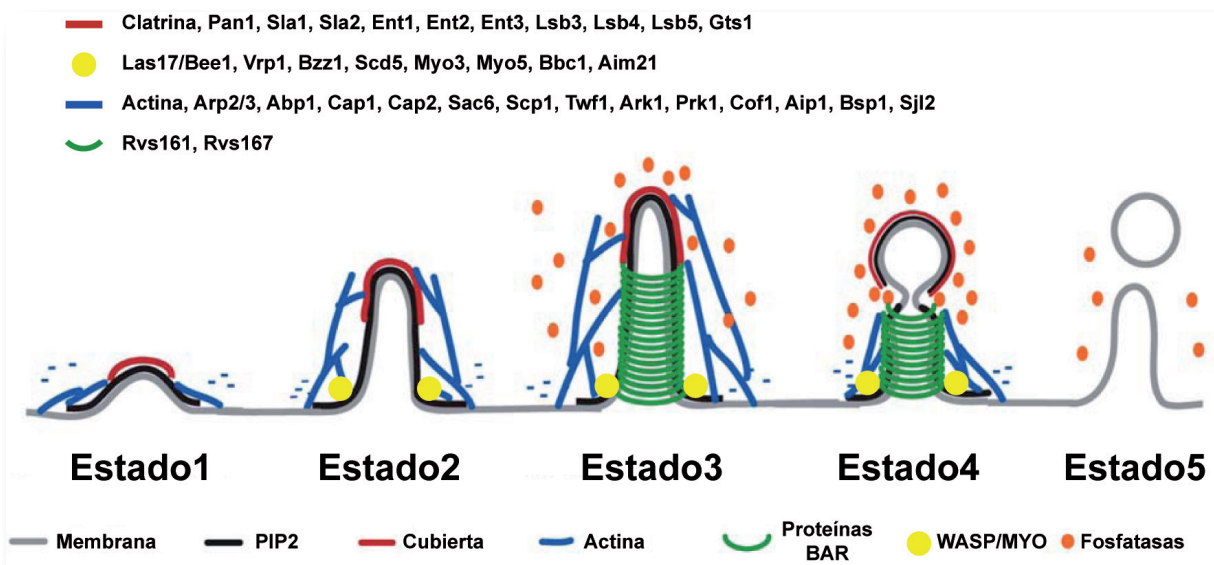


Figura 19.- Modelo del proceso de endocitosis en levaduras. Modificado de Liu *et al.* (2009).

región más interna de la invaginación únicamente contiene las proteínas de la cubierta, que no son capaces de proteger a los PIP₂ de las fosfatasa, lo que hace que se creen una serie de tensiones que deforman esta región. Las tensiones generadas por la curvatura de la membrana junto con la hidrólisis de PIP₂ por parte de las fosfatasa crean un sistema de retroalimentación positiva que facilita la escisión de la vesícula por la acción de las proteínas Rvs161 y Rvs167 y las miosinas de Clase I (Estado 4-5). Tras la escisión de la vesícula, todos los PIP₂ son hidrolizados promoviendo el desensamblaje de la maquinaria de endocitosis.

Recientemente se ha descrito la posible participación de un nuevo módulo de proteínas que sería responsable de agrupar y coordinar las actividades del resto de los módulos durante la endocitosis (Tonikian *et al.*, 2009). Este módulo se compone, al menos, de las proteínas Lsb3 y Lsb4 (en *S. cerevisiae*), y estarían especialmente relacionadas con las proteínas de la cubierta, WASP/MYO y el módulo de actina. Lsb4 junto con Las17/Bee1 promueve la polimerización de actina *in vitro*. Además, la delección de Lsb4 junto con Lsb3 limita la movilidad de las vesículas de endocitosis hacia el interior celular apoyando la hipótesis de que Lsb4 podría estar implicado en la polimerización de actina durante estos procesos (Robertson *et al.*, 2009a).

d) El complejo arp2/3 y la endocitosis en *S. pombe*

Al igual que en otros organismos, en *S. pombe* el complejo arp2/3 es responsable de la nucleación de los filamentos de actina que componen los parches. Sin embargo, se han observado diferencias en su dinámica entre la levadura de gemación y la levadura de fisión (Sirotkin *et al.*, 2005). A pesar de que la secuencia de ensamblaje de las proteínas WASP y las miosinas de Clase I es similar en ambas levaduras, el tiempo de vida de los parches de Las17 en *S. cerevisiae* (40 s) (Kaksonen *et al.*, 2003) es significativamente mayor al de los parches de wsp1 en *S. pombe* (10-17 s). Por otra parte, en *S. cerevisiae* el movimiento de los

parches de actina tiene dos fases, una primera en la que los parches se desplazan lentamente (25 nm/s) una distancia corta (200 nm), seguida de una segunda fase de movimiento rápido y mayores distancias (Kaksonen *et al.*, 2003). Por el contrario, en *S. pombe* el movimiento es de unos 800 nm y la velocidad media de 90 nm/s. Una tercera diferencia radica en la dependencia de los activadores, ya que mientras en *S. cerevisiae* la delección de la verprolina produce la despolimerización de los parches y defectos en endocitosis, el mutante *vrp1Δ* de *S. pombe* mantiene los parches bien polarizados y no presenta defectos aparentes a 25°C (Donnelly *et al.*, 1993; Sirotkin *et al.*, 2005; Vaduva *et al.*, 1997).

El tiempo medio de vida de las miosinas de Clase I en los parches es similar en ambas levaduras (10-20 s), pero presentan diferencias en cuanto a sus funciones. En ambas levaduras las miosinas de Clase I son necesarias para la activación del complejo, pero mientras que en *S. cerevisiae* también intervienen en la endocitosis promoviendo la escisión de las vesículas y el movimiento de los parches, en el mutante *myo1Δ* de *S. pombe* los “lipid-rafts” están deslocalizados pero no existen defectos en endocitosis (Jonsdottir y Li, 2004; Takeda y Chang, 2005). Sin embargo, trabajos recientes indican que la deslocalización de los “lipid-rafts” y de *myo1* producen defectos en la polarización de la actina y el bloqueo de la endocitosis (Attanapola *et al.*, 2009; Codlin *et al.*, 2008).

Otra diferencia observada entre ambas levaduras es la función de los homólogos de la anffisina, Rvs161 y Rvs167 en *S. cerevisiae* y *hob3* y *hob1* en *S. pombe*. La delección de los genes *RVS* en *S. cerevisiae* provoca defectos en la organización de la actina y la endocitosis, mientras que *hob1* parece no ser tan importante durante la endocitosis (Crouzet *et al.*, 1991; Lombardi y Riezman, 2001; Munn *et al.*, 1995; Routhier *et al.*, 2003). La función de *hob1* en *S. pombe* está relacionada con el crecimiento celular y la polaridad, mientras que *hob3* interviene en la regulación de la citoquinesis a través de *cdc42* (Coll *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005).

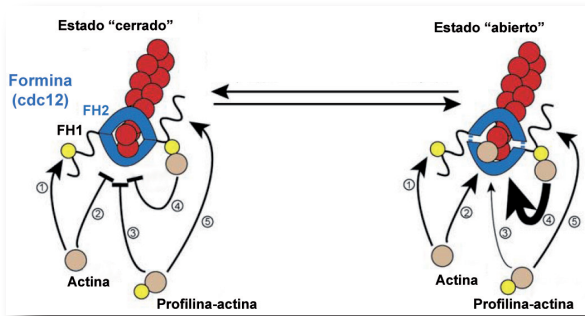


Figura 20.- Interacción entre las forminas y la profilina en el proceso de elongación de los cables de actina. Los dímeros FH2-FH2 de las forminas se mantienen en un equilibrio entre un estado cerrado o inactivo y un estado abierto o activo. Durante el estado abierto, la actina puede incorporarse al filamento de manera directa (2) o mediante su unión a la profilina asociada a los dominios FH1 de la formina (1). El complejo profilina-actina puede unirse directamente a los filamentos de actina (3), aunque la mayor eficiencia en la incorporación de monómeros de actina se consigue mediante la unión del complejo profilina-actina al dominio FH1 de la formina (5 y 4). Esta unión favorece el estado abierto del dímero FH2-FH2, la orientación apropiada de los monómeros de actina para su incorporación al filamento y un aumento de la concentración de monómeros de actina en la región del “barbed end”. En el estado cerrado la incorporación de monómeros se encuentra bloqueada (2, 3 y 4).

e) Otras proteínas relacionadas con la actina

Aparte de las forminas y el complejo arp2/3, existe otro conjunto de proteínas que van a regular y modular los procesos de polimerización y despolimerización de la actina, que se resumen brevemente a continuación.

La primera de ellas es la profilina (cdc3 en *S. pombe*), que presenta dos regiones bien diferenciadas: una región de unión a monómeros de actina y otra de unión a motivos ricos en prolina (por ejemplo, dominios FH1). La profilina unida a un monómero de actina se considera el principal sustrato disponible en la célula para el ensamblaje de la actina. La profilina bloquea la adición de monómeros de actina en el “pointed end” de los filamentos pero permite, e incluso estimula, la adición de monómeros de actina en el “barbed end” (Fig. 20) (Kovar *et al.*, 2006; Kovar *et al.*, 2003). Dos son los mecanismos que contribuyen a este incremento en la tasa de polimerización:

- a) El anclaje del dímero profilina-actina al dominio FH1 de las forminas incrementa

la probabilidad de que la actina contacte con el “barbed end” en la orientación adecuada para su unión.

- b) El dímero profilina-actina puede influir en el equilibrio abierto-cerrado del dominio FH2 de las forminas. El ejemplo más claro es *cdc12* de *S. pombe*, que sólo puede incorporar nuevas subunidades de actina al filamento en presencia de profilina. Por otra parte, un aumento de la concentración del dímero profilina-actina debido a regiones ricas en prolina más largas en los dominios FH1 podría favorecer la transición abierto-cerrado de los dominios FH2 de las forminas. No obstante, no se ha podido establecer una relación directa entre el tamaño de las regiones ricas en prolina y la tasa de elongación.

Relacionadas con la profilina se encuentran las tropomiosinas, que tienen como función estabilizar los filamentos de actina en los cables y en el anillo contráctil, al tiempo que antagonizan con la cofilina en sus funciones (Nakano y Mabuchi, 2006b). En *S. pombe*, la tropomiosina *cdc8* además inhibe al complejo arp2/3, impidiendo la formación de filamentos ramificados (Blanchoin *et al.*, 2001; Mahaffy y Pollard, 2006). El modelo de interconexión entre la formina *cdc12*, la profilina *cdc3* y la tropomiosina *cdc8* se detalla a continuación (Fig. 21):

- a) La formina *cdc12* es responsable del ensamblaje de los filamentos de actina y permanece asociada al “barbed end”

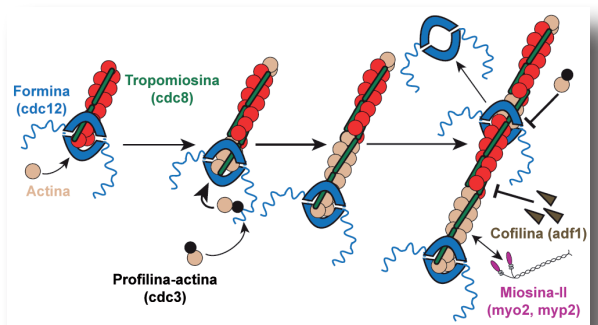


Figura 21.- Modelo de interacción entre *cdc12*, *cdc3* y *cdc8* en *S. pombe*. Modificado de Skau *et al.* (2009).

elongándolo (Kovar *et al.*, 2006; Kovar *et al.*, 2003; Yonetani *et al.*, 2008).

- b) *cdc8* se une preferentemente a los filamentos nuevos y ejerce una función protectora, impidiendo su disociación en monómeros. Además, la presencia de *cdc8* hace que *cdc3* añada monómeros de actina unas 15 veces más rápido. Por otra parte, *cdc8* permite a *cdc12* ensamblar unos filamentos con otros, aunque no está claro si esto implica el desensamblaje de *cdc12*. Aquellas moléculas de *cdc12* que quedan atrapadas entre dos filamentos serían incapaces de añadir nuevos monómeros de actina (Skau *et al.*, 2009).
- c) Finalmente, *cdc8* protege el filamento de la acción despolimerizadora de la cofilina *adf1* y regula la asociación de los filamentos con las miosinas de Clase II en el anillo (Nakano y Mabuchi, 2006b; Skoumpla *et al.*, 2007).

Otra proteína que interacciona con la actina es la cofilina (*adf1* en *S. pombe*), cuya función principal es la despolimerización de los filamentos y reciclaje de los monómeros de actina (Chen *et al.*, 2000; Lappalainen y Drubin, 1997). La distribución de los monómeros de actina en los filamentos no es homogénea, ya que aquellos que están unidos a ATP se asocian principalmente al “*barbed end*” del filamento, mientras que los que contienen ADP se localizan en el “*pointed end*”. La cofilina

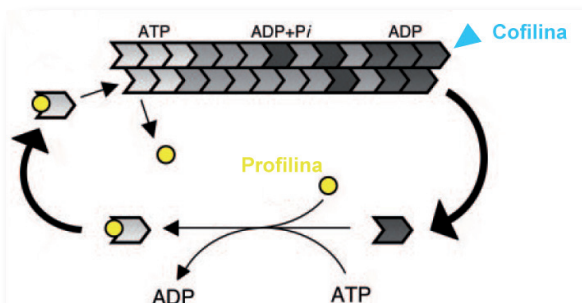


Figura 22.- Mecanismo de acción de la cofilina en el reciclaje de la actina. La cofilina está implicada en el reciclaje de la actina, siendo capaz de desensamblar aquellos filamentos en los que los monómeros de actina se encuentran asociados a ADP. En este proceso, la cofilina actúa de forma coordinada con *cdc3*, *cdc8* y *crn1*.

se une preferentemente a la región del filamento en la que la actina está asociada al ADP (Fig. 22) (Chan *et al.*, 2009; Nakano y Mabuchi, 2006b). En *S. pombe*, *adf1* parece que funciona de forma cooperativa con *cdc3* durante la citocinesis. En las fases iniciales, *adf1* desensambla los parches de actina de los polos celulares, permitiendo que los monómeros sean captados por *cdc3* para su reutilización en el ensamblaje del anillo de actina. *adf1* también se necesita para el ensamblaje del anillo contráctil, aunque su función no está clara. Por otra parte, *adf1* también está relacionada con la tropomiosina *cdc8*, ya que un balance entre la actividad de estas dos proteínas es esencial para el mantenimiento de la estructura del anillo (Nakano y Mabuchi, 2006b). Finalmente, *adf1* compite con el complejo *arp2/3* por los filamentos de actina, reduciendo su afinidad por los filamentos y la estabilidad de las ramificaciones (Chan *et al.*, 2009).

La coronina es otra proteína relacionada con el reciclaje de la actina, estando ampliamente conservada a lo largo de la evolución. La coronina contiene tres dominios claramente diferenciados: un dominio de unión a actina en el extremo N-terminal, una región central que varía en longitud, y una región “*coiled-coil*” en su extremo C-terminal. Este factor regula el citoesqueleto de actina de dos formas. Por un lado, actúa como inhibidor del complejo *arp2/3* favoreciendo su conformación abierta o inactiva (Fig. 16B) (Rodal *et al.*, 2005b). Por otro lado, la coronina bloquea

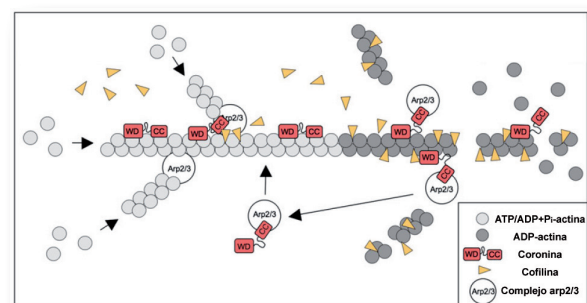


Figura 23.- Mecanismo de acción de la coronina en el reciclaje de la actina. La coronina interviene en la organización de la actina a dos niveles: por un lado, promueve la transición al estado abierto o inactivo del complejo *arp2/3* haciendo las ramificaciones inestables y por otro lado, coopera con la cofilina (*adf1*) en el desensamblaje de los filamentos de actina cuando ésta se encuentra unida a ADP.

la acción de la cofilina en la zona donde la actina esta unida a ATP, aunque tiene el efecto contrario cuando la actina está unida a ADP, cooperando con ella (Fig. 23) (Gandhi *et al.*, 2009).

4.2.3 Microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros de forma cilíndrica presentes en todas las células eucariotas, formados por la asociación no covalente de monómeros de tubulina (α y β -tubulina). Los microtúbulos son estructuras polares con dos extremos bien definidos, el polo +, dinámico y relacionado con el transporte de factores de polaridad, y el polo -, estático y normalmente asociado a la membrana nuclear (Hagan, 1998; Piel y Tran, 2009; Sawin y Tran, 2006). Durante el crecimiento vegetativo en *S. pombe*, los microtúbulos se organizan de diversas formas y desde distintos lugares en la célula, a los cuales se les ha denominado Centros Organizadores de Microtúbulos o MTOCs. Durante interfase, los microtúbulos citoplasmáticos se organizan desde el SPB, la membrana nuclear, los propios microtúbulos o el citoplasma. Al conjunto de estos MTOCs que funcionan durante interfase se les conoce como iMTOCs. En mitosis, los microtúbulos citoplasmáticos se desensamblan y se forman los microtúbulos intranucleares (cuya localización coincide con el huso mitótico) y los microtúbulos astrales, ambos desde el SPB. En las últimas etapas de la mitosis desaparecen los microtúbulos intranucleares y astrales y se forma

una nueva estructura en la región del septo de división, el "Post-Anaphase Array" o PAA. Al concluir la mitosis, esta estructura se desorganiza y se forman de nuevo los microtúbulos citoplasmáticos (Fig. 24).

En interfase, la célula contiene entre 3-5 haces de microtúbulos que desempeñan funciones relacionadas con el posicionamiento del núcleo, el crecimiento y la morfología celular (Daga y Chang, 2005; Daga y Nurse, 2008). Los microtúbulos astrales han sido relacionados con el alineamiento del huso mitótico con respecto al eje celular, pero no con su elongación (Sawin *et al.*, 2004; Tolic-Norrelykke *et al.*, 2004; Venkatram *et al.*, 2004). El PAA lleva a cabo sus funciones durante la citoquinesis, estabilizando el anillo de actomiosina y manteniendo alejados a los núcleos de las células hijas de la zona de división (Hagan y Hyams, 1988; Pardo y Nurse, 2003).

a) El complejo de la γ -tubulina

La polimerización de los microtúbulos *in vivo* requiere del complejo de la γ -tubulina, un complejo de unos 2MDa de tamaño formado por distintas proteínas entre las que se incluye la γ -tubulina. Este complejo funciona como molde para el ensamblaje de los microtúbulos, disminuyendo el umbral de monómeros de tubulina necesarios para que se produzca la polimerización (Gunawardane *et al.*, 2000; Oakley, 2000; Oegema *et al.*, 1999). En eucariotas superiores se han identificado dos versiones de este complejo, una pequeña (γ -TuSC) que contiene dos copias de la γ -tubulina y una copia de las proteínas GCP2 y GCP3, y una versión grande (γ -TuRC) que contiene múltiples copias de la γ -tubulina, GCP2 y GCP3, y una copia de las proteínas GCP4, GCP5 y GCP6. *In vitro* el complejo γ -TuRC es mucho más eficiente que el γ -TuSC (Fava *et al.*, 1999; Oegema *et al.*, 1999). En *S. pombe*, existen homólogos de todas las subunidades descritas en eucariotas superiores (γ -tubulina = *gtb1/tug1*; GCP2 = *alp4*; GCP3 = *alp6*; GCP4 = *gfh1* y GCP6 = *apl16*) (Fujita *et al.*, 2002; Horio *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991; Vardy y Toda, 2000; Venkatram *et al.*, 2004). Además, se han identificado al menos otras dos

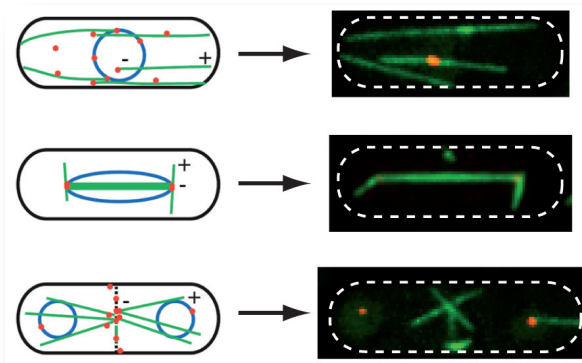


Figura 24.- Organización de los microtúbulos durante el ciclo vegetativo de *S. pombe*. Los microtúbulos en *S. pombe* presentan un gran dinamismo, formando diferentes estructuras a lo largo de su ciclo de vida (azul = núcleo; verde = microtúbulos; rojo = MTOCs).

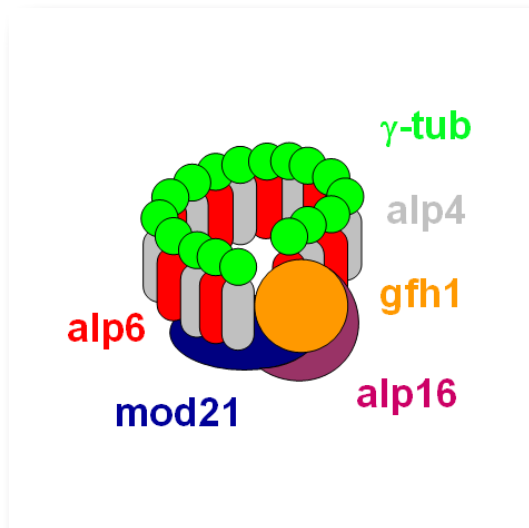


Figura 25.- Diagrama del complejo de la γ -tubulina. En *S. pombe* está formado por 6 subunidades: gtb1/tug1, alp4 y alp6 que son esenciales y forman el núcleo del complejo, y gfh1, alp16 y mod21 que no son esenciales y están fuera del núcleo del complejo.

proteínas (mod21 y mod22) que forman parte del complejo o bien promueven su funcionamiento (Anders *et al.*, 2006). gtb1, alp4 y alp6 son proteínas esenciales que forman el núcleo del complejo de la γ -tubulina en *S. pombe*, mientras que gfh1, alp16 y mod21 no son esenciales y no forman parte del núcleo (Fig. 25). mod22 podría promover el funcionamiento del complejo de la γ -tubulina (Anders *et al.*, 2006).

Al igual que en eucariotas superiores, en *S. pombe* también se han identificado dos posibles versiones del complejo de la γ -tubulina. La versión pequeña, compuesta por las proteínas gtb1, alp4 y alp6, es más abundante y relativamente inactiva, mientras que la versión grande, que está formada por la versión pequeña más alp16, gfh1 y mod21, es más escasa y eficiente (Anders *et al.*, 2006).

b) mto1 y mto2

Ambas proteínas juegan un papel fundamental en la formación de los microtúbulos desde los iMTOCs. No son necesarias para el ensamblaje del huso mitótico, pero la delección de cualquiera de ellas causa severos defectos en la organización de los microtúbulos (Samejima *et al.*, 2005; Samejima *et al.*, 2008; Sawin *et al.*, 2004; Venkatram *et al.*, 2005; Venkatram *et al.*, 2004).

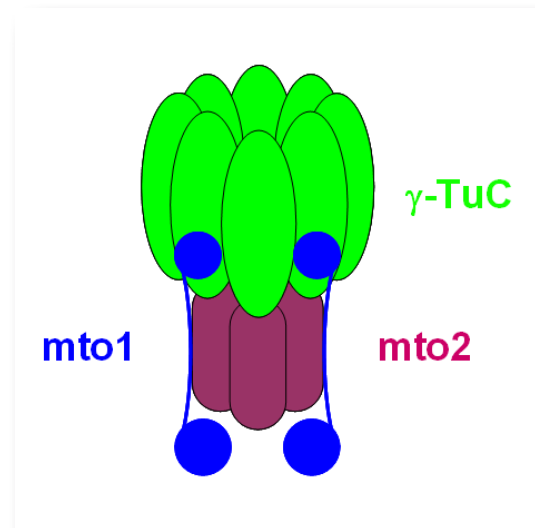


Figura 26.- Complejo mto1-mto2- γ -tubulina. Este complejo es necesario para el correcto funcionamiento de los MTOCs durante interfase. mto2 actúa como nexo de unión entre mto1 y el complejo de la γ -tubulina.

al., 2004). Ambas proteínas colocalizan y coimmunoprecipitan con el complejo de la γ -tubulina. Diversas evidencias apuntan a que mto1 y mto2 forman un complejo que recluta al complejo de la γ -tubulina en los MTOCs, estimulando la formación de los microtúbulos (Fig. 26). mto2 actúa como puente entre mto1 y el complejo de la γ -tubulina (Samejima *et al.*, 2005; Samejima *et al.*, 2008; Sawin *et al.*, 2004).

c) Los microtúbulos y su función celular

Dos son los procesos celulares en los que participan los microtúbulos, el control de la posición del núcleo y la regulación de la morfología celular a través de la localización de los factores de polaridad (Piel y Tran, 2009).

Para la localización del núcleo durante interfase, la célula utiliza las fuerzas generadas por los microtúbulos al chocar contra los polos celulares. A favor de este modelo está la arquitectura antiparalela de los microtúbulos, su dinámica y la geometría celular. Los microtúbulos se organizan en forma de haces antiparalelos a ambos lados del núcleo, lo que hace que las fuerzas aplicadas desde ambos lados de la célula sean similares, manteniendo el núcleo en el centro. Por otra parte, la regulación de la

dinámica de los microtúbulos asegura que las fuerzas generadas sean las adecuadas, ya que al chocar con los polos se despolimerizan evitando que se aplique una fuerza excesiva sobre el núcleo. Finalmente, la geometría celular influye favorablemente en el posicionamiento del núcleo.

En cuanto a la morfología celular, el citoesqueleto de actina es el responsable de dirigir el crecimiento celular, mientras que los microtúbulos son necesarios para determinar los puntos en los que se tiene que producir este crecimiento. Para ello ha de existir un equilibrio entre la tasa de liberación y dispersión de los factores de polaridad en la región de los polos celulares. Una vez iniciado el crecimiento, el citoesqueleto de actina es capaz de mantenerlo de forma independiente a los microtúbulos.

Así, los microtúbulos forman parte de un sistema de retroalimentación global que controla la morfología celular, mientras el citoesqueleto de actina forma parte de un sistema de retroalimentación local que controla el crecimiento celular en los polos.

4.3 Ciclo sexual

En *S. pombe*, la entrada en el ciclo sexual ocurre cuando dos células haploides de tipo sexual opuesto (h^+ y h^-) se encuentran y conjugan dando lugar a un cigoto diploide (Fig. 27A). Este proceso se activa por el intercambio recíproco, mediante difusión, de hormonas sexuales (factor-P y factor-M, respectivamente). Tras la formación del cigoto, la célula diploide sufre meiosis y esporulación, generando cuatro ascosporas haploides (Davey, 1998; Egel, 2000). La región que contiene la información que determina el tipo celular en *S. pombe* está constituida por tres componentes, situados en los loci *mat1*, *mat2* y *mat3*. El locus *mat1* determina el tipo sexual en función del alelo que presente, P en las células h^+ o M en las células h^- . Este locus contiene los genes *mat1-Pc*⁺ y *mat1-Pi*⁺ en las células h^+ o los genes *mat1-Mc*⁺ y *mat1-Mi*⁺ en las células h^- . *mat1-Pc* y *mat1-Mc* son necesarias para la expresión de sus feromonas y receptores. En los locus *mat2* y *mat3*, la información de los alelos M y P está almacenada pero no se expresa.

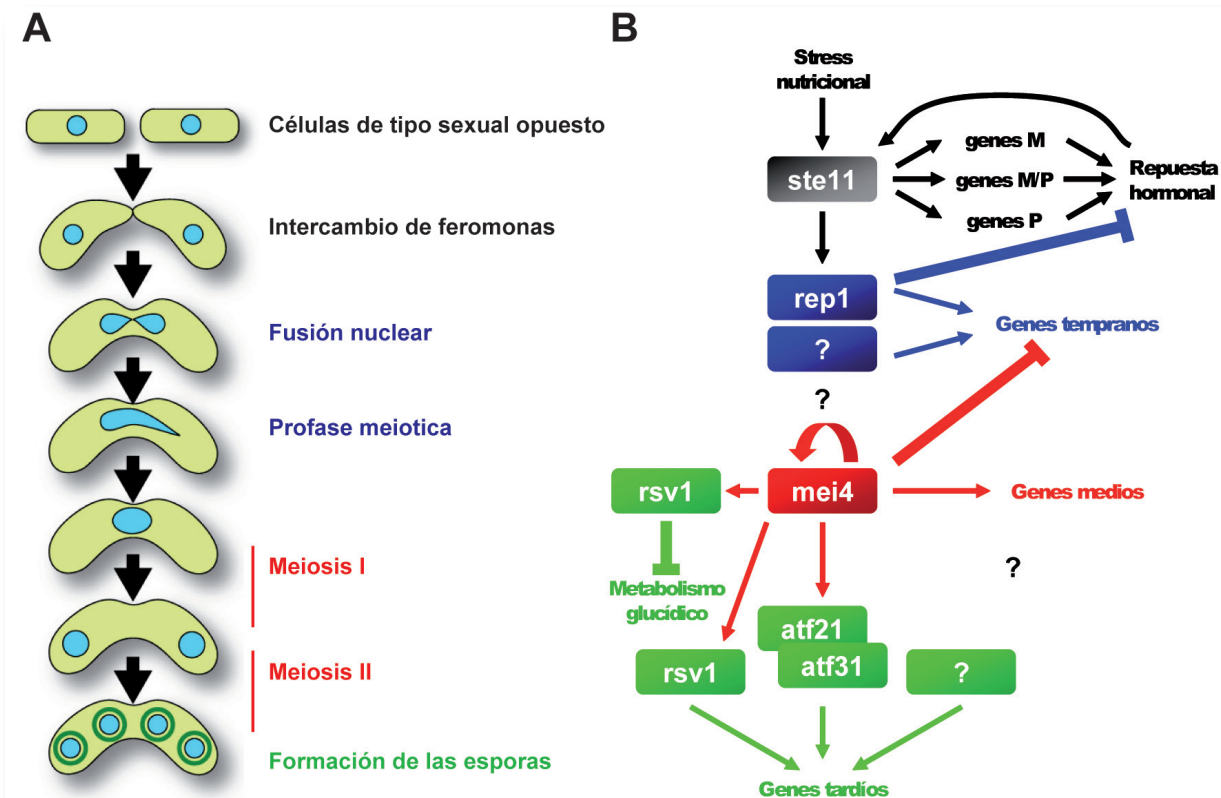


Figura 27.- Ciclo morfológico y celular de *S. pombe* durante la diferenciación sexual. A. Durante el ciclo sexual *S. pombe* presenta varias etapas entre las que cabe destacar: la conjugación y fusión de células de tipo sexual opuesto, la cariogamia o fusión nuclear, meiosis y esporogénesis. B. Cascada transcripcional del ciclo sexual.

Esta información puede ser transferida al locus *mat1* durante los cambios de tipo sexual (en células homotálicas h^{90} estos cambios suceden, aproximadamente, cada tres ciclos de división) (Kelly *et al.*, 1988).

La entrada en el ciclo sexual viene precedida de un estrés nutricional, provocado por la ausencia de nitrógeno en el medio, y que está controlada por los niveles citoplasmáticos de AMPc (AMP cíclico). La unión de las feromonas a sus receptores (*mam2*, receptor del factor-P; y *map3*, receptor del factor-M) desencadena una serie de cambios morfológicos (Imai y Yamamoto, 1994). Las células comienzan a crecer de forma polarizada hacia las feromonas de tipo sexual opuesto, generando unas proyecciones características denominadas “*shmoos*”, que se aglutinan facilitando la fusión celular (Fig. 27A). La fusión entre las células de tipo sexual contrario es completamente dependiente de la proteína *fus1*, ya que en su ausencia las células se aglutinan pero no se fusionan (Petersen *et al.*, 1995). Inmediatamente después de la fusión citoplasmática tiene lugar la cariogamia o fusión nuclear, que sucede en el cuello de conjugación y cuyo primer paso es la unión de los SPBs. Una vez formado el cigoto, entra en meiosis. La síntesis premeiótica de DNA duplica el contenido de DNA del cigoto, el núcleo adopta una forma en cola de caballo y comienza a moverse de un extremo a otro (este movimiento, regulado por el SPB y mediado por los microtúbulos citoplasmáticos, es necesario para facilitar el alineamiento de los cromosomas y la recombinación). Dos divisiones meióticas consecutivas generan cuatro núcleos haploides que son encapsulados para dar lugar a las ascosporas. Finalmente, la disolución controlada del asca y germinación de las esporas cierra el ciclo sexual (Davey, 1998; Shimoda, 2004).

4.4 Programa transcripcional del ciclo sexual

Durante el ciclo sexual tienen lugar una gran cantidad de eventos moleculares, físicos, bioquímicos y celulares. Una perfecta coordinación

entre todos ellos es esencial para los procesos de conjugación, cariogamia, meiosis, esporulación y dehiscencia. En este proceso, la expresión de al menos 2000 genes aumenta mientras que la de unos 700 disminuye, lo que supone que más del 50% de los genes sufren algún cambio en su regulación durante este proceso. Los genes que se inducen se han clasificado en cuatro grupos, basándose en su patrón temporal de inducción durante la diferenciación sexual (Mata *et al.*, 2002):

1. Genes de respuesta a cambios nutricionales (regulados por limitación de nutrientes o feromonas).
2. Genes tempranos (se inducen durante la fase S premeiótica y recombinación).
3. Genes medios (se inducen durante la división meiótica).
4. Genes tardíos (se inducen durante los procesos de formación de la espora y la dehiscencia).

Dentro del grupo de genes de respuesta a cambios nutricionales se han creado tres subgrupos: transitorios, continuos y retardados. La mayoría de los genes necesarios para la señalización hormonal y el control de entrada en meiosis pertenecen al subgrupo de genes retardados. Aquí se incluyen genes responsables del tipo sexual (*mat1-Pc⁺*, *mat1-Pi⁺*, *mat1-Mc⁺* y *mat1-Mi⁺*), genes que codifican las feromonas y sus receptores (*map2⁺*, *mfm1⁺*, *mfm2⁺* y *mfm3⁺*, *mam2⁺* y *map3⁺*), factores transcripcionales como *ste11⁺*, reguladores meióticos como *mei2⁺* o *pat1⁺* o el gen *fus1⁺*, responsable de la fusión celular durante la conjugación. El grupo de genes de expresión temprana, cuya inducción ocurre antes de la división meiótica, incluye genes implicados en la síntesis de DNA y recombinación. El pico de expresión de los genes medios coincide con la división meiótica, y en él se incluyen genes relacionados con la regulación y progresión del ciclo celular, quinesinas, componentes del SPB y quinasas. Los genes tardíos se inducen después de la división meiótica y se mantienen con un nivel de expresión elevado hasta el fin de la esporulación y la dehiscencia de las esporas.

El hecho de que en el proceso de diferenciación sexual en *S. pombe* más del 50% de su genoma cambie su expresión pone de manifiesto la necesidad de un sistema de control con capacidad de retroalimentarse y autorregularse.

4.5 Regulación transcripcional en cascadas

Durante el proceso de diferenciación sexual muchos factores de transcripción aumentan su expresión. Algunos de ellos son esenciales en los procesos de meiosis y formación de las esporas. Estudios recientes han demostrado la importancia de un control integral de la transcripción, apuntando que la progresión a lo largo del ciclo sexual se consigue gracias a varias oleadas de transcripción reguladas de forma intrínseca (Mata *et al.*, 2007).

4.5.1 ste11, control de la respuesta a cambios nutricionales

Condiciones limitantes en nutrientes, básicamente nitrógeno, inducen la expresión del gen *ste11*⁺, que codifica un factor de transcripción esencial para la diferenciación sexual. *ste11* induce cambios fisiológicos y morfológicos que culminan en el inicio del ciclo sexual. Este factor de transcripción activa la expresión de genes en ambos tipos sexuales, aunque también activa genes específicos en cada tipo (Fig. 27B). Un ejemplo de esto es la activación de los genes *mat1-Mc*⁺ y *mat1-Pc*⁺. En células M, *mat1-Mc* y *ste11* interaccionan físicamente y se unen directamente a los promotores de los genes específicos de células M. En células P, la unión de *mat1-Pc* a *map1* (factor de transcripción de la familia MADS-box) activa la transcripción de genes específicos de células P. De esta manera se induce la expresión de una serie de genes entre los que se encuentran los que codifican las feromonas y receptores de cada tipo sexual (Mata y Bahler, 2006).

4.5.2 rep1 regula la expresión de los genes tempranos

El factor de transcripción *rep1* está implicado

en la regulación de los genes tempranos cuyos productos son necesarios durante la fase S y la recombinación meiótica (Fig. 27B). Durante las primeras etapas de la diferenciación sexual, los genes que codifican para muchos factores de transcripción pertenecientes al ciclo mitótico también se inducen (*cdc10*⁺, *res2*⁺, *rep2*⁺), lo que podría indicar que colaboran con *rep1* en la regulación de los primeros momentos de la meiosis (Mata *et al.*, 2007).

4.5.3 mei4, el epicentro de la cascada

La proteína *mei4* es esencial para la progresión por meiosis I y tiene un papel capital en la regulación de la expresión de los genes medios (Abe y Shimoda, 2000; Horie *et al.*, 1998), aunque no se puede descartar que otros factores de transcripción también estén colaborando en la regulación. La delección del gen *mei4*⁺ no afecta a la expresión de los genes tempranos, pero la de la mayoría de los genes medios y tardíos se ve disminuida al menos dos veces. Distintos estudios han demostrado un control directo de *mei4* sobre los genes medios, aunque su efecto sobre los genes tardíos sería el resultado de la activación de los factores de transcripción que los controlan directamente (Fig. 27B).

4.5.4 Control de los genes tardíos

Varios son los factores de transcripción implicados en la regulación de los genes tardíos. Entre ellos se encuentran *atf21* y *atf31*, cuya delección afecta al 55% de los genes tardíos (Mata *et al.*, 2002). Trabajos recientes sugieren que *atf21* y *atf31* forman un heterodímero que coopera en el control de la expresión de los genes tardíos. Además, otros tres factores de transcripción pertenecientes a la familia bZIP están presentes en el genoma de *S. pombe*, lo que plantea la posibilidad de que diferentes combinaciones de estos factores regulen la expresión de distintos genes en función de los estímulos ambientales o del momento del desarrollo (Mata *et al.*, 2007). Este tipo de regulación ya es conocida en otros organismos (Newman y Keating, 2003; Weltmeier *et al.*, 2006).

Por otra parte, existen muchos genes que se expresan de manera independiente al heterodímero *atf21/atf31*, habiéndose identificado los genes *rsv1⁺* y *rsv2⁺*. *rsv2* es un factor de transcripción que activa la expresión de un subgrupo de genes implicados en los últimos pasos de meiosis, mientras que *rsv1* actúa como un represor transcripcional de los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos.

Por tanto, la regulación de los genes tardíos depende al menos de dos sistemas de transcripción independientes, el formado por los factores de la familia bZIP (donde se incluiría el heterodímero *atf21/atf31*) y el que constituiría *rsv2* (Fig. 27B).

La progresión a través del ciclo sexual requiere de un patrón temporal de expresión regulado por una cascada de factores de transcripción, en los que la expresión de algunos de ellos supone la inhibición de los anteriores y la activación de los siguientes. Este complejo programa de expresión génica se basa en dos pilares fundamentales. Primero, la regulación de las distintas oleadas de expresión, que se consigue gracias a una serie de interacciones positivas y negativas entre los diferentes factores de transcripción. *rep1*, cuya inducción transcripcional está mediada por *ste11*, activa la expresión de los genes tempranos. A su vez, lleva a cabo la represión de los genes de respuesta a feromonas que habían sido activados por *ste11*. Por otra parte, *mei4* activa la expresión de los genes medios, es esencial para la represión de los genes tempranos e induce la expresión de factores de transcripción que regulan a los genes tardíos. En segundo lugar, el uso combinado de diferentes factores de transcripción (heterodímeros *atf21/atf31*, *rsv2*...) aumenta la versatilidad del sistema, permitiendo expresar diferentes subgrupos de genes en respuesta a diferentes estímulos (Mata *et al.*, 2007). La correcta interrelación entre estas cascadas transcripcionales asegura la ordenada y unidireccional progresión del ciclo sexual (Fig. 27B).

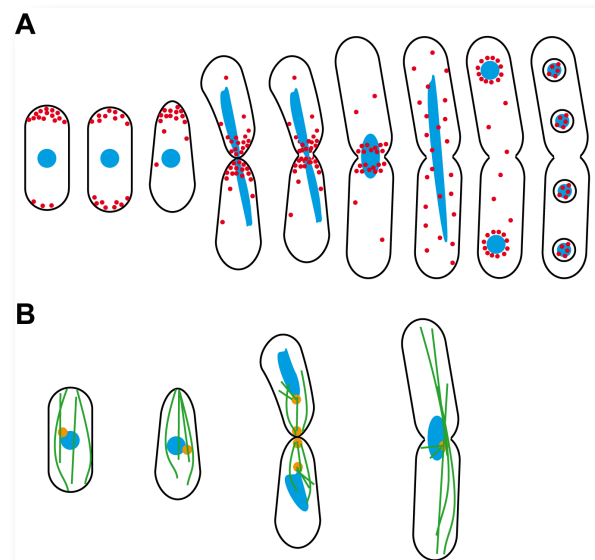


Figura 28.- Dinámica del citoesqueleto de actina y los microtúbulos durante el ciclo sexual de *S. pombe*. **A.** Dinámica del citoesqueleto de actina durante el ciclo sexual en *S. pombe*. En rojo se muestra la actina y en azul los núcleos. **B.** Dinámica de los microtúbulos durante el ciclo sexual en *S. pombe*. En verde se muestran los microtúbulos, en azul los núcleos y en naranja los MTOCs.

4.6 Morfogénesis durante el ciclo sexual

Durante la diferenciación sexual en *S. pombe*, la selección y mantenimiento de los sitios de crecimiento polarizado vienen definidos por señales externas, el gradiente de feromonas, lo que va afectar a la organización del citoesqueleto de actina y microtúbulos provocando cambios morfológicos importantes.

En ausencia de nitrógeno, las células se bloquean en la fase G1 del ciclo celular, con una distribución de los parches de actina monopolar (Fig. 28A). Tras un breve periodo, se produce una redistribución de los parches, siendo visibles en ambos polos. Este cambio en la localización de la actina aumenta las posibilidades de conjugación entre células de tipo sexual opuesto. En presencia de feromonas, las células manifiestan un crecimiento apical que conducirá a la formación de los “*shmoos*”. Los parches de actina se localizan en estas proyecciones para permitir el crecimiento polarizado hacia la célula de tipo sexual opuesto. Durante la conjugación y fusión nuclear, la actina se mantiene localizada en la región de contacto entre las dos células. Posteriormente, se deslocaliza en el citoplasma

hasta la prometafase o metafase II, momento en que se concentra alrededor de los núcleos para formar la membrana de la forespora. Finalmente, la actina se localiza en el interior de las esporas (Petersen *et al.*, 1998b).

Los microtúbulos no parecen tener una función importante en el crecimiento polarizado de los “*shmoos*”, aunque podrían tener alguna implicación en el posicionamiento de la zona de crecimiento, ya que defectos en los microtúbulos permiten la formación de “*shmoos*” desde las paredes laterales, dando lugar a zigotos en forma de H (Petersen *et al.*, 1998a). Hasta el momento, dos son los centros organizadores de microtúbulos descritos en *S. pombe* durante el ciclo sexual, el cuerpo polar del huso (SPB) y la proyección de los “*shmoos*” (Fig. 28B). El SPB es responsable de la organización de los microtúbulos citoplasmáticos, relacionados con los movimientos oscilatorios del núcleo durante la profase (Ding *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2001) mientras que el MTOC de la proyección regula la secreción de vesículas o moléculas implicadas en los procesos de conjugación y fusión celular (Niccoli y Nurse, 2002; Petersen *et al.*, 1998a). Estudios recientes han demostrado la existencia de otros dos MTOCs adicionales, la membrana nuclear y puntos discretos en el citoplasma (K. Sawin, comunicación personal).

Además del citoesqueleto, existen otras proteínas implicadas en la morfogénesis durante el ciclo sexual. Una de ellas es la formina *fus1*, implicada en la degradación de la pared celular, reorganización y fusión de la membrana plasmática durante la conjugación. La delección de este gen provoca la acumulación de parejas de células aglutinadas, pero incapaces de fusionar sus citoplasmas. Junto a ella podemos encontrar a la profilina *cdc3*, cuyo alelo termosensible *cdc3.124⁺* presenta un fenotipo similar al del mutante *fus1Δ*; ambas proteínas colocalizan en la punta de los “*shmoos*” (Petersen *et al.*, 1998b; Petersen *et al.*, 1998c; Petersen *et al.*, 1995). Otra proteína con una posible función durante este proceso es la quinasa *pom1*, que podría ser necesaria para la regulación del citoesqueleto de actina durante las primeras etapas del proceso

de conjugación ya que los mutantes *pom1Δ* son incapaces de localizar los parches de actina en la punta del “*shmoos*” (Niccoli y Nurse, 2002). Estudios recientes han identificado una nueva proteína con una función durante meiosis. Se trata de *mcp4*, que regula el posicionamiento de la actina durante meiosis en el cierre de la membrana de la forespora (Ohtaka *et al.*, 2007).

Finalmente, proteínas que desempeñan un papel relevante durante el crecimiento vegetativo (como *tea1*, *tea2* o *tip1*) no parecen tener una gran importancia durante la diferenciación sexual. Esto apoya la teoría de que “existen dos programas de crecimiento diferentes durante el ciclo biológico de *S. pombe*”, que serían el resultado de la distinta organización del citoesqueleto de actina, los microtúbulos y la maquinaria de polarización celular a lo largo del mismo.

5. Enzimas hidrolíticas, β-glucanasas

Las β-glucanasas han sido descritas en gran variedad de organismos: invertebrados, plantas, hongos, algas y bacterias. Debido a esta amplia distribución en la naturaleza, las funciones son muy diversas: intervención en la movilización de las reservas intracelulares, digestión extracelular de polisacáridos no directamente asimilables por las células o participación en procesos de morfogénesis y diferenciación de plantas, hongos y levaduras.

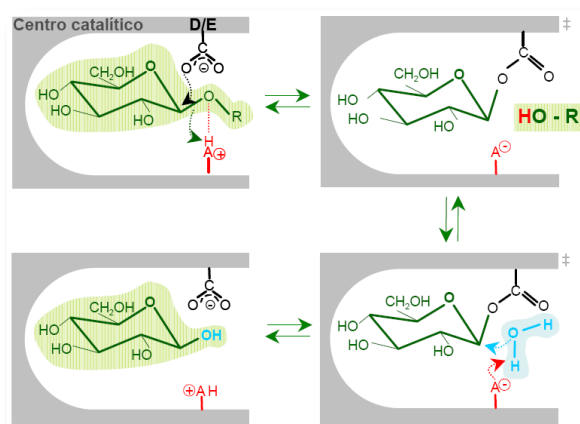


Figura 29.- Mecanismo de catálisis ácida de las hidrolasas que retienen la configuración. Se forma un intermediario covalente α-glicosil-enzima que posteriormente es hidrolizado a través de estados de transición de tipo ión oxocarbenio.

Su mecanismo de acción es común al resto de hidrolasas: catálisis ácida. Este mecanismo de hidrólisis se inicia por la protonación de un átomo de oxígeno glicosídico (Fig. 29). El protón es normalmente donado por un ácido, generalmente el del grupo carboxílico de un aspártico o glutámico o un grupo imidazol ionizado de una histidina. Este proceso lleva a la formación del intermediario sustrato-enzima, en el cual el sustrato permanece unido covalentemente al aminoácido nucleofílico de la enzima. El nuevo extremo reducido del glicósido es regenerado por hidrólisis del intermediario covalente enzima-sustrato mediante la adición de una molécula de agua al átomo de carbono anomérico. Al mismo tiempo, el donador de protones original de la enzima es reprotonado. El residuo aminoacídico que media en la reacción de protonación se denomina ácido catalítico y el que forma el intermediario con el sustrato, el nucleófilo catalítico.

Las β -glucanasas son hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace β -O-glicosídico propio de las cadenas de β -glucano, dando lugar a oligosacáridos y unidades de glucosa (Cid *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2007a; Nombela *et al.*, 1988). Respecto a la especificidad, se conocen β -glucanasas capaces de actuar sobre uniones $\beta(1,2)$, $\beta(1,3)$, $\beta(1,4)$ y $\beta(1,6)$, es decir, todas las uniones posibles de los β -glucanos naturales; incluso, algunas de ellas pueden hidrolizar indistintamente más de un tipo de enlace. Según el modo de acción sobre el polímero se pueden clasificar como exoglucanasas o endoglucanasas:

- a) Las exoglucanasas actúan sobre los enlaces terminales del extremo no reductor de la molécula de sustrato, originando glucosa como producto único de la hidrólisis. La mayoría de las exoglucanasas de levaduras son capaces de hidrolizar tanto enlaces $\beta(1,3)$ como enlaces $\beta(1,6)$ (aunque estos últimos con menor eficiencia) y, generalmente, poseen también actividad β -glicosidasa ya que hidrolizan glicósidos sintéticos como el PNPG (paranitrofenil- β -D-glucopiranosido) y 4-metil-umbeliferil- β -D-glucopiranosida (Abd-el-Al y Phaff, 1968;

Farkas *et al.*, 1973).

- b) Las endoglucanasas actúan sobre los enlaces internos de la cadena del β -glucano, liberando una mezcla de oligosacáridos, biosas y triosas. Las endoglucanasas de levaduras exhiben una marcada especificidad en cuanto al enlace a hidrolizar, conociéndose tanto $\beta(1,3)$ como $\beta(1,6)$ -endoglucanasas (Abd-el-Al y Phaff, 1968).

Las glucanasas y transglicosidasas se clasifican en familias basadas en similitud de secuencia y en la estructura tridimensional. Originalmente se establecieron 57 familias diferentes (Henrissat y Bairoch, 1996), aunque esta clasificación ha sido extendida y en la actualidad incluye 115 familias diferentes (Henrissat y Davies, 1997). Existe una base de datos que contiene la información actualizada sobre las diversas familias de hidrolasas, transglicosidasas y glicosil transferasas (CAZy).

Las β -glucanasas mejor estudiadas han sido las de hongos filamentosos y levaduras, donde se encuentran en más del 90% de los organismos analizados; concretamente, en el caso de las levaduras, donde el β -glucano constituye el principal polisacárido, están presentes en la casi totalidad de las especies estudiadas (Adams, 2004; Cid *et al.*, 1995; Nombela *et al.*, 1988). El crecimiento y modificación de los β -glucanos de la pared a lo largo del ciclo celular implica varios pasos sucesivos:

- a) La síntesis de los nuevos componentes de pared por parte de las sintasas.
- b) La hidrólisis dirigida, limitada y finamente regulada de los polímeros preexistentes por endo y exoglucanasas endógenas
- c) La ligación de los nuevos componentes con los preexistentes por acción de las glucanosil transferasas, generando uniones diversas y ramificaciones.

El organismo donde las β -glucanasas y transglicosidasas han sido mejor estudiadas es *S. cerevisiae*. Existen aproximadamente 20 genes en esta levadura que codifican polipéptidos con estas actividades, lo que indica que *S. cerevisiae*

contiene un complejo sistema enzimático de remodelación de la pared celular (Adams, 2004; Cid *et al.*, 1995; Nombela *et al.*, 1988).

5.1 Familia 81 de las glicosil hidrolasas

En la familia GH81 se han incluido hasta el momento 80 proteínas de distintos orígenes que poseen una región común de unos 650 aminoácidos con una elevada similitud de secuencia, aunque para muchas de ellas aún no se ha demostrado su actividad enzimática. Los primeros miembros de la familia identificados fueron las proteínas ScEng1 y ScEng2/Acf2 de *S. cerevisiae*. Estas dos proteínas poseen características diferentes que indican una distinta localización en la célula. Así, mientras que ScEng1 posee las características típicas de una proteína extracelular (una secuencia señal en el extremo N-terminal que precede a un dominio rico en Ser-Thr), ScEng2 carece de secuencias de localización y posee una región rica en prolinas (Pro) cerca del extremo N-terminal, lo que indicaría que permanece en el citoplasma (Fig. 30). Estas predicciones han sido confirmadas experimentalmente, y se ha descrito que ScEng1 es una proteína altamente glicosilada que es secretada a la pared celular mientras que ScEng2 no contiene carbohidrato y permanece en el citoplasma (Baladrón *et al.*, 2002). Un análisis de la secuencia aminoacídica de las proteínas

de *C. albicans* y *S. pombe* sugiere que CaEng1 y Speng1 tienen características similares a ScEng1 mientras que CaEng2 y Speng2 son similares a ScEng2. *A. fumigatus* posee una única proteína de esta familia (AfEng1) que posee secuencia señal pero carece de la región rica en Ser-Thr. Proteínas de esta familia están también presentes en otros hongos y levaduras, en plantas y recientemente se han encontrado en bacterias.

Respecto a la actividad enzimática de los miembros de esta familia, sólo existen datos de algunos de ellos. Las dos proteínas de *S. cerevisiae* han sido caracterizadas como β -glucanasas con alta especificidad para enlaces $\beta(1,3)$ -glicosídicos y con un modo de acción endohidrolítico (Baladrón *et al.*, 2002). Análisis más detallados han sido realizados con Eng1 de *A. fumigatus*, que es también una $\beta(1,3)$ -endoglucanasa que hidroliza preferentemente las cadenas de glucano entre la tercera y cuarta glucosa del extremo no reductor de la cadena de $\beta(1,3)$ -glucano, liberando trisomas como producto fundamental de la hidrólisis (Fontaine *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito que las proteínas ScEng2, Speng1 y Speng2 poseen una actividad enzimática y un mecanismo similar a la proteína Eng1, lo que podría indicar que todas las proteínas de esta familia comparten un mecanismo catalítico (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b). También se ha descrito que las proteínas

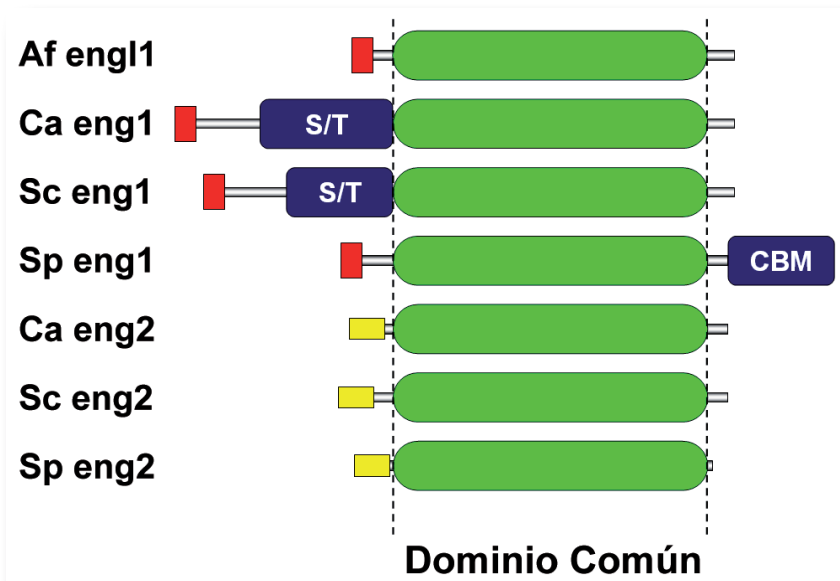


Figura 30.- Características estructurales de las proteínas de la familia GH81 de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans* y *A. fumigatus*. En verde se muestra el dominio común a las proteínas GH81. Las regiones rojas hacen referencia a la secuencia señal presente en aquellas proteínas que son secretadas, mientras que en azul se señalan regiones ricas en Ser/Thr, alguna de las cuales ha sido identificada como un Dominio de Unión a Carbohidratos o CBM (*Carbohydrate Binding Module*). Los cuadrados amarillos representan regiones ricas en Pro, con una posible función en interacciones proteína-proteína.

de plantas no sólo actúan como GBPs (Proteínas de Unión a Glucanos), sino que también poseen actividad endoglucanasa, por lo que actuarían degradando la pared del patógeno y uniendo las moléculas resultantes para activar la defensa de la planta (Fliegmann *et al.*, 2004).

Poco a poco se van conociendo datos sobre la función biológica de estas proteínas, especialmente en levaduras. Así, las proteínas Eng1 de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *C. albicans* desempeñan un papel en las últimas etapas del ciclo de vida de estos organismos. En los tres casos, Eng1 participa en el proceso de separación celular, ya que la delección del gen hace que las células permanezcan unidas. *S. cerevisiae* forma un septo entre la célula madre e hija constituido por tres capas: una capa interna compuesta principalmente de quitina (septo primario), y otras dos que la rodean (septo secundario) cuya composición es similar a la de la pared celular. La degradación del septo primario es llevada a cabo por la quitinasa Cts1 (Kuranda y Robbins, 1991), pero también deben ser hidrolizados los glucanos para completar la separación celular, y se ha propuesto que esta sería la función de ScEng1 (Baladrón *et al.*, 2002). Es interesante que tanto ScEng1 como Cts1 se localizan de forma asimétrica en el septo, del lado de la célula hija (Baladrón *et al.*, 2002; Colman-Lerner *et al.*, 2001). La proteína CaEng1 desempeña un papel similar en *C. albicans* y además complementa parcialmente el defecto de separación del mutante *eng1Δ* de *S. cerevisiae*, sugiriendo una función relacionada entre las glucanasas de estos organismos (Esteban *et al.*, 2005). En *S. pombe*, *eng1* también está implicada en la separación celular. Sin embargo, en esta levadura desempeña un papel más relevante al ser la encargada de hidrolizar el septo primario, que en la levadura de fisión se compone mayoritariamente de $\beta(1,3)$ -glucano lineal, en lugar de quitina (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). En *A. fumigatus*, la delección de *ENGL1* no presenta un fenotipo distinto al de las cepas parentales (Mouyna *et al.*, 2002). Es interesante destacar que aunque la delección de *ENG2* en *S.*

cerevisiae no presenta ningún fenotipo aparente, esta proteína fue aislada como un factor necesario para el ensamblaje de actina *in vitro*, por lo que se denominó Acf2 (“*Assembly Complementing Factor*”), aunque no existen más datos sobre su posible función en relación con el citoesqueleto de actina (Lechler y Li, 1997).

También existen datos sobre la regulación de la expresión de *ENG1* de *S. cerevisiae*, ya que su transcripción está regulada durante el ciclo celular, restringiéndose a la transición M/G1, lo que además explica por qué su localización es asimétrica. *ENG1* pertenece a un grupo de genes, junto con *CTS1*, que se expresan al final de mitosis y su transcripción depende del factor de transcripción Ace2 (Baladrón *et al.*, 2002; Colman-Lerner *et al.*, 2001; Doolin *et al.*, 2001). Ace2 se encuentra en el citoplasma de la célula y al final de mitosis se acumula específicamente en el núcleo de la hija gracias a la acción de las proteínas Cbk1-Mob2 y de una serie de proteínas conocidas como RAM (Nelson *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2002). Una vez que entra en el núcleo, activa la expresión de genes que se expresan específicamente en la célula hija (incluyendo *CTS1* y *ENG1*) y que son conocidos como genes específicos de la célula hija (Baladrón *et al.*, 2002; Colman-Lerner *et al.*, 2001). Los productos de varios de estos genes están implicados en separación celular.

5.2 Familia 81 de las glicosil hidrolasas en *S. pombe*. *eng1* y *eng2*

Al igual que en *S. cerevisiae*, en *S. pombe*, *eng1* y *eng2* son dos $\beta(1,3)$ -endoglucanasas que hidrolizan preferentemente cadenas de glucano entre la tercera y cuarta glucosa del extremo no reductor de la cadena de $\beta(1,3)$ -glucano, liberando triosas como producto fundamental de la hidrólisis (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b).

Aunque ambas proteínas presentan un mecanismo de acción similar en lo que a su actividad glucanasa se refiere, su función celular difiere completamente. La expresión del gen *eng1*⁺ está regulada a largo del ciclo vegetativo

por los factores de transcripción *sep1* y *ace2* (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Bahler, 2005; Petit *et al.*, 2005; Ribar *et al.*, 1999); además, otra serie de factores como las septinas, *mid2*, *rho4* o el complejo del exocisto son esenciales para su correcta localización y funcionamiento (Martín-Cuadrado *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Tasto *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002). La proteína *eng1* presenta en su estructura tres dominios bien definidos (Fig. 30):

- a) En su extremo N-terminal contiene una secuencia señal responsable de la entrada de la proteína en la ruta de secreción (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005).
- b) La región central de la proteína constituye el dominio común de la familia GH81, donde se localiza el dominio catalítico de la proteína responsable de su actividad glucanasa (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b).
- c) El extremo C-terminal presenta una región rica en serinas y treoninas, además de tres bloques de aminoácidos con varias cisteínas y tirosinas conservadas. Esta región ha sido identificada recientemente como un dominio de unión a carbohidratos o CBM, esencial para la localización de la proteína en la región del septo (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008a).

La función celular de *eng1* en *S. pombe*, al

igual que en *S. cerevisiae* y *C. albicans* está relacionada con la separación celular, que en *S. pombe* se lleva a cabo mediante la acción coordinada de las proteínas *agn1* y *eng1* (Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Mientras la α -glucanasa *agn1* dirige la disolución del cilindro de pared que rodea el septo de división, la β -glucanasa *eng1* es responsable de la hidrólisis del $\beta(1,3)$ -glucano lineal presente en el septo primario (Humbel *et al.*, 2001).

eng2⁺ se expresa tanto durante el ciclo vegetativo como el ciclo sexual. Su regulación durante el ciclo vegetativo es desconocida, mientras que durante el ciclo sexual su expresión está controlada por el factor de transcripción *mei4* (Mata *et al.*, 2007). La proteína *eng2* presenta dos regiones identificables en su estructura (Fig. 30):

- a) En el extremo N-terminal contiene una región rica en prolinas que se ajusta perfectamente a los motivos que han sido descritos como regiones de interacción con dominios SH3. Esta región está conservada en *S. cerevisiae* (Lechler y Li, 1997).
- b) El resto de la proteína está formada por el dominio común de las proteínas de la familia GH81.

Su función celular es completamente desconocida, ya que el mutante *eng2 Δ* no presenta defectos en separación celular.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido la caracterización funcional de la $\beta(1,3)$ -endoglucanasa eng2, perteneciente a la familia 81 de las glicosil hidrolasas, en el organismo modelo *S. pombe*. Para llevar a cabo este objetivo se planteó:

1. Identificar la función biológica y molecular de la proteína eng2 y los dominios responsables de esta función mediante el estudio de mutantes nulos y versiones truncadas de la proteína.
2. Analizar el perfil de expresión y localización de la proteína eng2 a lo largo del ciclo de vida de *S. pombe* e intentar correlacionarlos con su función biológica.
3. Determinar si la capacidad para hidrolizar enlaces $\beta(1,3)$ *in vitro* es esencial para alguno de los procesos biológicos en los que interviene la proteína.

Resultados

En esta sección de la Memoria se expondrá el trabajo experimental y los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral. La presentación del apartado se ha dividido en dos capítulos diferentes, aunque ambos están englobados dentro del objetivo global del trabajo, que es *la caracterización funcional de la $\beta(1,3)$ -endoglucanasa eng2 en la levadura de fisión S. pombe*.

El primer capítulo contiene trabajo inédito, en el que se describe el papel de eng2 en la organización del citoesqueleto de actina, el crecimiento polarizado y la endocitosis en *S. pombe* durante el crecimiento vegetativo. El segundo consta de un artículo publicado en *Eukaryotic Cell*, centrado en su función como $\beta(1,3)$ -endoglucanasa durante la dehiscencia del asca. Al comienzo de este capítulo se ha añadido un pequeño resumen en castellano en el que se explican los antecedentes y objetivos del trabajo, así como un resumen de los principales resultados obtenidos.

Los capítulos incluidos en la presente Memoria son:

CAPÍTULO I: eng2 participa en la organización del citoesqueleto de actina, el crecimiento polarizado y la endocitosis en *S. pombe*.

CAPÍTULO II: La β -glucanasa eng2 es necesaria después de esporulación para la lisis de la pared del asca en la levadura de fisión *S. pombe*.

Encinar del Dedo, J., E. Dueñas, Y. Arnáiz, F. del Rey, y C.R. Vázquez de Aldana. 2009. β -glucanase eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 8:1278-86.

CAPÍTULO I: eng2 participa en la organización del citoesqueleto de actina, el crecimiento polarizado y la endocitosis en *S. pombe*

1. Introducción y antecedentes

Como ya se ha comentado en la Introducción, *S. pombe* contiene en su genoma dos genes que codifican para endoglucanasas de la familia GH81, denominados *eng1⁺* y *eng2⁺*. La proteína *eng1* ha sido ampliamente estudiada y caracterizada durante los últimos años en nuestro grupo de investigación, habiéndose demostrado que es la enzima responsable de la disolución controlada del septo primario tras la citoquinesis, permitiendo la separación de las dos células hermanas generadas en la mitosis (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). La expresión del gen está regulada por el factor de transcripción *ace2*, que induce la transcripción de un conjunto de genes en la transición M/G1, algunos de los cuales son

necesarios para una correcta separación celular, como *eng1* y la α -glucanasa *agn1* (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Rustici *et al.*, 2004). Sin embargo, la función del segundo miembro de esta familia en *S. cerevisiae* y *S. pombe* seguía siendo completamente desconocida al inicio de este estudio, por lo que el objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar qué función desempeñan las proteínas *eng2* en la célula, para lo que se eligió como modelo de estudio la levadura de fisión.

A diferencia de *eng1⁺*, el gen *eng2⁺* se expresa de forma constante a lo largo del ciclo celular de *S. pombe*, no mostrando variaciones periódicas significativas que indiquen una posible función en un momento concreto del ciclo (Fig. 31A).

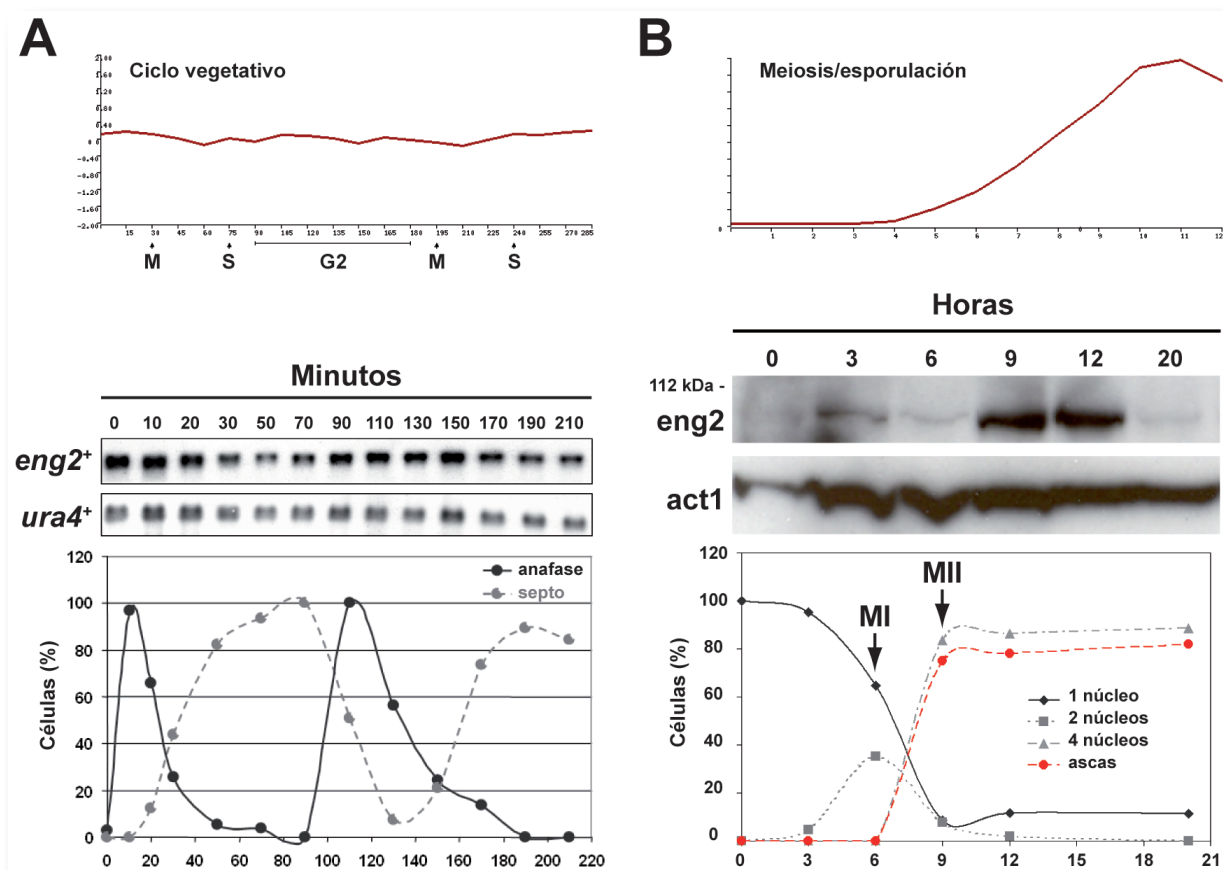


Figura 31.- Patrón de expresión de *eng2⁺* durante el ciclo de vida de *S. pombe*. **A.** Expresión durante el crecimiento vegetativo. En el panel superior se muestra el perfil de expresión publicado en las bases de datos (GeneDB), mientras que en el panel inferior se muestra la expresión a lo largo del ciclo celular en células sincronizadas. La sincronía se indujo mediante arresto y liberación del mutante *cdc25-22*. Se tomaron muestras en los puntos indicados para la extracción de RNA y se realizó un ensayo de tipo Northern con sondas específicas para los genes *ura4⁺* y *eng2⁺*. El gráfico representa el índice de anafase (●) o septación (◐) en cada uno de los puntos. **B.** Expresión durante el ciclo sexual. En el panel superior se muestra el perfil de expresión publicado en las bases de datos (GeneDB) mientras que en el panel inferior se muestra la abundancia de la proteína *eng2*. Se tomaron muestras de la cepa diploide *eng2-GFP* (OL961) durante esporulación en cada uno de los puntos indicados para la extracción de proteínas, y se realizó un ensayo de tipo Western con anticuerpos específicos contra la proteína fluorescente verde (GFP). La progresión durante el ciclo sexual se siguió mediante microscopía y tinción con DAPI. En la gráfica se muestra el porcentaje de células mono-nucleadas (◆), bi-nucleadas (◼), tetra-nucleadas (▲) y ascas (●) en cada uno de los puntos. MI = Meiosis I, MII = Meiosis II.

La regulación de su expresión durante el ciclo vegetativo es desconocida, pero se ha descrito que durante el ciclo sexual está controlada por el factor de transcripción *mei4* (Mata *et al.*, 2007). Durante la diferenciación sexual, la expresión de *eng2*⁺ presenta un significativo aumento en torno a las 10 horas después de que las células hayan sido sometidas a la ausencia de una fuente de nitrógeno (Fig. 31B). El hecho de que *eng2*⁺ esté presente durante el crecimiento vegetativo y se induzca durante la esporulación sugiere que esta proteína podría desempeñar su función en las distintas etapas del ciclo de vida de *S. pombe*.

El único dato que existía sobre la proteína *eng2* en *S. pombe* era que no es necesaria durante el proceso de separación celular, ya que las células del mutante *eng2Δ* son capaces de separarse de forma similar a la cepa silvestre (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Tampoco era muy abundante la información existente sobre el gen *ENG2* de *S. cerevisiae*, aunque existía un único artículo que relacionaba a Eng2 con la reorganización del citoesqueleto de actina *in vitro* en *S. cerevisiae* (Lechler y Li, 1997). En este trabajo, los autores demostraron que el tratamiento de células permeabilizadas con urea 2M o KCl 0,6 M produce la desorganización de los parches de actina, especialmente en la región de la yema. Utilizando este sistema *in vitro*, observaron que la adición de un extracto proteico de una cepa silvestre era capaz de revertir este defecto, permitiendo la repolimerización de los parches. Mediante diferentes pasos cromatográficos consiguieron aislar dos fracciones, denominadas ACF1 y ACF2 (por “*Assembly Complementing Factor*”), capaces de restaurar el ensamblaje de actina *in vitro*. Este ensamblaje se producía con una mayor eficiencia cuando en primer lugar se añadía la fracción ACF1 y posteriormente la fracción ACF2, lo que indicaba que ambas fracciones actuaban de forma secuencial. El componente activo de la fracción ACF1 fue identificado como la proteína Las17/Bee1, mientras que el de la fracción ACF2 era Eng2 (Lechler y Li, 1997). Por tanto, según estos resultados, tanto Las17/Bee1 (una proteína de la familia WASP que es responsable de la activación del complejo Arp2/3) (Winter *et al.*, 1999a) como

Eng2 (que posee actividad endoglucanasa cuando se purifica, Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b) funcionarían de forma coordinada y secuencial en el ensayo *in vitro* de polimerización de actina.

En *S. cerevisiae*, la proteína Eng2 está formada por 799 aminoácidos y tiene un tamaño molecular estimado de 88 kDa. En el artículo de Lechler y Li, proponen que en su extremo N-terminal existe una región rica en prolinas que presenta dos posibles motivos de unión a dominios SH3 (las secuencias PxxPxR y RxxPxxP) (Mayer, 2001; Tong *et al.*, 2002; Tonikian *et al.*, 2009), mientras que en su extremo C-terminal podrían existir dos posibles dominios PH de interacción con fosfolípidos (Fig. 32A) (Lechler y Li, 1997). Adicionalmente, estudios de nuestro grupo de trabajo han identificado el dominio catalítico responsable de la actividad glucanasa en el extremo C-terminal (aminoácidos 375 a 799) (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b), por lo que solaparía con los posibles dominios PH. El mutante *ENG2* no presenta retraso en el crecimiento, ni exhibe ningún defecto aparente en la organización de la actina y la morfología celular. Esta ausencia de defectos podría deberse a que su función sea redundante con la de otras proteínas presentes en la célula (Lechler y Li, 1997).

2. Análisis de la estructura y secuencia de *eng2* en *S. pombe*

eng2 es una β(1,3)-endoglucanasa de la familia 81 de las glicosil hidrolasas, que hidroliza cadenas de glucano con uniones β(1,3) (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b). Como todas las proteínas de esta familia, presenta un dominio común de unos 650 aminoácidos, en el que está incluido el dominio catalítico de la proteína, responsable de su actividad glucanasa. El análisis detallado de su secuencia aminoacídica permitió identificar una región rica en prolinas en su extremo amino, similar a la observada en su homólogo en *S. cerevisiae*. Esta observación llevó a plantear la posibilidad de que los motivos de unión a dominios SH3 presentes en Eng2 de *S. cerevisiae* estuvieran conservados en su homólogo en *S. pombe*. Para tratar de identificar estos motivos, se alineó el

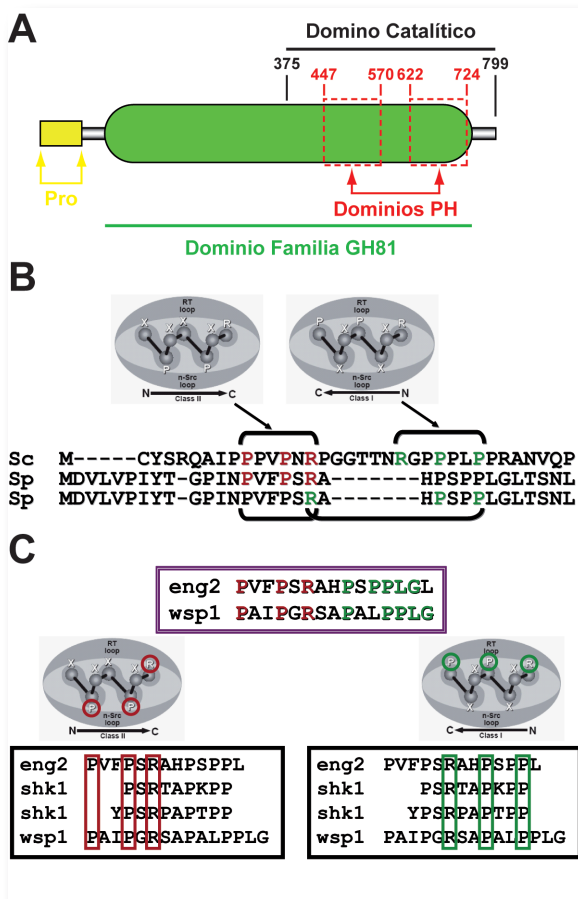


Figura 32.- Características de la proteína Eng2. **A.** Representación esquemática de la proteína Eng2 de *S. cerevisiae*. Se muestra la localización de la región rica en prolinas presente en el extremo amino (en amarillo), el dominio catalítico necesario para la actividad endoglucanasa (en negro) y los posibles dominios PH (recuadros rojos). En verde se muestra la región común a todas las proteínas de la familia 81 de las glicosil hidrolasas. **B.** Estructura general de los dos motivos (Clase I = RxxPxxP y Clase II = xPxxPxR) necesarios para la interacción con los dominios SH3 (Mayer, 2001). Eng2 de *S. cerevisiae* (Sc) contiene un motivo de cada clase en el extremo amino, que están parcialmente conservados en la proteína eng2 de *S. pombe* (Sp), ya que una de las Arg formaría parte de los dos motivos. En rojo se muestra el motivo de Clase II, mientras que en verde el de Clase I. **C.** La comparación del extremo N-terminal de eng2 de *S. pombe* mediante BLASTp permitió comprobar que estos motivos están presentes (total o parcialmente) en otras proteínas relacionadas con la polaridad y el crecimiento polarizado. En el cuadro superior se muestra un detalle del alineamiento entre eng2 y wsp1 de *S. pombe*.

extremo N-terminal de ambas proteínas con el programa MegAlign del paquete bioinformático DNASTAR. El alineamiento mostró que ambos motivos estaban conservados en la proteína eng2 de *S. pombe* (Fig. 32B), aunque de forma parcial, ya que una de las Arg formaría parte de los dos motivos. Este resultado sugiere que eng2 podría interactuar con proteínas que contengan dominios SH3 a través de esta región rica en

prolinas. Para tratar de identificar otras proteínas con motivos similares, se realizó una búsqueda en las bases de datos (BLASTp) utilizando como "señuelo" la secuencia PVFPSRAHPSPLGL del extremo amino de eng2. Varias proteínas relacionadas con la actina y el crecimiento polarizado presentaban motivos similares. El resultado más interesante fue el observado para la proteína wsp1 (homóloga a Las17/Bee1 de *S. cerevisiae*), ya que esta proteína mostraba una región en la que todas las prolinas y argininas estaban conservadas, además de una leucina y una glicina (Fig. 32C), lo que podría indicar que tanto eng2 como wsp1 tienen la capacidad de interactuar con los mismos dominios SH3 de otras proteínas y tal vez formar un complejo que podría regular el citoesqueleto de actina y el crecimiento polarizado en *S. pombe*.

3. eng2 participa en la transición del crecimiento monopolar a bipolar

Para estudiar si la proteína eng2 ejerce algún papel en el crecimiento polarizado y la organización del citoesqueleto de actina en *S. pombe*, se construyó la cepa mutante *eng2Δ*. En ella, la región codificante completa fue reemplazada por la secuencia del gen *ura+* o el marcador de selección kanMX4 (que confiere resistencia al antibiótico G418) (Bahler *et al.*, 1998b). Todas las cepas generadas durante este trabajo fueron confirmadas por PCR y secuenciación. No se observó defecto alguno en el crecimiento con respecto a una cepa silvestre en medio rico (YES sólido) a temperaturas entre 25 y 37°C. Sin embargo, se comprobó que la cepa *eng2Δ* presentaba un retraso en el crecimiento en medio mínimo sólido a todas las temperaturas ensayadas, siendo más aparente a 25 y 37°C (Fig. 33A). Por esta razón, el medio mínimo fue el medio elegido para estudiar los posibles fenotipos del mutante *eng2Δ*.

Como ya se ha comentado en la Introducción, las células de *S. pombe* crecen de forma polarizada siguiendo un patrón de crecimiento acorde con el ciclo celular. Dos de las aproximaciones más utilizadas para estudiar el crecimiento en *S. pombe*

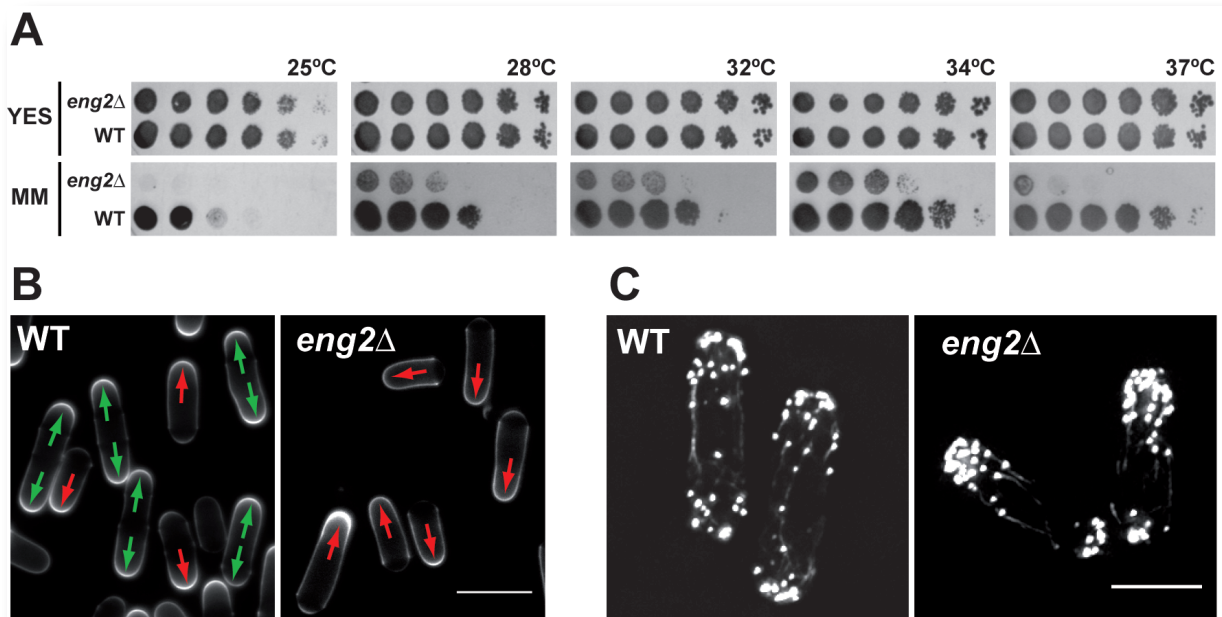


Figura 33.- Crecimiento y organización del citoesqueleto de actina en el mutante *eng2Δ* en *S. pombe*. **A.** Ensayos de crecimiento en medio sólido (YES y medio mínimo) a distintas temperaturas. Se prepararon diluciones seriadas de la cepa silvestre (WT) y del mutante *eng2Δ* en ambos medios y las placas se incubaron a diversas temperaturas entre 25 y 37°C durante 5-7 días. **B.** Cultivos asincrónicos de las cepas silvestre (WT) y mutante *eng2Δ* se tiñeron con calcoflúor para identificar las zonas de crecimiento activo. Las flechas indican la dirección y tipo de crecimiento (verdes = crecimiento bipolar; rojas = crecimiento monopolar). Barra de escala, 10 μ m. **C.** Tinción del citoesqueleto de actina con faloidina conjugada con el fluorocromo Alexa-Fluor488 en células asincrónicas de ambas estirpes. Barra de escala, 5 μ m.

son la tinción con calcoflúor (tiñe las regiones donde se está produciendo un crecimiento activo) y la tinción de actina, usando faloidina conjugada con el fluorocromo Alexa-Fluor488. En una cepa silvestre creciendo de forma asincrónica, entre un 50-60% de sus células crecen por ambos polos, un 20-30% crecen de forma monopolar, mientras que el 10-20% restante se encuentra en citocinesis. Cuando un cultivo del mutante *eng2Δ* se tiñó con calcoflúor, se comprobó que existía un elevado número de células que se teñían en un único polo, indicando que presentaban un patrón de crecimiento monopolar (Fig. 33B). Para cuantificar este defecto, se determinaron los porcentajes de células monopolares y bipolares en un cultivo asincrónico, observándose que estaban alterados con respecto a la cepa silvestre, ya que las células monopolares eran mayoritarias (entre el 50 y 60%), y tan sólo un 20-30% de células crecían de forma bipolar (el porcentaje de células en división era el mismo que el de la cepa silvestre). Para confirmar esta observación, se realizó una tinción del citoesqueleto de actina, se realizó una tinción del citoesqueleto de actina, ya que los parches de actina marcan de forma

precisa las regiones de crecimiento (Fig. 33C). Al igual que con la tinción con calcoflúor, la cepa silvestre mostraba un mayor porcentaje de células con crecimiento bipolar (50-60%), en las que los parches de actina estaban distribuidos en ambos polos, mientras que tan sólo un 20-30% presentaban una distribución asimétrica de la actina, siendo mayoritaria en uno de sus polos (crecimiento monopolar). En el resto de células se pudieron observar anillos de actomiosina, indicando que las células estaban llevando a cabo la citocinesis. En el mutante *eng2Δ*, el porcentaje de células que presentaban una distribución asimétrica de los parches de actina era de entre un 50-60%, mientras que sólo un 20-30% presentaban una distribución bipolar de los parches. De nuevo, el número de células que presentaban anillos de actomiosina era similar al de la cepa silvestre. Estos resultados indican, por tanto, que *eng2* podría desempeñar alguna función durante la transición de crecimiento monopolar a bipolar (NETO) en *S. pombe*.

Para confirmar este fenotipo y comprobar si existía algún defecto en NETO, se analizó

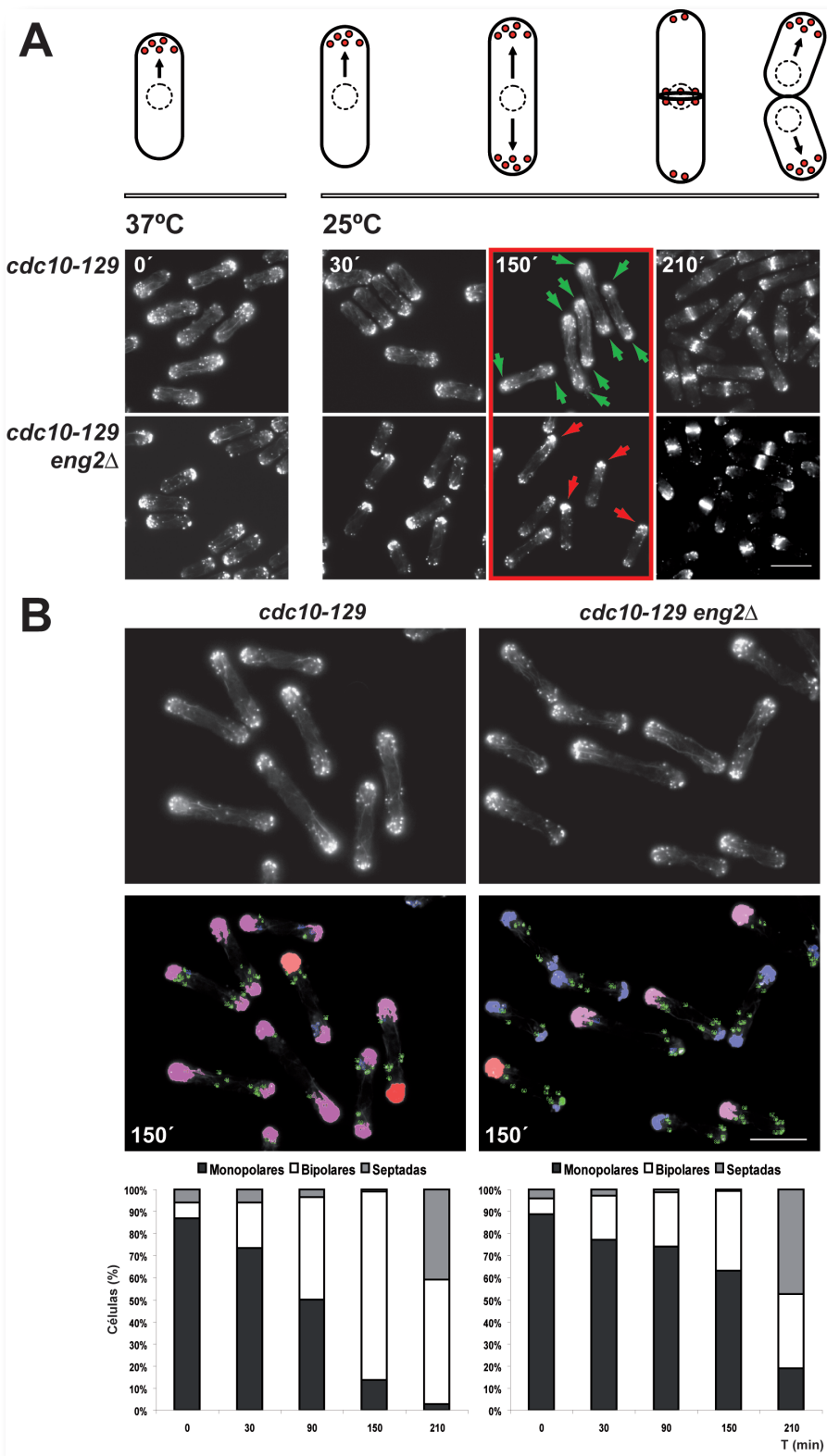


Figura 34.- El mutante *eng2Δ* crece de forma monopolar y es incapaz de llevar a cabo el NETO. A. En el panel superior se muestra un esquema del proceso de arresto-liberación del mutante *cdc10-129*. La incubación a 37°C produce un bloqueo de las células en la fase G1 (crecimiento monopolar). La liberación posterior a 25°C permite la progresión del ciclo de forma sincrónica. Las cepas *cdc10-129* y *cdc10-129 eng2Δ* se bloquearon y liberaron, tomando muestras a distintos tiempos tras la liberación para su tinción con faloidina-Alexa-Fluor488 y análisis en el microscopio de fluorescencia. Las flechas verdes apuntan a polos celulares con similar concentración de actina, mientras que las flechas rojas indican células monopolares. Barra de escala, 10 μm. **B.** Análisis de la distribución de actina en células *cdc10-129* y *cdc10-129 eng2Δ* a los 150 minutos de la liberación con el programa ImageJ. En el panel superior se muestran imágenes tomadas a los 150 minutos de cada una de las cepas. El panel central muestra el resultado tras el análisis con el programa ImageJ. El gradiente de intensidades medidas en código de colores fue rojo-rosa-azul-verde. Barra de escala, 10 μm. La gráfica muestra el recuento de células monopolares (■), bipolares (□) y septadas (▒) a lo largo del ensayo.

el crecimiento y la transición de crecimiento monopolar a bipolar en un cultivo sincrónico. El mutante elegido para este experimento fue una cepa *cdc10-129*, que a 37°C detiene su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular y todas las células quedan bloqueadas con un patrón de

crecimiento monopolar. Cuando las células se liberan a temperatura permisiva, 25°C, se produce una salida de G1 y un crecimiento de manera sincrónica, por lo que la mayoría de las células realizan NETO al mismo tiempo (Fig. 34A). Para construir la cepa *cdc10-129 eng2Δ*, se utilizaron

los mismos cassettes que para construir el mutante simple. Las cepas *cdc10-129* y *cdc10-129 eng2Δ* se sincronizaron mediante incubación a 37°C durante 4 horas y posteriormente los cultivos se incubaron a 25°C. A los 30 minutos de haber sido transferidas a temperatura permisiva, algunas células de la cepa *cdc10-129* comenzaron a crecer de forma bipolar con los parches de actina distribuidos en ambos polos y el porcentaje de células bipolares fue aumentando hasta alcanzar un máximo a los 150 minutos de la liberación (Fig. 34A). Esta transición al crecimiento bipolar no fue observada en la cepa *cdc10-129 eng2Δ*, ya que tras 150 minutos de incubación a temperatura permisiva aún presentaba un elevado porcentaje de células en las que los parches de actina estaban localizados de forma mayoritaria en uno de sus polos, indicando que seguían creciendo monopolarmente. A los 210 minutos, ya se observaban anillos de actomiosina en un porcentaje similar en ambas cepas, lo que indicaba que el defecto observado en la cepa *cdc10-129 eng2Δ* no es un retraso en la progresión del ciclo celular sino un defecto específico en NETO (Fig. 34A).

Para corroborar que esta distribución asimétrica de la actina era real, se analizaron las imágenes tomadas a los 150 minutos de la liberación con el programa ImageJ, midiendo la intensidad de fluorescencia en ambos polos. Los resultados del análisis confirmaron que mientras que en la cepa *cdc10-129* la intensidad de fluorescencia era similar en ambos polos, en el mutante *cdc10-129 eng2Δ* la actina se concentraba mayoritariamente en uno de ellos. Al mismo tiempo, este análisis se utilizó para cuantificar el número de células monopolares y bipolares en ambas cepas (Fig. 34B). El recuento de estos datos mostró que a los 150 minutos de la liberación entre un 80-90% de las células de la cepa *cdc10-129* presentaban los parches de actina distribuidos en los dos polos y con una intensidad similar en ambos; sin embargo, en la cepa *cdc10-129 eng2Δ* tan sólo un 35% de las células mostraban una intensidad similar de los parches en ambos polos. Estos resultados indican que la proteína *eng2* es necesaria para la

activación del crecimiento en el polo nuevo en un elevado porcentaje de las células. Sin embargo, este defecto en NETO no afecta a la progresión del ciclo celular, ya que la formación del septo en el mutante *eng2Δ* ocurre al mismo tiempo que en la cepa control (210 minutos) y con una eficiencia similar (41% de la cepa silvestre frente a 47% del mutante *eng2Δ*). Otra conclusión de este experimento es que las células monopolares del mutante *eng2Δ* son capaces de formar un anillo de actomiosina y realizar citoquinesis sin necesidad de pasar por la fase de crecimiento bipolar. Para confirmar este punto, las células correspondientes a la muestra de los 210 minutos se tiñeron con calcoflúor, comprobándose que en la cepa *cdc10-129* la mayoría de las células que presentaban septos habían crecido previamente por ambos polos (> 80%) mientras que en la cepa *cdc10-129 eng2Δ* más del 65% de las células que tenían septo habían crecido únicamente por uno de sus polos (Fig.35).

Una tercera aproximación utilizada para analizar los defectos del mutante *eng2Δ* fue el estudio *in vivo* e *in situ* del patrón de crecimiento en la cepa silvestre y en el mutante. Para ello, se prepararon una serie de portaobjetos especiales, en los que se creaba una fina capa de medio mínimo sólido para evitar que las muestras se secan durante el experimento y sobre ella se colocaban las células a analizar. Una vez en el microscopio, se tomaron fotos cada 5 minutos durante unas 5-6 horas para estudiar el patrón de crecimiento de las células durante una generación completa. Una vez obtenidas las imágenes, se elegían células con septo o que acababan de separarse para estudiar su crecimiento hasta que formaban un nuevo septo. Como es normal, en la cepa silvestre la mayoría de las células analizadas (> 85%) se alargaban inicialmente por uno de sus polos y posteriormente crecían por ambos (Fig. 36A, Video_4). Tan solo en un 14% de las células analizadas se observó que una de las dos células hijas era incapaz de activar el crecimiento en el polo nuevo. Por el contrario, los resultados obtenidos para el mutante *eng2Δ* fueron más heterogéneos, pudiendo clasificar las

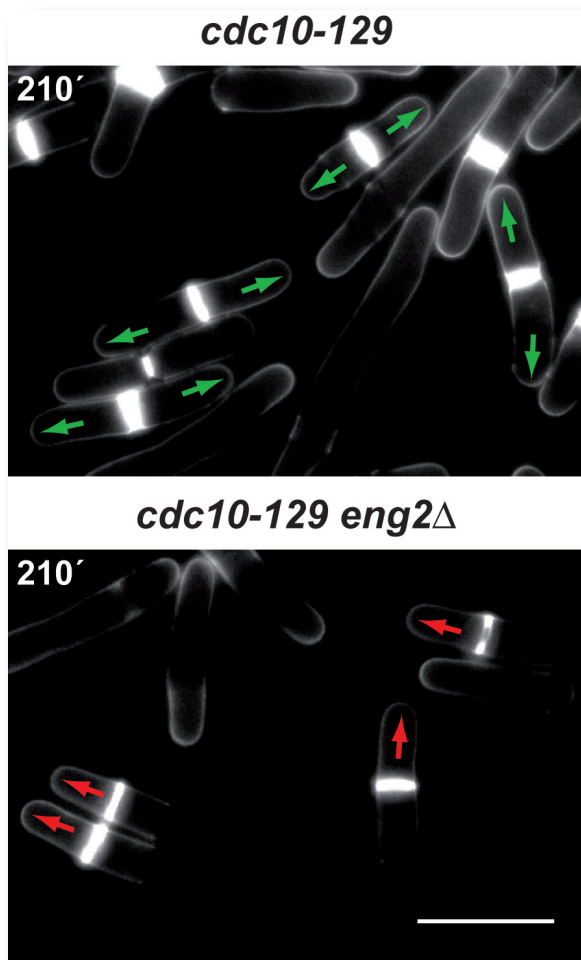


Figura 35.- Las células monopolares del mutante *eng2Δ* son capaces de realizar citoquinesis. Muestras de los cultivos sincrónicos *cdc10-129* y *cdc10-129 eng2Δ* correspondientes a los 210 minutos después de la liberación del experimento mostrado en la Figura 34 se tiñeron con calcoflúor para marcar el septo y los polos de crecimiento. Las flechas verdes indican células bipolares que han formado septo, mientras que las flechas rojas señalan células monopolares que han septado. Barra de escala, 10 μ m.

células en 4 grupos en función de su patrón de crecimiento (Fig. 36A). Un pequeño porcentaje de células (6,25%) creció de forma similar al silvestre, es decir, inicialmente por el polo viejo y posteriormente por ambos. En un segundo grupo de células (18,75%), el patrón de crecimiento sólo estaba alterado en una de las células hijas que no llevaba a cabo el NETO, mientras la otra era silvestre. El tercer grupo (6,25%) eran aquellas células que crecían de forma similar a los mutantes *tea1Δ* o *tea4Δ*, en los que una de las células hijas crecía por el polo viejo y la otra lo hacía por el polo nuevo. Sin embargo, el patrón más característico que presentaban las células del mutante *eng2Δ* (68,75%) fue aquel en el que las dos células

hijas crecían únicamente por el polo viejo, siendo incapaces de llevar a cabo el NETO (Fig. 36A, Video_5). Para estudiar en mayor detalle el defecto del mutante *eng2Δ*, se midió la distancia crecida por cada uno de los polos, utilizando como referencia la cicatriz de septación. Los resultados obtenidos mostraron que en la cepa silvestre las dos células hijas crecían por ambos polos, aunque siempre se observaba un mayor alargamiento por el polo viejo que por el nuevo (Fig. 36B). Por el contrario, en las dos células hijas del mutante *eng2Δ* el crecimiento se producía únicamente por el polo viejo. Este análisis permitió al mismo tiempo calcular el crecimiento total de las células silvestres y mutantes. Por término medio, las células de la cepa *eng2Δ* presentaban un crecimiento total ligeramente inferior al de las células silvestres ($5,04 \pm 0,85 \mu$ m frente a los $5,92 \pm 1,52 \mu$ m de la cepa silvestre).

En base a todos estos resultados, se puede afirmar que el mutante *eng2Δ* presenta un defecto en el crecimiento polarizado, ya que la mayoría de sus células crecen de forma monopolar por el polo viejo, siendo incapaces de llevar a cabo la transición al crecimiento bipolar o NETO.

El hecho de que la delección de *eng2+* afectase al patrón de crecimiento hizo que se planteara la posibilidad de que la sobre-expresión del mismo también provocara algún defecto en el crecimiento. Para este estudio, se colocó el gen *eng2+* bajo el control de un promotor reprimible por tiamina (*nmt1+*) y se integró en el genoma en su propio locus (Bahler *et al.*, 1998b). De las tres versiones existentes del promotor *nmt1+* (3x, 41x y 81x), se utilizó la 3x, ya que es la que produce unos mayores niveles de expresión. En condiciones de represión, la cepa mostraba un fenotipo similar al de la cepa silvestre. Cuando se indujo la expresión en medio mínimo en ausencia de tiamina durante 20-24 horas, las células adquirieron un tamaño mayor al de las células silvestres (Fig. 37A). Así, mientras que las células silvestres tenían una longitud de $13,27 \pm 1,62 \mu$ m ($n = 40$ células), el promedio de las células que sobreexpresaban *eng2+* era de $16,12 \pm 1,94 \mu$ m ($n = 73$ células). Por el contrario, el tamaño de las

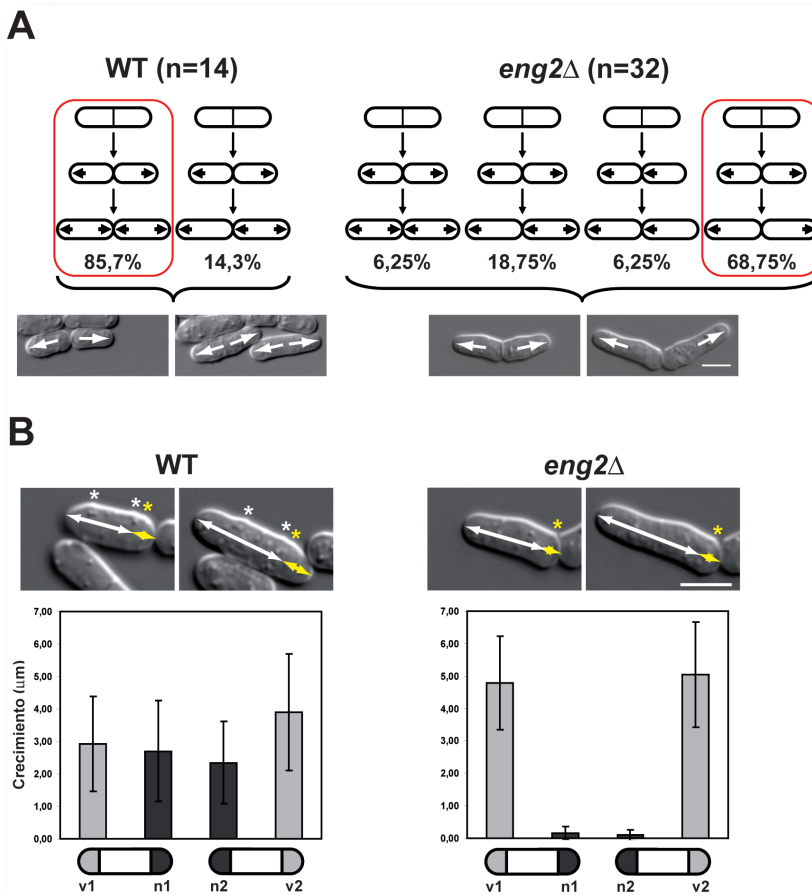


Figura 36.- El mutante *eng2Δ* crece de forma mayoritaria por el polo viejo. **A.** El panel superior muestra un esquema de los distintos patrones de crecimiento de la cepa silvestre y del mutante *eng2Δ*, indicándose con un recuadro rojo el más habitual. El panel inferior muestra las imágenes del tiempo inicial y final de uno de los ensayos. Las flechas indican la dirección del crecimiento. Barra de escala, 5 μm. **B.** Crecimiento de cada polo de las células hijas. Se midió la distancia desde la cicatriz de septación a cada polo en el tiempo inicial y final del experimento para calcular el crecimiento de cada polo. En el panel superior se muestra un ejemplo del patrón de crecimiento más característico de cada cepa. Los asteriscos indican la posición de la cicatriz de septación (blanco = cicatrices antiguas; amarillo = cicatriz generada en el último ciclo), las flechas indican la distancia desde la última cicatriz generada hasta el polo viejo (blanco) o hasta el polo nuevo (amarillo). Barra de escala, 5 μm. El gráfico muestra la distancia promedio de crecimiento de cada polo (en μm) en la cepa silvestre (12 células) y el mutante *eng2Δ* (22 células), con la desviación estándar. v1 = polo viejo célula hija 1; n1 = polo nuevo célula hija 1; v2 = polo viejo célula hija 2; n2 = polo nuevo célula hija 2.

células carentes de *eng2+* era ligeramente inferior al de las células silvestres, con un promedio de $11,71 \pm 1,18 \mu\text{m}$ ($n = 40$ células) lo que concuerda perfectamente con los datos mostrados anteriormente que indicaban que el crecimiento total de las células del mutante era ligeramente inferior al de las células silvestres. La cepa que contenía el gen *eng2+* bajo el control del promotor *nmt1+* mostraba un tamaño similar al de la cepa silvestre, $13,49 \pm 1,01 \mu\text{m}$ ($n = 49$ células) cuando se crecía en condiciones de represión. Para tratar de ver si existía alguna relación entre este defecto y el citoesqueleto de actina, se realizó una tinción del mismo. El único defecto observado cuando se sobreexpresaba *eng2+* fue una ligera deslocalización de los parches de actina, que se distribuían de forma más homogénea en toda la célula en lugar de concentrarse en los polos como en una cepa silvestre (Fig. 37B). Este resultado confirma el hecho de que variaciones en el nivel de expresión de *eng2+* afectan al crecimiento polarizado, produciendo una deslocalización del citoesqueleto de actina.

4. *eng2* no afecta a la localización del polarisoma, pero sí a otras proteínas relacionadas con el crecimiento polarizado

Como se ha comentado en la Introducción, el crecimiento polarizado es un proceso muy complejo que implica la participación de numerosas proteínas. Como primera aproximación al estudio de la función de *eng2* durante el crecimiento vegetativo, se procedió al estudio de la localización de varias de las proteínas implicadas en NETO y el crecimiento polarizado para determinar en qué paso era necesaria la proteína *eng2*. Las proteínas seleccionadas fueron: *tea1*, proteína que forma un complejo con *tea4* y funciona como marcador de polaridad (Martin, 2009; Martin y Chang, 2005; Martin *et al.*, 2005); *pom1*, una quinasa relacionada con el crecimiento polarizado, la citoquinesis y el control de ciclo celular (Almeida y Tyers, 2009; Bahler y Nurse, 2001; Bahler y Pringle, 1998; Huang *et*

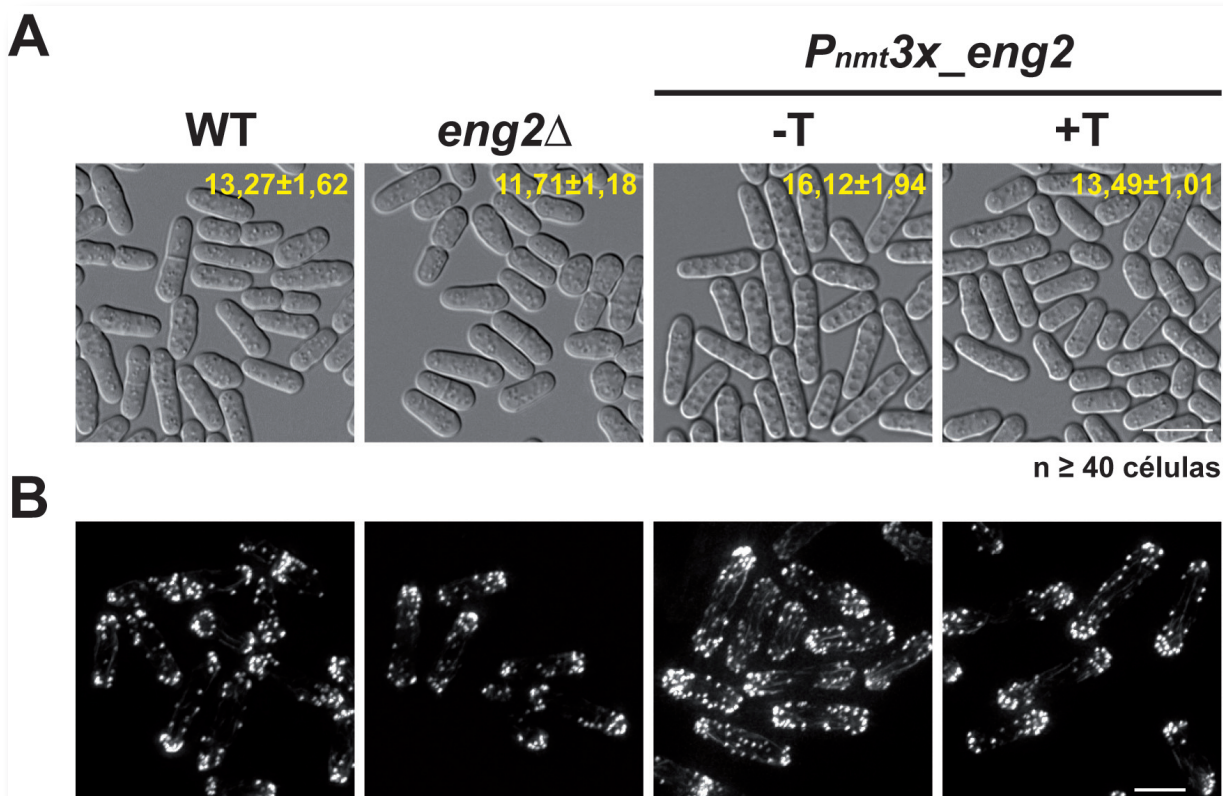


Figura 37.- Variaciones en el nivel de expresión de *eng2*⁺ afectan al crecimiento celular. **A.** Cultivos asincrónicos de las cepas silvestre (WT), *eng2*Δ y una cepa que contiene el gen *eng2*⁺ bajo el control de la versión fuerte del promotor *nmt1*⁺ (*P_{nmt3x_eng2}*) crecidos en presencia (+T) o ausencia (-T) de tiamina. Se midió la longitud del eje mayor en al menos 40 células de cada cepa. Barra de escala, 10 μm. **B.** Tinción de actina con faloidina-Alexa-Fluor488. Barra de escala, 5 μm.

al., 2007; La Carbona y Le Goff, 2006; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009; Sawin, 2009; Tatebe *et al.*, 2008); *for3*, la formina responsable de la formación de los cables de actina durante interfase (Feierbach y Chang, 2001; Martin y Chang, 2006; Martin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2007b); *wsp1*, proteína de la familia WASP y principal activador del complejo arp2/3 (Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2005); *arpC5*, una de las subunidades del complejo arp2/3 responsable de la nucleación de los parches de actina y que está implicado en la endocitosis (Lee *et al.*, 2000; Pollard, 2007; Robinson *et al.*, 2001; Sirotkin *et al.*, 2005); *myo52*, miosina de Clase V implicada en la secreción polarizada, la dinámica de los microtúbulos y la citoquinesis (Martín-García y Mulvihill, 2009; Mulvihill *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2001) y *bgs4*, una de las subunidades de la β-glucán sintasa esencial durante la citoquinesis y el crecimiento polarizado (Cortés *et al.*, 2005). La elección de estas proteínas se hizo en base a su importancia y a su actuación en las distintas

etapas del crecimiento polarizado.

Para analizar la localización de estas proteínas, se utilizaron versiones de las mismas etiquetadas con la proteína fluorescente verde (GFP), amarilla (YFP) o cian (CFP) tanto en la cepa silvestre como en el mutante *eng2*Δ. Esto permitió comparar el patrón de localización en ambas cepas. En la figura 38 se resume la localización de todas ellas, mostrando únicamente una imagen representativa del patrón general observado en cada cepa en células que deberían haber superado NETO. Las proteínas *tea1*, *pom1*, *for3* y *wsp1* no presentaban defectos aparentes en su localización en el mutante *eng2*Δ en comparación con la cepa silvestre, lo que indicaba que no existían graves defectos en el ensamblaje del polarisoma y en la formación de los cables de actina. Sin embargo, la subunidad *arpC5* del complejo arp2/3 mostró una despolarización de su localización, distribuyéndose de forma homogénea a lo largo de la célula y no de forma concentrada en los polos como en el silvestre.

Adicionalmente, proteínas que participan en el crecimiento polarizado una vez establecido el punto de crecimiento, como *myo52* y *bgs4*, se localizaban mayoritariamente en uno de los polos en lugar de presentar una distribución bipolar como ocurre en el silvestre (Fig. 38). Para confirmar que la localización de *myo52* y *bgs4* correspondía con el polo activo de crecimiento, las células que contenían *myo52*-GFP y *bgs4*-GFP fueron teñidas con calcoflúor y analizadas en el microscopio. Los resultados mostraron que ambas proteínas se localizaban siempre coincidiendo con el polo de crecimiento celular (Fig. 39). Los porcentajes de células monopolares y bipolares (entre el 60-70% de células monopolares) determinados en la cepa mutante mediante estas aproximaciones coinciden perfectamente con lo datos obtenidos mediante tinción de calcoflúor o actina.

Ya que el principal defecto observado en las células mutantes fue el defecto en la localización de la subunidad arpC5 del complejo arp2/3, se procedió a realizar un análisis mas detallado

del mismo. En la figura 40 se muestra con más detalle la localización de arpC5-GFP en células silvestres y mutantes, así como una cuantificación del porcentaje de células en las que la proteína se localizaba de forma polarizada o dispersa en la célula. Como puede observarse, de nuevo el porcentaje de células mutantes en las que arpC5-GFP estaba despolarizado coincide perfectamente con el porcentaje de células monopolares observado previamente.

Todos estos resultados indican que el defecto en NETO observado en el mutante *eng2Δ* no se debe a una incorrecta localización de los marcadores de polaridad o del polarisoma y que el principal defecto que produce la ausencia de la proteína *eng2* es una depolarización del complejo arp2/3, implicado en la endocitosis.

5. Localización y estudio de la dinámica de *eng2* durante el ciclo vegetativo

Una vez analizado a qué nivel podría actuar *eng2* en el crecimiento polarizado, se procedió al

| Proteína | WT | <i>eng2Δ</i> | Localización |
|-------------------|----|--------------|---------------|
| <i>tea1</i> -GFP | | | Correcta |
| <i>pom1</i> -GFP | | | Correcta |
| <i>for3</i> -3GFP | | | Correcta |
| <i>wsp1</i> -YFP | | | Correcta |
| <i>arpC5</i> -CFP | | | Despolarizada |
| <i>myo52</i> -GFP | | | Monopolar |
| <i>bgs4</i> -GFP | | | Monopolar |

Figura 38.- Localización de proteínas relacionadas con el crecimiento polarizado en el mutante *eng2Δ*. Se muestra una imagen representativa del patrón general de localización de cada proteína observado en la cepa silvestre (WT) y en el mutante *eng2Δ*. En la última columna se indica la localización de la proteína analizada en el mutante *eng2Δ* con respecto a la cepa silvestre. Barra de escala, 2 μm.

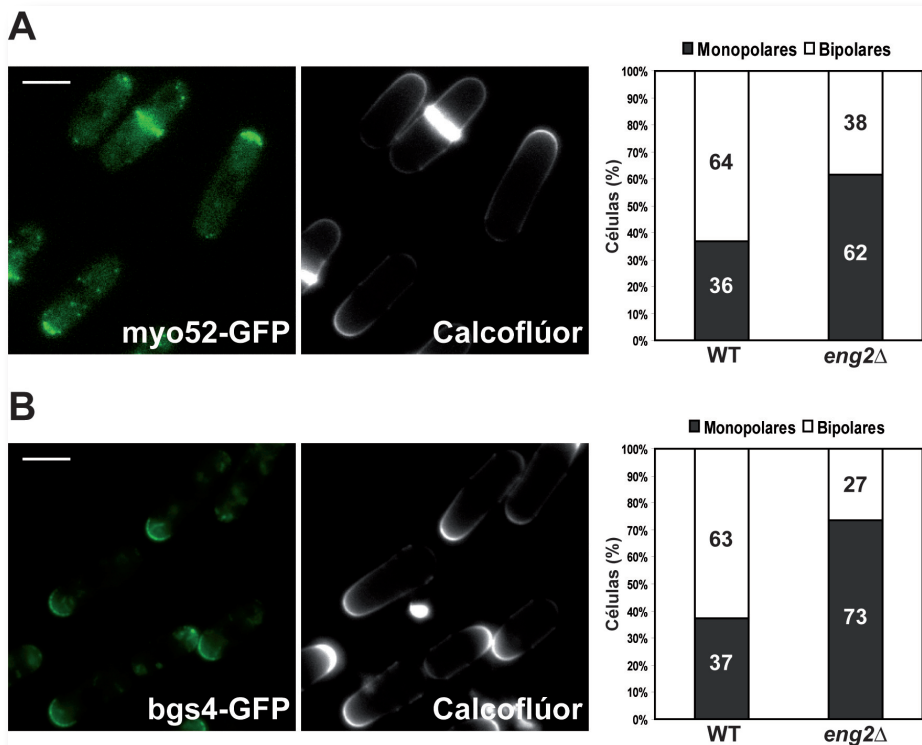


Figura 39.- Localización de myo52 y bgs4 en el mutante *eng2Δ*. Localización de la proteína myo52-GFP (A) y bgs4-GFP (B) en células *eng2Δ* teñidas con calcoflúor. Las gráficas muestran el porcentaje de células con localización monopolar (■) o bipolar (□) de cada proteína en la cepa silvestre y el mutante *eng2Δ* (n ≥ 150 células). Barras de escala, 5 µm.

estudio de su localización y dinámica en la célula para determinar si era similar a la de alguna de las proteínas implicadas en NETO o crecimiento polarizado previamente descritas. Para generar proteínas de fusión con proteínas fluorescentes se utilizaron dos aproximaciones diferentes:

- 1) Marcar *eng2* con la GFP en el extremo carboxilo bajo el control de su propio promotor.
- 2) Clonar *eng2*⁺ en un plásmido bajo el control de su propio promotor y etiquetar

su extremo carboxilo con la proteína fluorescente roja (mCherry).

Antes de proceder al estudio de la localización de las proteínas de fusión, se comprobó su funcionalidad introduciéndolas en el mutante *eng2Δ* y analizando si eran capaces de complementar el defecto en NETO. El estudio de dos clones independientes mostró que aunque en ambos casos el nivel de proteína era similar (Fig. 41, panel superior), sólo uno de ellos era capaz de complementar el fenotipo del mutante *eng2Δ*

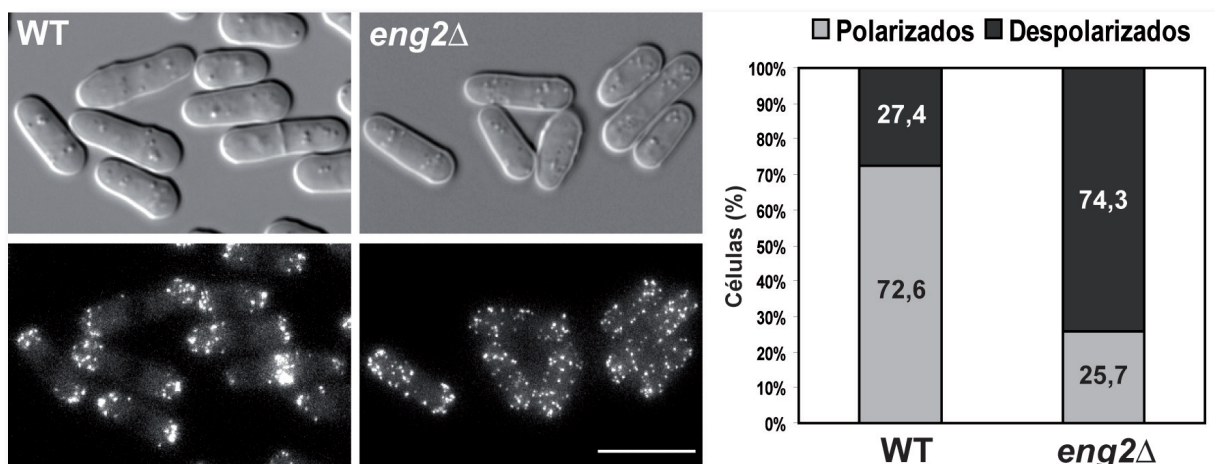


Figura 40.- Localización de arpC5-GFP en el mutante *eng2Δ*. Localización de la proteína arpC5-GFP en la cepa silvestre y el mutante *eng2Δ*. La gráfica muestra el porcentaje de células en las que arpC5-GFP se encuentra concentrada en los polos (■) o despolarizada (■) en toda la célula en la cepa silvestre y el mutante *eng2Δ* (n ≥ 150 células). Barra de escala, 10 µm.

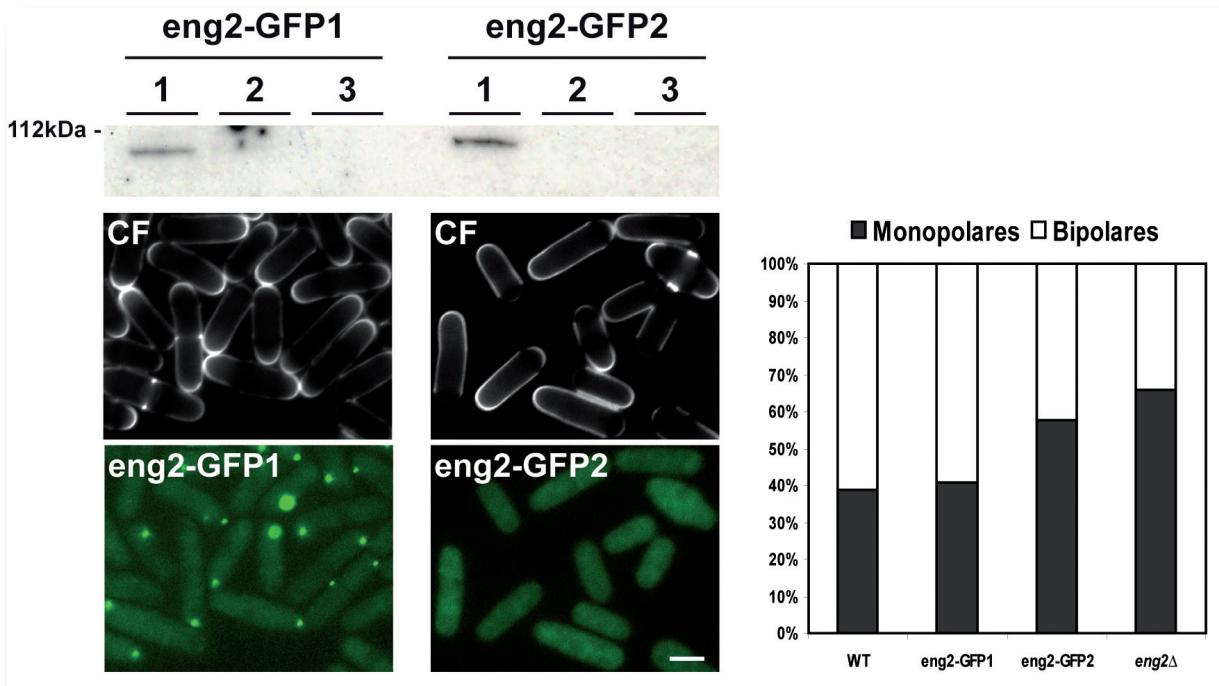


Figura 41.- Patrones de localización de la proteína eng2-GFP. En el panel superior se muestra un ensayo tipo Western-blot con anticuerpos específicos contra la proteína fluorescente verde (GFP) de células asincrónicas creciendo en fase exponencial (1 = extracto total; 2 = sobrenadante centrifugado a 3300 xg; 3 = sobrenadante centrifugado a 14000 xg). Los paneles medios e inferiores muestran el patrón de crecimiento y localización de eng2 en los clones eng2-GFP1 (OL896) y eng2-GFP2 (OL897). Barra de escala, 5 μ m. La gráfica muestra el porcentaje de células con localización monopolar o bipolar de cada clon en relación con la cepa silvestre y el mutante *eng2Δ*.

(Fig. 41, panel medio y gráfica). Al analizar ambas cepas se observó que el patrón de localización de la proteína era diferente. Mientras que en la cepa *eng2-GFP1* la proteína se localizaba en forma de puntos en el citoplasma celular y complementaba el defecto del mutante *eng2Δ*, en la cepa *eng2-GFP2* la localización era difusa en el citoplasma y no complementaba el fenotipo del mutante *eng2Δ* (Fig. 41, panel inferior). Las diferencias en el patrón de localización eran debidas a una mutación generada durante el proceso de recombinación en el marcaje de la proteína. Mientras que en la cepa *eng2-GFP2* la proteína fluorescente verde había recombinado de acuerdo con el diseño del cassette, en la cepa *eng2-GFP1* se había producido un cambio de dos aminoácidos en la proteína, pasando de Ala-Ser (posiciones 690-691) a Gly-Leu-Gly. Este cambio entre *eng2* y la GFP quizás produce un mejor plegamiento de *eng2*, lo que le permite a la proteína complementar los defectos del mutante *eng2Δ*. Puesto que el clon *eng2-GFP1* era capaz de complementar totalmente el defecto del mutante *eng2Δ*, el resto de los experimentos

descritos en esta Memoria se realizaron con esta construcción. La proteína *eng2-mCherry* presenta el mismo cambio que la proteína *eng2-GFP1* y también es capaz de complementar los fenotipos del mutante *eng2Δ*.

Cuando se analizó la localización de la proteína *eng2-GFP*, inicialmente se observó que esta proteína localizaba como un punto en el citoplasma de la célula, aunque con exposiciones más largas era posible observar varios puntos de menor intensidad (Fig. 42A). Para cuantificar con mayor precisión el número de puntos presentes en cada célula, se tomaron imágenes de cultivos asincrónicos capturando 8 planos en el eje z (con una separación de 0,6 μ m entre planos) y posteriormente se generó la proyección máxima de cada una de ellas. Los resultados obtenidos indicaron que las células contenían entre 1 y 5 puntos por célula, de los cuales uno solía ser más grande y brillante. La mayoría de las células presentaban 1 (29%), 2 (38%) o 3 puntos (27%), aunque también existían células con 4 (5%) y 5 puntos (1%). Las células con 5 puntos o más

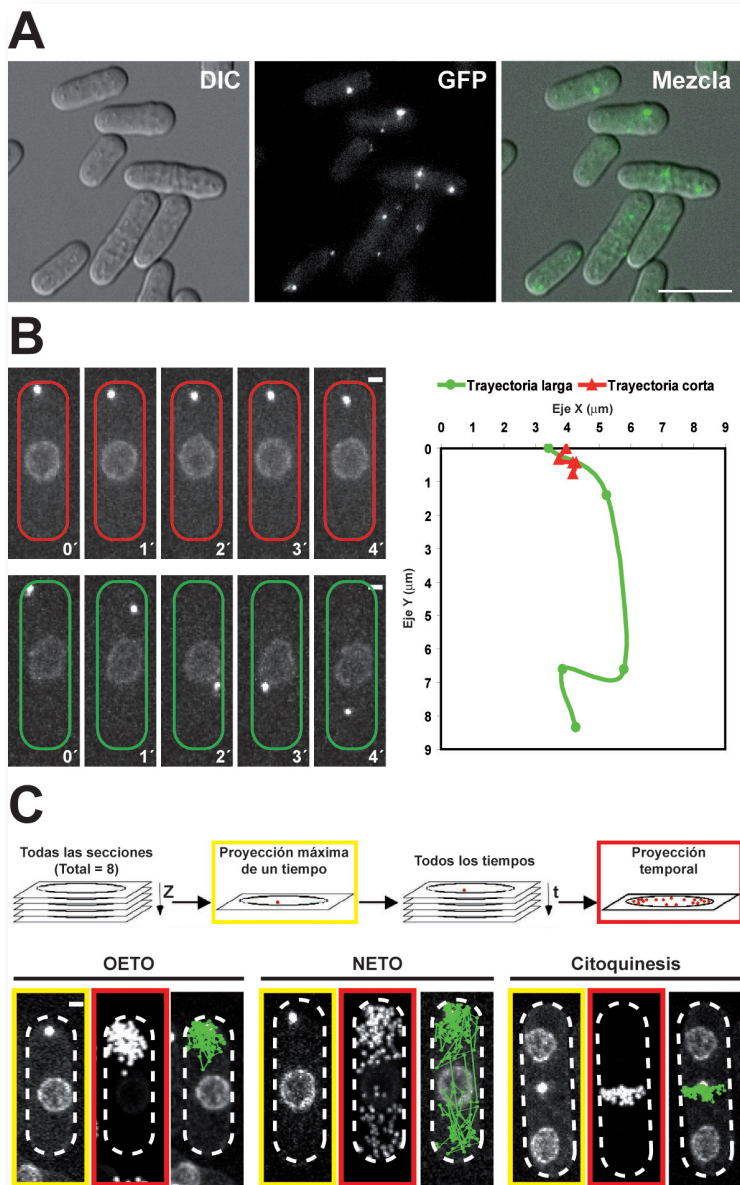


Figura 42.- Localización y dinámica de la proteína eng2-GFP durante el crecimiento vegetativo. **A.** Las fotos muestran el plano medio de las células (DIC), la proyección máxima de la fluorescencia de 8 secciones cubriendo todo el grosor de las células (GFP) y la mezcla de las dos imágenes. Barra de escala, 10 μm . **B.** Análisis de la localización de eng2-GFP durante 5 minutos (en una cepa eng2-GFP cut11-GFP). cut11 es una nucleoporina asociada a la envuelta nuclear y al SPB durante mitosis (West *et al.*, 1998). En cada tiempo, la imagen es la proyección máxima de 8 planos. La gráfica muestra la trayectoria de desplazamiento y distancia recorrida por eng2-GFP durante el ensayo (rojo = trayectoria corta; verde = trayectoria larga). Barra de escala, 1 μm . **C.** El panel superior muestra un esquema del método utilizado para el análisis. Se capturaron imágenes cada minuto durante 150 minutos, tomando 8 planos en el eje z para cada tiempo. Primero se generó la proyección máxima de cada tiempo (recuadro amarillo). Posteriormente las proyecciones máximas se apilaron y proyectaron de nuevo para obtener la proyección máxima de todos los tiempos (proyección temporal, recuadro rojo). De esta manera, cada imagen contiene la información de la localización de eng2-GFP a lo largo de todo el ensayo de *time-lapse*. En el panel inferior se muestran detalles de la localización y trayectoria de desplazamiento de eng2-GFP durante el crecimiento monopolar (OETO), el crecimiento bipolar (NETO) y durante la citoquinesis (Citoquinesis). Barra de escala, 1 μm .

eran muy infrecuentes. Cuando se analizó la localización de eng2-GFP a lo largo del tiempo (mediante experimentos de "time-lapse"), se pudo comprobar que tanto el punto intenso como los menos brillantes eran dinámicos y se movían en el citoplasma. Como todos los puntos presentaban una dinámica y comportamiento similar, para los análisis de localización a lo largo del tiempo y co-localización con otras proteínas que se describen en este capítulo se ha utilizado siempre el punto más brillante, al ser más fácil de visualizar. El análisis de distintas células permitió determinar que durante interfase la proteína eng2-GFP presentaba una serie de movimientos de corto recorrido y restringidos a cada polo que alternaban con desplazamientos más rápidos y

de mayor distancia que hacían que el punto se desplazara de polo a polo. En la figura 42B se muestra un ejemplo de cada tipo de movimiento (corto y largo) y la trayectoria que sigue el punto a lo largo del tiempo. Como puede observarse, los movimientos cortos son aleatorios y sin un patrón definido y la distancia recorrida entre cada tiempo no supera los 0,5 μm . Por el contrario, los largos van de polo a polo, recorriendo distancias superiores a los 10 μm .

Dado el comportamiento dinámico de eng2-GFP, se procedió a analizar su localización durante las distintas fases del ciclo celular tomando imágenes cada minuto durante 150 minutos. Para analizar los resultados de estos

experimentos de una forma más simple, se utilizó una técnica que hemos denominado “proyección temporal” y que en esencia consiste en apilar las imágenes de cada tiempo y generar una proyección máxima de todas ellas (ver detalles en el pie de la Fig. 42C). De esta manera, una única imagen muestra toda la información espacial sobre la localización de eng2-GFP a lo largo de cada ensayo. También se generaron videos del desplazamiento de eng2-GFP que se incluyen como material suplementario. Este análisis nos permitió determinar que cuando las células estaban creciendo de forma monopolar (OETO en Fig. 42C y Video_6), eng2-GFP se movía de forma mayoritaria en uno de los polos, acercándose y alejándose de la membrana. Esta imagen es la proyección de 150 minutos, en la que también se ha marcado la trayectoria que sigue eng2-GFP a lo largo del tiempo con una línea verde. Como puede observarse, la mayoría de los movimientos son cortos y aleatorios, sin un patrón definido. Por el contrario, en células que ya habían hecho NETO y estaban creciendo de forma bipolar (NETO en Fig. 42C y Video_7), eng2-GFP alternaba los movimientos cortos en un polo con desplazamientos de polo a polo, aunque no pudo observarse ninguna relación entre el desplazamiento de eng2 y la activación del crecimiento en el polo nuevo. Como se observa en la trayectoria mostrada en la parte derecha de la figura (que condensa la información de 150 minutos), eng2 se desplaza varias veces de un polo a otro. Finalmente, durante la citoquinesis (Citoquinesis en Fig. 42C y Video_8), los movimientos de eng2-GFP se concentraban únicamente en la región del anillo de actomiosina, pero sin llegar a formar parte de él. Resultados similares se obtuvieron cuando se empleó la fusión eng2-mCherry.

La proteína eng2 no presenta ningún dominio motor en su estructura, lo cual indica que su movilidad debe ser dependiente de otras proteínas motoras -como myo52- o de diversas estructuras celulares, como el citoesqueleto de actina o los microtúbulos. Para comprobar si eng2 era transportada a través de los microtúbulos

de forma similar a las proteínas tea1-tea4, se construyó la cepa *nmt1⁺_GFP_atb2* (versión 41x) *eng2_GFP*, en la que era posible analizar la localización de estas dos proteínas en la misma célula. Mediante análisis de “*time-lapse*”, se comprobó que no existía una relación entre los microtúbulos y eng2, ya que eng2-GFP no localizaba ni en la punta de los microtúbulos (como tea1-tea4) ni tampoco a lo largo de los mismos (como tea2, tip1 o mal3) (datos no mostrados). Para confirmar esta independencia, se analizó la dinámica de eng2-GFP en células a las que se les había despolimerizado el citoesqueleto de microtúbulos. Para ello, la cepa *nmt1⁺_GFP_atb2 eng2_GFP* fue sometida a un tratamiento con MBC 25 μ M durante 15 minutos a temperatura ambiente; este tratamiento fue suficiente para despolimerizar los microtúbulos sin afectar a otras estructuras celulares (Sawin y Snaith, 2004). En estas condiciones, la proteína eng2-GFP mantuvo su movilidad y dinámica, lo que confirmó que los microtúbulos no participaban en el desplazamiento de eng2 (Video_9). Como control se utilizó la misma cepa tratada con DMSO, solvente utilizado para disolver el MBC (Video_10). Por tanto, estos resultados indican que el movimiento de eng2-GFP es independiente del citoesqueleto de microtúbulos.

Un mecanismo alternativo para el transporte intracelular de proteínas y orgánulos son los cables de actina, que actúan dirigiendo el movimiento de las vesículas secretoras hacia los polos, proceso en el que también intervienen las miosinas de Clase V, como myo52 (Mulvihill *et al.*, 2006; Mulvihill *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001). Para determinar si la dinámica de eng2 era dependiente del citoesqueleto de actina, se plantearon diversas aproximaciones. En primer lugar, se construyó una cepa que contenía *eng2_mCherry* (en el plásmido pJED18) y *41nmt1⁺_GFP_CHD_rng2* (dominio de homología a calponina de la proteína rng2, que posee la capacidad de unirse a la actina, y por tanto sirve de marcador de los cables de actina), en la que poder analizar si existía colocalización entre eng2 y los cables de actina. Mediante ensayos de “*time-lapse*” en un único plano, se pudo comprobar que en determinados

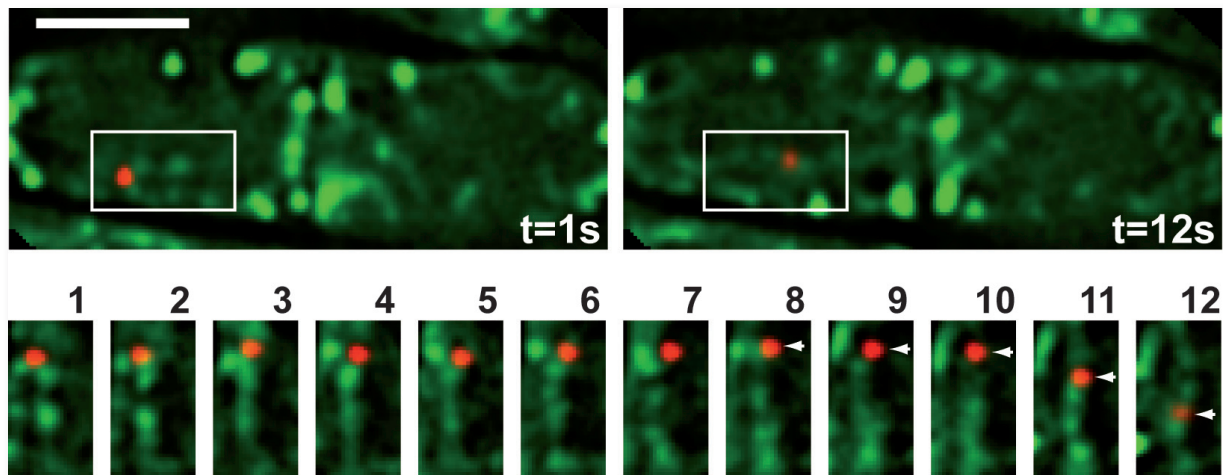


Figura 43.- eng2 se desplaza asociada a los cables de actina. El panel superior muestra una imagen general de una célula que contiene eng2-mCherry y GFP-CHD-rng2 a tiempo inicial y tiempo final de un experimento de “*time-lapse*”. El panel inferior muestra un detalle ampliado de la región marcada con un recuadro en la que se observa con más detalle el movimiento de eng2-mCherry a lo largo de los cables de actina. Las flechas indican el momento en que eng2 se desplaza a lo largo del cable. Los números indican la escala temporal (en segundos). Barra de escala, 3 μ m.

momentos la proteína eng2-mCherry localizaba con los cables y parecía desplazarse a lo largo de ellos. Es interesante que la asociación observada sólo tenía lugar en movimientos largos, cuando eng2 se movía de polo a polo o del polo al anillo (Fig. 43). En los movimientos cortos dentro de cada polo o en la región del anillo no se observó nunca una colocación entre eng2 y los cables de actina, lo que indica que este tipo de desplazamientos parecen ser independientes de los cables de actina. Para confirmar que al menos el desplazamiento de eng2 de polo a polo era dependiente de los cables de actina, una cepa que contenía eng2-GFP fue tratada con Latrunculina A 50 μ M durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de analizar su dinámica. Este tratamiento fue suficiente para despolimerizar tanto los parches como los cables de actina (Fig. 44B). Como control se utilizó la misma cepa, tratada en las mismas condiciones con DMSO (solvente de la Latrunculina A). Se hicieron experimentos de microscopía a lo largo del tiempo durante 20 minutos, tomando fotos cada minuto. Para su análisis, se generó la proyección temporal de cada experimento para poder medir el desplazamiento de eng2-GFP en células tratadas con LatA y control. Bajo estas condiciones, la movilidad y dinámica de eng2-GFP se redujo de forma drástica, ya que el 50% de

los puntos de eng2-GFP permanecían inmóviles durante el tiempo del ensayo (flechas rojas en la Fig. 44A); el resto de los puntos presentaban ciertos movimientos, pero en todos los casos eran cortos y en torno a la posición inicial, como los desplazamientos dentro del polo descritos anteriormente. Para cuantificar el defecto en la movilidad de eng2-GFP, se midió la distancia media recorrida por la proteína en células tratadas con LatA y sin tratar. Mientras que en la cepa tratada con DMSO la distancia media era de unas 8 μ m (n = 30 células), en la cepa tratada con LatA la media se redujo hasta las 3 μ m (n = 60 células). Además, en la cepa tratada con LatA, eng2-GFP perdía la capacidad de moverse de polo a polo, pero no en la que se trató con DMSO (Fig. 44A). Estos resultados permiten concluir que el movimiento de eng2 entre los polos de la célula depende del citoesqueleto de actina, habiéndose observado una colocación entre eng2 y los cables de actina en estos desplazamientos, mientras que los movimientos más cortos en cada polo son independientes de los cables de actina.

Ya que el desplazamiento de largo recorrido de eng2 parecía ser dependiente de los cables de actina, se procedió a comprobar si las miosinas de Clase V también estaban implicadas en este proceso. Para ello, se construyó la cepa *myo52 Δ eng2_GFP*. El mutante *myo52 Δ* presenta una

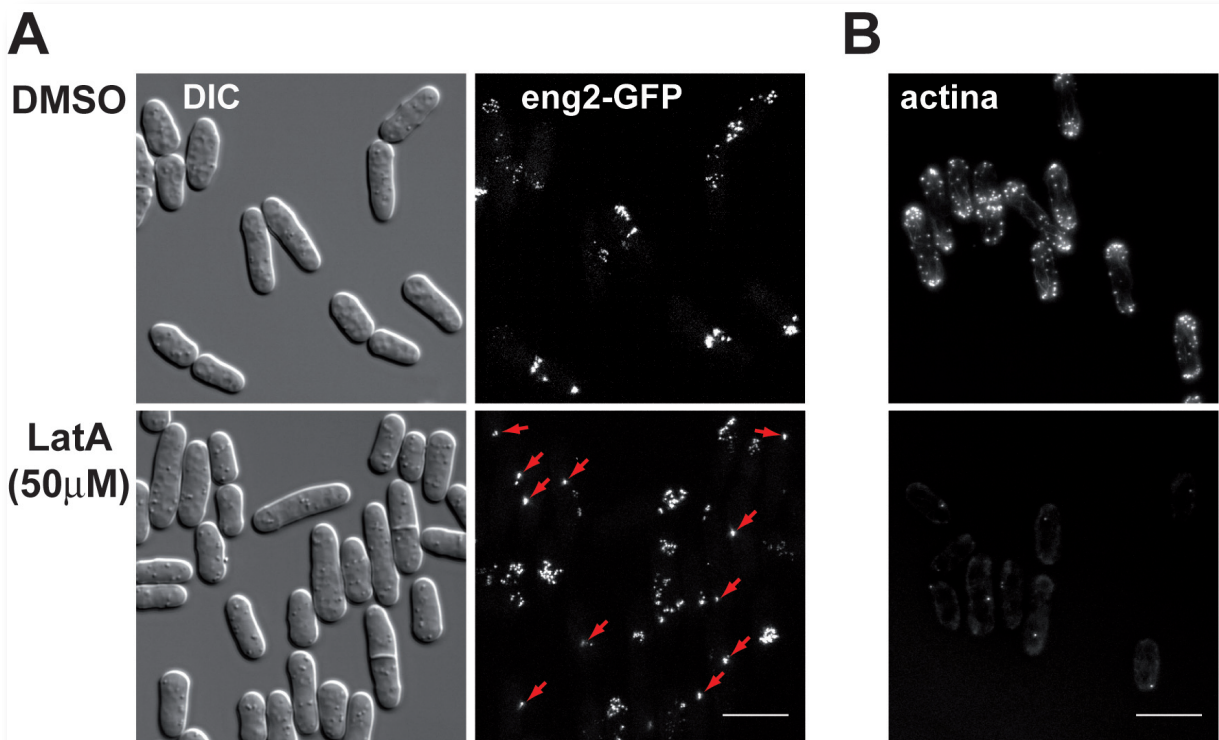


Figura 44.- Los movimientos de polo a polo de eng2 son dependientes del citoesqueleto de actina. A. Detalle de la movilidad de la proteína eng2-GFP en células tratadas con DMSO o Latrunculina A. A la izquierda se muestra una imagen en DIC del plano medio de las células, a la derecha se muestra la proyección temporal de un ensayo de *time-lapse* de 20 minutos de duración tomando 8 secciones en cada tiempo. Las flechas rojas señalan aquellos puntos de eng2 que no se movieron a lo largo del ensayo. Barra de escala, 10 μm. **B.** Tinción del citoesqueleto de actina con faloidina-Alexa-Fluor488 de células tratadas con DMSO o Latrunculina A. Barra de escala, 10 μm.

pérdida parcial de la polaridad, crecimiento lento y alteraciones en citoquinesis; todos estos defectos se deben a la ausencia de una correcta secreción polarizada. La cepa *myo52Δ eng2-GFP* presentaba la morfología típica del mutante *myo52Δ*. Sin embargo, la dinámica de eng2-GFP y el desplazamiento de polo a polo no estaba afectado (Video_11) y era similar al de la cepa control utilizada (OL896, Video_12), lo que indica que *myo52* no está implicada en el movimiento de eng2.

De forma conjunta, todos estos resultados indican que eng2 es una proteína muy dinámica, existiendo dos tipos de movimientos: unos cortos y locales en torno a cada polo, acompañados ocasionalmente con desplazamientos de polo a polo o a la región del anillo. Estos dos tipos de movimientos son completamente independientes de *myo52* y de los microtúbulos, pero tienen una diferente dependencia de los cables de actina, ya que esta estructura es necesaria únicamente para los desplazamientos largos.

En *S. pombe*, se han descrito hasta el momento al menos otras tres proteínas que también localizan como puntos dinámicos en el citoplasma de la célula. Una de ellas es la formina *cdc12*, necesaria para el ensamblaje de filamentos de actina en el anillo contráctil durante el proceso de citoquinesis, pero que durante interfase se localiza como un punto dinámico en la célula. También las miosinas *rlc1* y *myp2* se localizan como puntos citoplásmicos móviles. *rlc1* es la cadena ligera reguladora de las miosinas de Clase II, mientras que *myp2* es una de las cadenas pesadas de las miosinas de Clase II, y ambas proteínas colocalizan durante interfase (Coffman *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006). Para comprobar si eng2 colocalizaba con alguna de estas proteínas, cepas que contenían *cdc12-3YFP* y *rlc1-3GFP* se transformaron con el plásmido pJED18 (*eng2-mCherry*). El análisis de estas cepas, mostró que ninguna de estas dos proteínas colocalizaba con eng2 durante el ciclo vegetativo de *S. pombe*. En la Figura

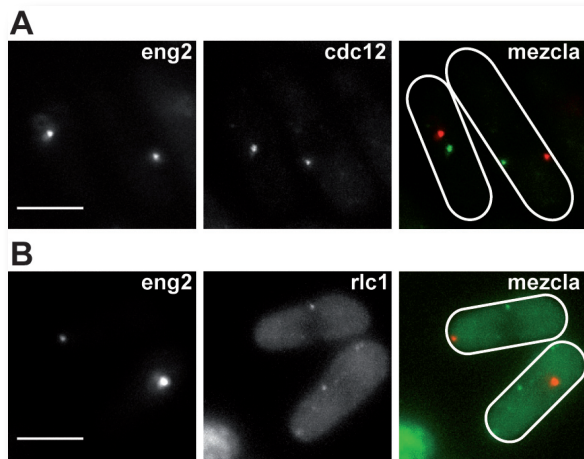


Figura 45.- eng2 no colocaliza con la formina cdc12 ni con la miosina de Clase II rlc1. A. Localización de eng2-mCherry (izquierda) y cdc12-3YFP (centro) en la misma célula. B. Localización de eng2-mCherry (izquierda) y rlc1-3GFP (centro) en la misma célula. A la derecha se muestra la mezcla de las dos imágenes anteriores. Barras de escala, 5 μ m.

45 se muestra un ejemplo de la localización de eng2-mCherry y cdc12-3YFP en la misma célula (Fig. 45A) o de eng2-mCherry y rlc1-3GFP (Fig. 45B). Estudios recientes han demostrado que la proteína Isb1 también localiza en forma de puntos de forma similar a eng2 (Matsuyama *et al.*, 2006). Proteínas de esta familia se han relacionado con la organización del citoesqueleto de actina y la endocitosis en *S. cerevisiae* (Dewar *et al.*, 2002; Madania *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2009a). Para analizar esta posible interacción se etiquetó la proteína Isb1 con la proteína fluorescente amarilla (YFP) bajo el control de su propio promotor. Isb1-YFP se localiza de forma similar a eng2-GFP, como varios puntos citoplasmáticos uno de los cuales presenta una mayor intensidad; además, al igual que eng2 y a diferencia de cdc12, rlc1 o myp2, durante la citoquinesis se mantiene como uno o varios puntos en la región

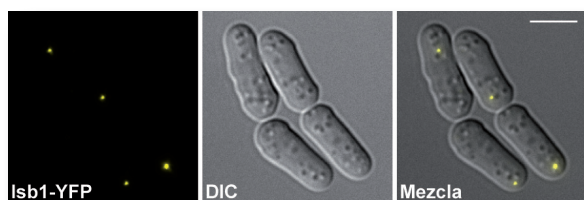


Figura 46.- Localización de la proteína Isb1-YFP durante el crecimiento vegetativo. Se muestra la proyección máxima de la fluorescencia de 8 secciones cubriendo todo el grosor de las células (Isb1-YFP), el plano medio de las células (DIC) y la mezcla de las dos imágenes. Barra de escala, 5 μ m.

del septo pero nunca llega a formar un anillo (Fig. 46). Para comprobar si eng2 y Isb1 colocalizaban, la cepa Isb1-YFP se transformó con el plásmido pJED18 (eng2-mCherry) y se analizó en el microscopio de fluorescencia. Ambas proteínas colocalizan de forma precisa tanto en el punto más brillante como en los de menor tamaño (Fig. 47). Además, ensayos de “time-lapse” mostraron que ambas proteínas se desplazaban de forma conjunta a lo largo del tiempo (Video_13). Otro resultado interesante fue el hecho de que la localización de eng2 se encuentre parcialmente alterada en el mutante *Isb1* Δ ; apareciendo una cierta fluorescencia difusa en el citoplasma y también en el núcleo (Fig. 48). En conjunto, estos resultados indican que eng2 y Isb1 (y quizás otras proteínas) están formando un complejo implicado en la organización del citoesqueleto de actina en *S. pombe*.

6. El extremo amino de eng2 es esencial para su función durante del ciclo vegetativo

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado que la proteína eng2 de *S. pombe* es una endoglucanasa específica de enlaces β -1,3 (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b). De forma similar a la proteína Eng2 de *S. cerevisiae*, eng2 presenta dos regiones claramente identificables en su secuencia. En el extremo amino contiene una región rica en prolinas, similar a los motivos de interacción

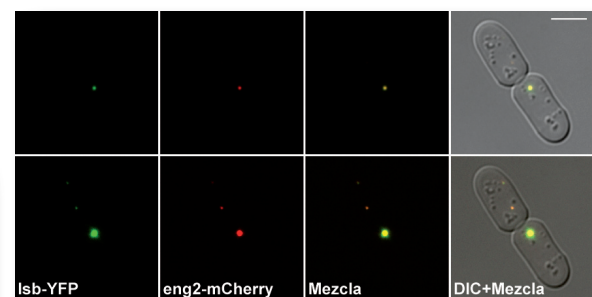


Figura 47.- eng2 colocaliza con la proteína Isb1. Localización de Isb1-YFP y eng2-mCherry en las mismas células. Los paneles inferiores muestran el mismo grupo de células que los superiores a tiempos de exposición más largos y forzando los histogramas. A la derecha se muestra la mezcla de las dos imágenes anteriores (sin y con imagen de DIC). Barra de escala, 5 μ m.

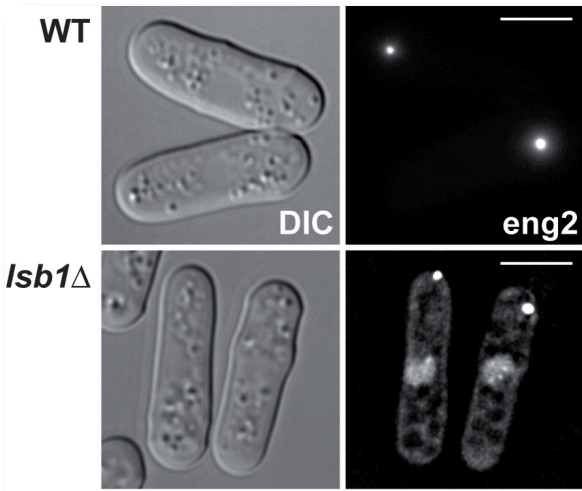


Figura 48.- Localización de la proteína eng2-GFP en el mutante *Isb1Δ*. Se muestra el plano medio de las células (DIC) y la proyección máxima de la fluorescencia de 8 secciones cubriendo todo el grosor de las células (*eng2*) en la cepas silvestre y el mutante *Isb1Δ*. Barra de escala, 5 μm.

con los dominios SH3 (Mayer, 2001; Tong *et al.*, 2002; Tonikian *et al.*, 2009) (Fig. 32B y C). El resto de la proteína constituye el dominio común de las proteínas de la familia GH81. Al analizar la estructura secundaria de la proteína, se puede distinguir una segunda organización dentro de este dominio común. Mientras que la zona más próxima al extremo amino está formada mayoritariamente por láminas β, el extremo C-terminal es rico en hélices α (Fig. 49). Este modelo de organización también se encuentra conservado en Eng2 de *S. cerevisiae*, y se ha descrito que la región C-terminal contiene el

domino catalítico de la proteína (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b).

El hecho de que una proteína con actividad glucanasa se localice en el citoplasma de la célula resulta un hecho sorprendente, ya que estaría separada de su sustrato natural (los glucanos de la pared celular) por la membrana plasmática. Más sorprendente todavía es el hecho de que esta proteína parecía desempeñar una función durante la transición del crecimiento monopolar a bipolar, lo que llevó a plantearnos la cuestión de si la actividad catalítica de *eng2* era necesaria para esta función o no. Para responder a esta pregunta, y al mismo tiempo analizar la importancia de las distintas regiones de la proteína en su función en NETO, se construyeron una serie de mutaciones y versiones truncadas de la misma. En primer lugar, se creó un mutante puntual que carece de actividad glucanasa. En la proteína Eng2 de *S. cerevisiae*, se ha descrito que los glutámicos E609 y E613 son esenciales para su actividad glucanasa *in vitro*, ya que su cambio a alanina elimina completamente la actividad catalítica (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b). En la proteína de *S. pombe*, estos glutámicos se encuentran en posiciones 533 y 537 por lo que se construyó una proteína en la que E537 había sido sustituido por una alanina (*eng2-E537A*; Fig. 50A), y se comprobó que esta mutación también

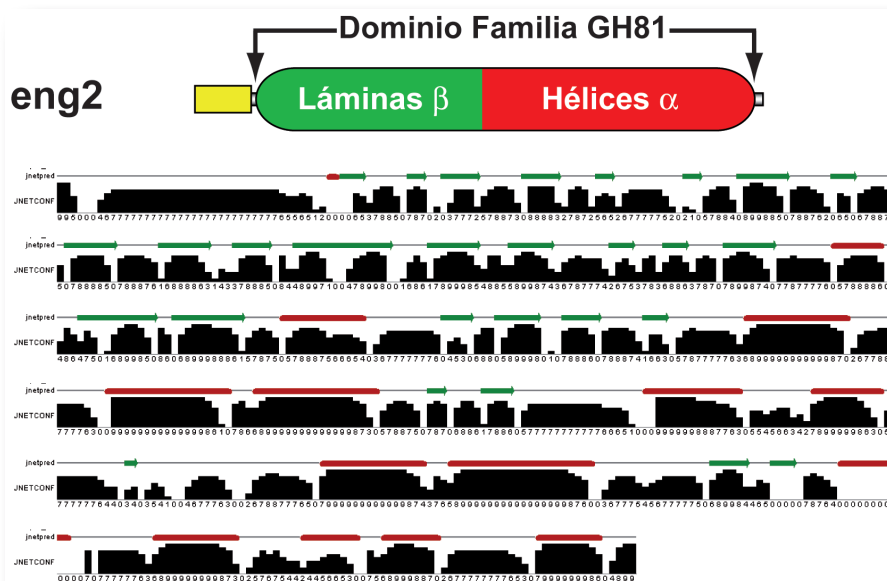


Figura 49.- Estructura secundaria de la proteína eng2 en *S. pombe*. El panel superior muestra un esquema de los dominios presentes en la proteína, en amarillo se muestra la región rica en prolinas, en verde la región todo-β y en rojo la región todo-α. En el panel inferior se muestra la predicción de la estructura secundaria de *eng2* generada por Jpred3 (Universidad de Dundee).

eliminaba la actividad glucanasa de la proteína mediante ensayos *in vitro*. Esta construcción nos permitió comprobar si la actividad glucanasa era necesaria para su función durante el crecimiento polarizado. Una segunda versión construida de *eng2* fue aquella en la que se eliminó la región rica en prolina del extremo N-terminal (*eng2Δ1-36*). Con esta construcción se trató de determinar si las posibles interacciones con otras proteínas eran importantes para su función. También se estudió el efecto de la delección de todo el extremo amino, incluyendo la región rica en prolina y láminas β (*eng2Δ1-303*). Por último, se analizó la funcionalidad de la proteína en la que sólo estaban presentes los motivos ricos en prolina y las láminas β eliminando la región rica en hélices α (*eng2Δ348-706*). Todas estas construcciones fueron clonadas en el vector pAUKS (ver Materiales y Métodos) bajo el control del promotor de *eng2*⁺ e introducidas en la cepa

eng2Δ. Como controles, se utilizaron la cepa silvestre, el mutante *eng2Δ*, la proteína *eng2* silvestre clonada en el vector de clonación (pAUKS) y el vector de clonación.

Con las versiones truncadas de *eng2* y sus respectivos controles se transformó una cepa *eng2Δ* (OL759), siendo analizada mediante tinción con calcoflúor en el microscopio de fluorescencia para determinar el porcentaje de células monopolares y bipolares en cada caso. Mientras que la cepas que habían sido transformadas con la proteína silvestre o la versión *eng2-E537A* mostraban un fenotipo similar a la cepa silvestre (Fig. 50A), en aquellas que portaban las versiones *eng2Δ1-36* o *eng2Δ1-303* existía una mayor abundancia de células monopolares, como ocurre en el mutante *eng2Δ* (Fig. 50A). La cepa transformada con la versión *eng2Δ348-706* exhibía un fenotipo intermedio

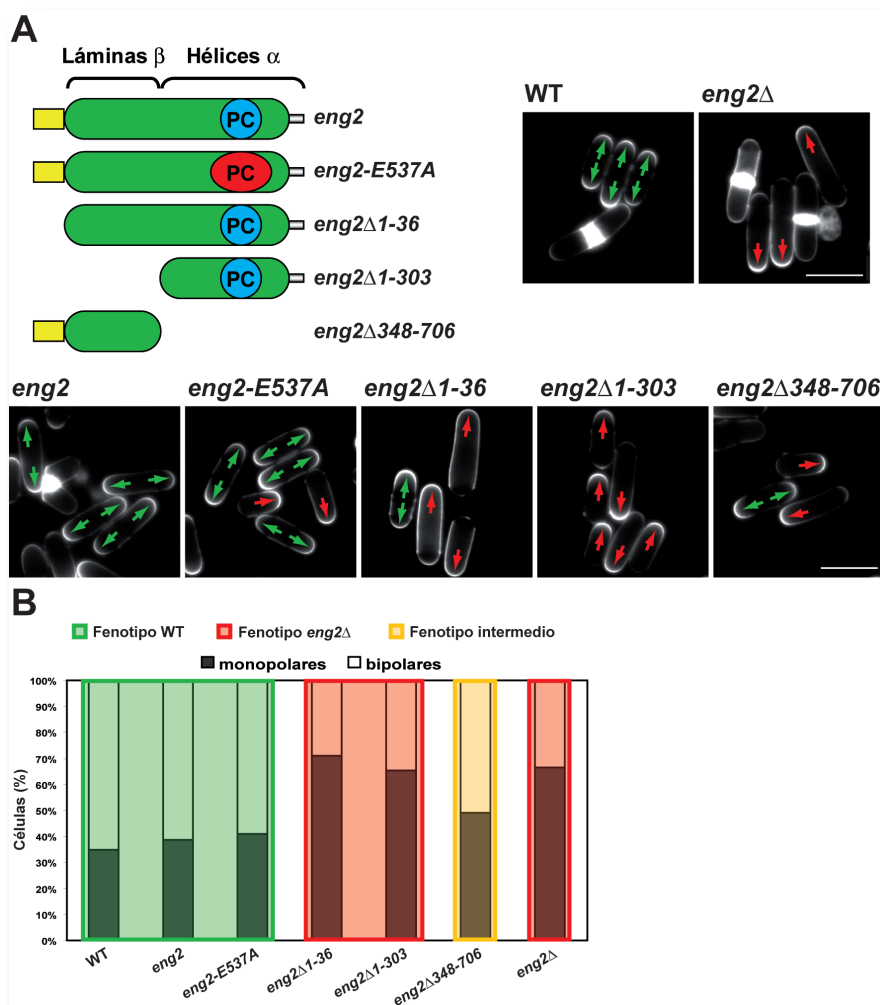


Figura 50.- Estudio de la función de los diferentes dominios de *eng2*. **A.** El panel superior izquierdo muestra un esquema de las diferentes versiones generadas de la proteína *eng2*. En amarillo se muestra la región rica en prolina, en verde el dominio común a la familia 81 de las glicosil hidrolasas, en azul el Par Catalítico nativo y en rojo el Par Catalítico con una mutación puntual en la posición 537 (E→A). En el resto de los paneles se muestra el patrón de crecimiento más característico de cada uno de los truncamientos. Las flechas indican la dirección y patrón de crecimiento (verde = crecimiento bipolar; rojo = crecimiento monopolar). Barra de escala, 10 μm. **B.** El gráfico muestra los porcentajes de células que presentaban un patrón de crecimiento monopolar (■) o bipolar (□) para cada una de las versiones de *eng2*. En verde se muestran los truncamientos con fenotipo silvestre, en rojo aquellos que presentaban fenotipo *eng2Δ* y en amarillo los que mostraban un fenotipo intermedio.

(Fig. 50A). Para cuantificar el defecto de cada una de las mutaciones, se hizo un recuento de células con crecimiento monopolar y bipolar (las células en septación no se consideraron ya que representaban un porcentaje similar en todos los casos). Los transformantes que contenían la proteína silvestre o *eng2-E537A* mostraban un porcentaje de células monopolares y bipolares similar a la cepa silvestre, mientras que las cepas transformadas con *eng2Δ1-36* o *eng2Δ1-303* mostraban porcentajes similares al mutante *eng2Δ* (Fig. 50B). La cepa *eng2Δ348-706* exhibía el mismo porcentaje de células monopolares y bipolares. Este defecto podría deberse a la ausencia de expresión de las versiones truncadas o la inestabilidad de las mismas. Para comprobar que éste no era el caso, se realizaron ensayos de actividad glucanasa *in vitro* y complementación del fenotipo de esporulación que se describe en el capítulo siguiente. Los resultados indicaron que todas ellas se expresaban y eran estables (datos no mostrados). Todos estos resultados permitieron concluir que la actividad glucanasa no es necesaria para la función de *eng2* en el crecimiento polarizado de *S. pombe*, mientras que los primeros 36 aminoácidos de la proteína son esenciales para la misma.

La versión *eng2Δ1-36* se mostró como la más interesante, ya que la simple delección de la región

rica en prolinas tenía como resultado la pérdida completa de su funcionalidad. Para averiguar si este fenotipo era consecuencia de defectos en la localización de la proteína, marcamos la cepa *eng2Δ1-36* con una versión de la proteína roja fluorescente (*eng2Δ1-36-mCherry*), siendo ésta la única copia de *eng2* presente en la célula. La proteína *eng2Δ1-36-mCherry* se localizaba de forma difusa en el citoplasma y también se concentraba en los núcleos celulares, pero en ningún caso se encontró localizada en forma de puntos en el citoplasma (Fig. 51). Además, cuando se determinó el porcentaje de células monopolares y bipolares, se comprobó que su fenotipo era similar al de las cepas *eng21-36Δ* y del mutante *eng2Δ* (Fig. 51). Por tanto, la región 1-36 que contiene la región rica en prolinas es necesaria para la correcta localización de *eng2* como puntos citoplásmicos y para su función. En vista de este resultado, se construyó una nueva versión de *eng2* en la que se eliminó únicamente la región rica en prolinas que compartía con la proteína *wsp1* (PVFPSRAHPSPPLGL), para determinar si la delección de este motivo era suficiente para producir el fenotipo mutante. Esta nueva versión se denominó *eng2Δ14-28-mCherry*. Como en el caso anterior, en la mayoría de las células esta versión truncada se localizaba en el citoplasma y el núcleo, aunque en algunas

eng2Δ1-36-mCherry

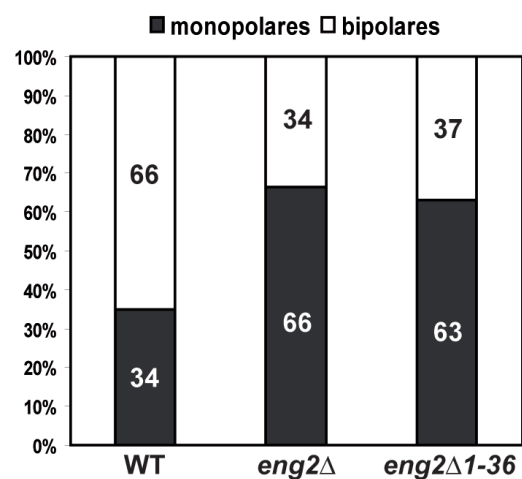
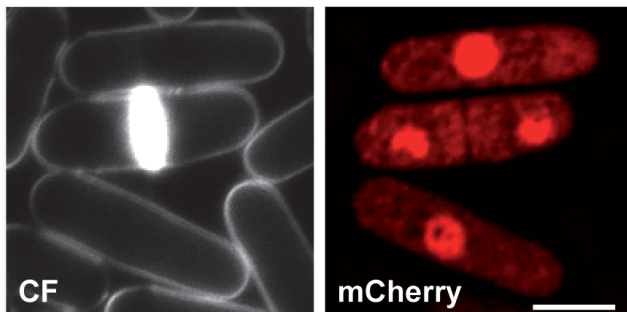


Figura 51.- El extremo N-terminal de *eng2* es esencial para su localización y función durante el crecimiento vegetativo. A la izquierda se muestra un esquema de la proteína utilizada en el análisis, junto con su localización (mCherry) y el patrón de crecimiento (analizado mediante tinción con calcoflúor, CF). Barra de escala, 5 μ m. A la derecha se muestra un gráfico con el porcentaje de células con crecimiento monopolar (■) o bipolar (□) en cada cepa.

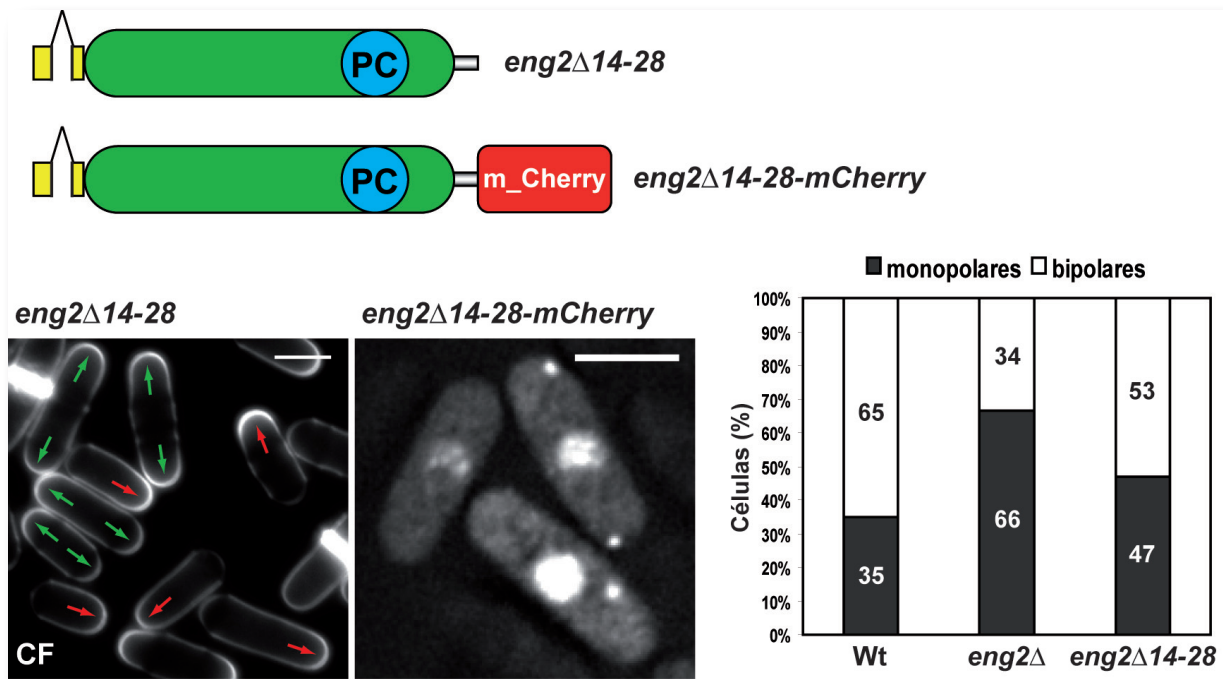


Figura 52.- Otras regiones próximas a las dianas de los dominios SH3 son importantes para la localización y función de eng2 durante el crecimiento vegetativo. En el panel superior se muestra un esquema de los truncamientos estudiados, el panel inferior izquierdo muestra un detalle del patrón de crecimiento y la localización de los mismos. Barra de escala, 5 μ m. A la derecha se muestra un gráfico con el porcentaje de células con crecimiento monopolar (■) y bipolar (□) en la cepa silvestre, el mutante *eng2Δ* y la versión *eng2Δ14-28*.

células era posible detectar algunos puntos citoplásmicos más intensos, similares a los observados en la cepa silvestre (Fig. 52). Cuando se analizó su funcionalidad, se pudo comprobar que el porcentaje de células monopolares era intermedio entre la cepa silvestre y el mutante, quizás porque las células en las que se forman los puntos citoplásmicos sean capaces de realizar NETO de forma similar a las células silvestres (Fig. 52). Estos resultados indican que algunos aminoácidos que rodean a la región rica en prolinas contribuyen a la correcta localización en forma de puntos citoplásmicos y, por tanto, a su función.

En conjunto, los resultados de este bloque permiten concluir que la región 1-36 de *eng2* desempeña un papel esencial en la localización y función de esta proteína durante el crecimiento vegetativo. Ya que en esta región están presentes los motivos ricos en prolinas para la interacción con los dominios SH3 y que se ha mostrado previamente que *eng2* y *Isb1* (proteína que contiene un dominio SH3) colocalizan, es muy

posible que la formación del complejo *eng2-Isb1* esté mediada por la interacción entre estas dos regiones.

7. *eng2* interacciona con una de las subunidades del complejo *arp2/3*

El hecho de que la región rica en prolinas fuera esencial para la función de *eng2* sugería que *eng2* pudiera formar parte de un complejo implicado en el crecimiento. Para tratar de identificar qué proteínas podrían interactuar con *eng2*, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación, empleando para ello una cepa que contenía *eng2* marcada con la GFP (cepa OL896). Se eligió esta cepa porque *eng2*-GFP estaba integrada en el genoma bajo el control de su propio promotor y, además, complementaba perfectamente los fenotipos del mutante *eng2Δ*. Los primeros ensayos realizados para comprobar la estabilidad de la proteína de fusión mediante análisis Western fueron infructuosos, ya que no era posible visualizarla, incluso cuando los extractos celulares se centrifugaban a baja velocidad (S2

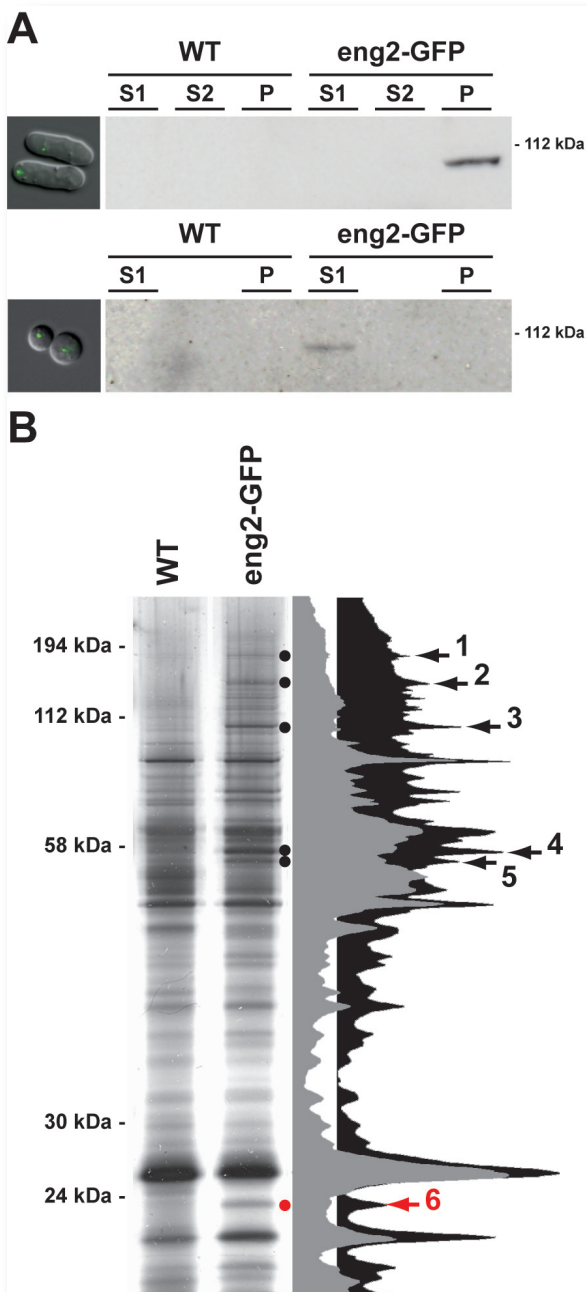


Figura 53.- Identificación de proteínas que interactúan con eng2. **A.** eng2 presenta afinidad por los glucanos de la pared celular. La cepa silvestre (OL023) y la cepa eng2-GFP (OL896) fueron utilizadas para preparar extractos a partir de células enteras (panel superior) o de protoplastos (panel inferior). Los extractos fueron centrifugados a alta velocidad (14000 xg) o a baja velocidad (3300 xg), obteniéndose los sobrenadantes S1 y S2, respectivamente. También se analizó el precipitado (P) de la centrifugación a alta velocidad en células enteras y en protoplastos. Se utilizaron anticuerpos específicos anti-GFP para revelar los Westerns. **B.** Inmunoprecipitación de extractos de protoplastos de las cepas silvestre (WT) y eng2-GFP con μ MACs anti-GFP. El gel fue teñido con nitrato de plata. Los números indican las bandas diferenciales.

en Fig. 53A). Por ello, se decidió analizar también los precipitados obtenidos tras la centrifugación. Esto permitió determinar que eng2 se asociaba

con el precipitado de los extractos celulares (P en Fig. 53A). Estos resultados parecían indicar que eng2 podría asociarse a una estructura celular de alto peso molecular que precipitaba fácilmente. Alternativamente, cabía la posibilidad de que la proteína eng2 fuera capaz de unirse a las paredes celulares tras la rotura de las células y por ello permanecer en el precipitado. Esta última posibilidad no era tan insólita, pues algo similar ocurre con la proteína eng1 de *S. pombe*. Para discernir entre estas dos posibilidades, se generaron protoplastos mediante tratamiento enzimático antes de obtener los extractos celulares. Cuando se analizaron los precipitados y sobrenadantes obtenidos en estas condiciones, se pudo comprobar que eng2 estaba presente en el sobrenadante de alta velocidad (Fig. 53A), lo que indicaba que la proteína eng2 presenta la capacidad de unirse a las paredes celulares. Por ello, todos los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron a partir de extractos celulares de protoplastos.

Una vez establecidas las condiciones para detectar eng2, se realizó una inmunoprecipitación de eng2-GFP utilizando el kit μ MACs anti-GFP y las proteínas presentes en el inmunoprecipitado se compararon con las presentes en una muestra obtenida a partir de una cepa sin marcar, para tratar de identificar aquellas bandas específicas presentes únicamente en las muestras que contenían eng2-GFP. De esta manera, se comprobó que existían al menos 6 bandas específicas de distintos tamaños (Fig. 53B). Una de ellas correspondía con el tamaño esperado para eng2-GFP (número 3 en la figura), extremo que fue confirmado mediante Western. Para tratar de identificar el resto de las proteínas diferenciales, se cortaron las bandas y se analizaron por MALDI-TOF (Servicio de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca). En la Tabla 1 se muestran aquellas proteínas que fueron identificadas con un valor estadísticamente representativo ($p < 0,05$).

Únicamente la proteína de menor tamaño (numero 6) se consideró relevante para este estudio, ya que correspondía a arpC2, una de las subunidades del complejo arp2/3. Este resultado

| Banda | Código | Score | Descripción |
|-------|---------------|-----------|--|
| 1 | AAU11313 | 103 | AY705913 (gcn2) |
| 1 | T37889 | 86 | probable nuclear pore protein |
| 1 | CAC05730 | 77 | SPBC36B7 (eIF2 alpha kinase gcn2) |
| 1 | T45158 | 60 | pre-mRNA splicing factor prp1 |
| 1 | P78934_SCHPO | 58 | similar to pir:A32950 probable reductase protein |
| 1 | T40048 | 58 | probable oxidoreductase |
| 1 | T50394 | 52 | DNA-directed RNA polymerase subunit |
| 2 | T50210 | 112 | probable ABC transporter |
| 4 | T38127 | 63 | phosphoprotein |
| 4 | T39492 | 60 | hypothetical protein SPBC15D4.16 (splicing factor cwf22) |
| 4 | CWC22_SCHPO | 54 | Pre-mRNA-splicing factor cwc22 |
| 4 | CAA20491 | 52 | SPBC15D4 (splicing factor cwf22) |
| 5 | CAC01521 | 167 | SPBC800 (ribosome biogenesis protein Brx1) |
| 5 | T40235 | 54 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| 6 | T39044 | 55 | probable arp2/3 complex subunit |
| 6 | T43274 | 53 | dynein heavy chain (cytosolic) |

Tabla1.- Proteínas identificadas por MALDI-TOF con un valor estadísticamente representativo ($p < 0,05$).

encaja perfectamente con los resultados descritos anteriormente, que indican que otra de las subunidades de este complejo (arpC5) presentaba un defecto en su localización en el mutante *eng2Δ* (Fig. 40). Además, mediante análisis masivos de interacciones proteicas se ha descrito que en *S. cerevisiae* Eng2 interacciona con proteínas relacionadas con el complejo arp2/3 (Krogan *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2002; Tonikian *et al.*, 2009).

Para tratar de confirmar que realmente existía una interacción entre el complejo arp2/3 y *eng2*, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello se utilizó una cepa que contenía las proteínas arpC5-GFP *eng2*-mCherry y se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-GFP y anti-mCherry. Sin embargo, esta aproximación no tuvo éxito, lo que podría indicar que la interacción entre ambas proteínas es muy transitoria o que la presencia de un epítipo en el complejo arp2/3 debilita la interacción entre estas proteínas. Alternativamente, podría ocurrir que *eng2* sea capaz de interactuar específicamente con arpC2, pero no con todo el complejo arp2/3. Sin embargo, la proteína arpC2 no puede etiquetarse, ya que la adición de cualquier epítipo resulta letal, lo que nos impidió confirmar la interacción física entre *eng2* y arpC2.

Dado que no fue posible demostrar la interacción física entre *eng2* y arpC2, se decidió analizar la localización del complejo arp2/3 y *eng2* simultáneamente, ya que si ambas proteínas interaccionan deberían colocalizar en algún momento del ciclo celular. Para ello se utilizó una cepa en la que la subunidad arpC5 del complejo arp2/3 estaba etiquetada con la GFP (Sirotkin *et al.*, 2005), que fue transformada con el plásmido pJED18 (*eng2*-mCherry). Ambas proteínas eran funcionales y estaban controladas por sus propios promotores. Los primeros ensayos mostraron que la cantidad de parches del complejo arp2/3 (>10 por célula) era muy superior al número de puntos de *eng2* (entre 1-5 por célula). Además, mientras los parches de complejo arp2/3 tenían una vida media de unos 20 segundos (Sirotkin *et al.*, 2005), los puntos de *eng2* estaban presentes a lo largo de todo el ciclo celular. Esto sugería que la interacción entre el complejo arp2/3 y *eng2*, de existir, debería ser transitoria. Por ello, fue necesario utilizar ensayos de “*time-lapse*” para tratar de capturar algún momento en el que *eng2* y arpC5 colocalizaran. Además, ya que la vida media del complejo arp2/3 es muy corta, se decidió adquirir un único plano de cada campo a intervalos muy cortos (cada segundo), capturando alternativamente los dos

canales durante 1-2 minutos. Posteriormente, las distintas series fueron analizadas siguiendo la localización de eng2-mCherry y buscando si había coincidencia espacial con arpC5-GFP. En la Figura 54 se muestran varios ejemplos de la colocalización entre eng2-mCherry y arpC5-GFP. Esta interacción era muy breve, ya que eng2 y arpC5 sólo colocalizaban entre 5 y 10 segundos como promedio antes de que se produjera la disociación. La colocalización entre ambas proteínas solía coincidir con el momento en el que el complejo arp2/3 se desplazaba desde la membrana hacia el interior celular. Durante este periodo eng2-arpC5 se desplazaban una distancia de 0,4-1 μm a una velocidad media de 200 ± 50 nm/s. Estos resultados están en concordancia con los descritos previamente para el complejo arp2/3 (Sirotkin *et al.*, 2005).

8. eng2 forma parte de la cascada de regulación del complejo arp2/3

Como se ha comentado en la Introducción, la activación del complejo arp2/3 es un proceso complejo y altamente dinámico en el que participan diversas proteínas. El modelo actual establece que en primer lugar se produce el ensamblaje de los activadores wsp1 y vrp1 en la membrana celular. Unos tres segundos después, la miosina de Clase I myo1 aparece en esta misma región donde se une a wsp1 y vrp1, formando un complejo activador. El complejo arp2/3 es visible unos seis segundos después, y la interacción con los activadores se mantiene durante unos segundos más, hasta que se produce el desensamblaje de los activadores y el complejo arp2/3 se desplaza hacia el interior celular (Fig. 55A) (Sirotkin *et al.*, 2005).

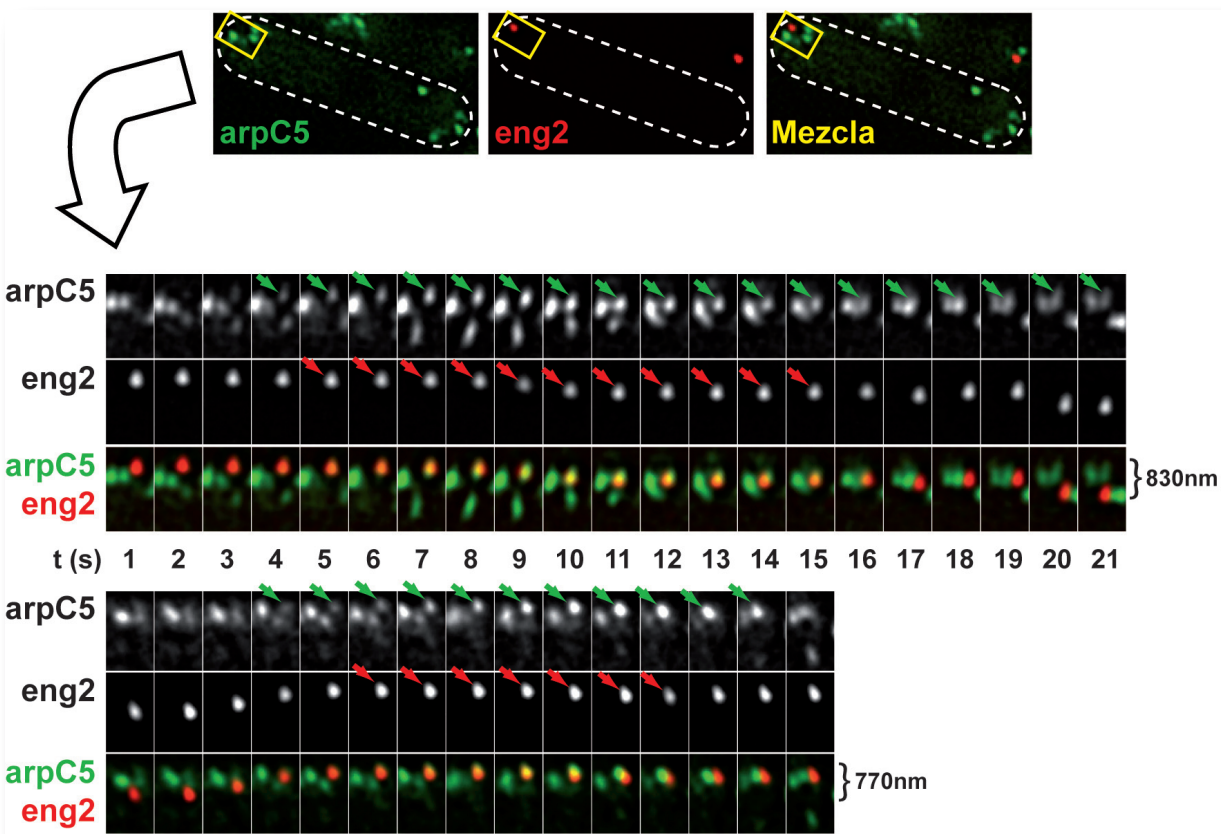


Figura 54.- eng2 y el complejo arp2/3 colocalizan de forma transitoria durante el ciclo vegetativo. Análisis de la cepa eng2-mCherry arpC5-GFP (OL987+pJED18) mediante "time-lapse" (se capturó únicamente el plano central de la célula). El panel superior muestra la localización del arpC5-GFP (izquierda), eng2-mCherry (centro) y la mezcla de ambos canales (derecha). Los paneles inferiores muestran una ampliación de la región indicada con el rectángulo. En todos los casos, las ampliaciones han sido orientadas de tal manera que la membrana plasmática queda en la parte superior de la imagen. Las flechas verdes apuntan a parches del complejo que se están nucleando, mientras que las flechas rojas indican los momentos en los que existe una colocalización de eng2 y arpC5.

Para determinar en qué momento de este proceso se producía la interacción entre *eng2* y el complejo *arp2/3*, se construyó la cepa OL989, que contenía la subunidad *arpC5* etiquetada con la proteína fluorescente cian (*arpC5*-CFP), la proteína de la familia WASP *wsp1* fusionada a la proteína fluorescente amarilla (*wsp1*-YFP) y *eng2* marcada con una versión de la proteína fluorescente roja (*eng2*-mCherry). Las tres proteínas se encontraban bajo el control de sus respectivos promotores, aunque las construcciones *arpC5*-CFP y *wsp1*-YFP estaban integradas en el genoma y *eng2*-mCherry estaba en un plásmido (pJED18). Esta cepa fue analizada también mediante ensayos de “*time-lapse*”, capturando los tres canales independientemente

en un único plano por cada campo a intervalos muy cortos (cada 2,5 segundos). El análisis de las imágenes capturadas permitió determinar la secuencia temporal de interacción de estas tres proteínas. Así, la proteína *wsp1* aparecía en la membrana inmediatamente antes que el complejo *arp2/3*. Posteriormente aparecía *arpC5*, que colocalizaba con *wsp1* durante unos segundos hasta que ésta se desvanecía, y el complejo se desplazaba hacia el interior. Durante las primeras etapas de este proceso, *eng2* solapaba parcialmente con *wsp1* y *arpC5*. Una vez que *wsp1* se desensamblaba y *arpC5* comenzaba su desplazamiento, *eng2* colocalizaba de forma precisa con *arpC5*, acompañándola en su movimiento hacia el interior de la célula. Pasados

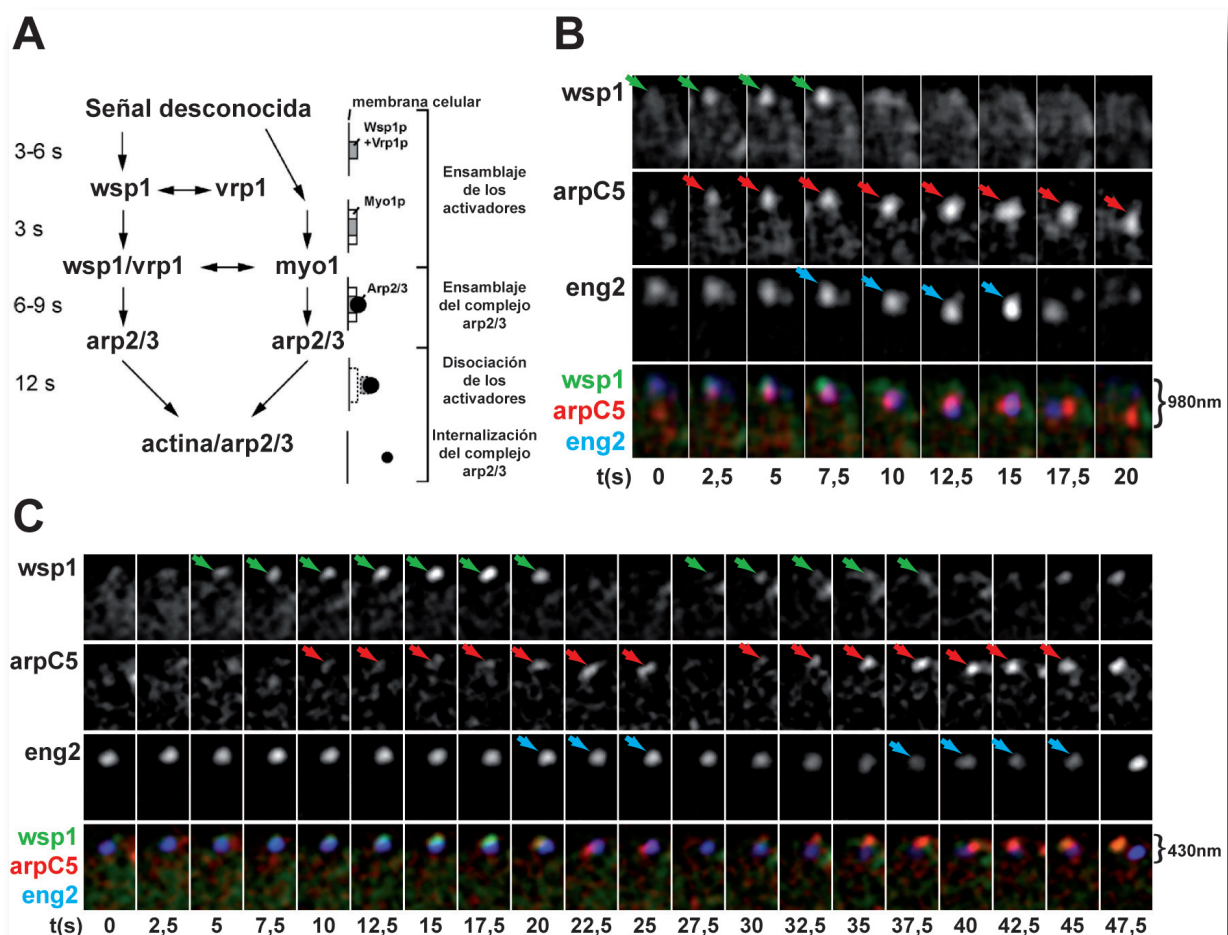


Figura 55.- Localización de *eng2* dentro de la cascada de señalización del complejo *arp2/3*. **A.** Modelo propuesto para la activación e internalización del complejo *arp2/3* en *S. pombe* (Tomado de Sirotkin *et al.*, 2005). **B.** Análisis de la cepa *wsp1*-YFP *arpC5*-CFP *eng2*-mCherry (OL989) mediante “*time-lapse*” (se capturó el plano central cada 2,5 segundos). **C.** Ejemplo de otro campo, mostrando la interacción secuencial de *eng2* con varios parches de *arpC5*. En **B** y **C**, los paneles muestran ampliaciones de la región próxima a la membrana, orientadas de tal manera que la membrana plasmática está en la parte superior de cada imagen. Se muestran los tres canales independientes y su mezcla, en la que se ha coloreado *wsp1* en verde, *arpC5* en rojo y *eng2* en azul. Las flechas verdes indican los tiempos en los que es visible la proteína *wsp1*, las flechas rojas indican los tiempos en los que es visible *arpC5* y las flechas azules indican el tiempo de interacción entre *eng2* y *arpC5*.

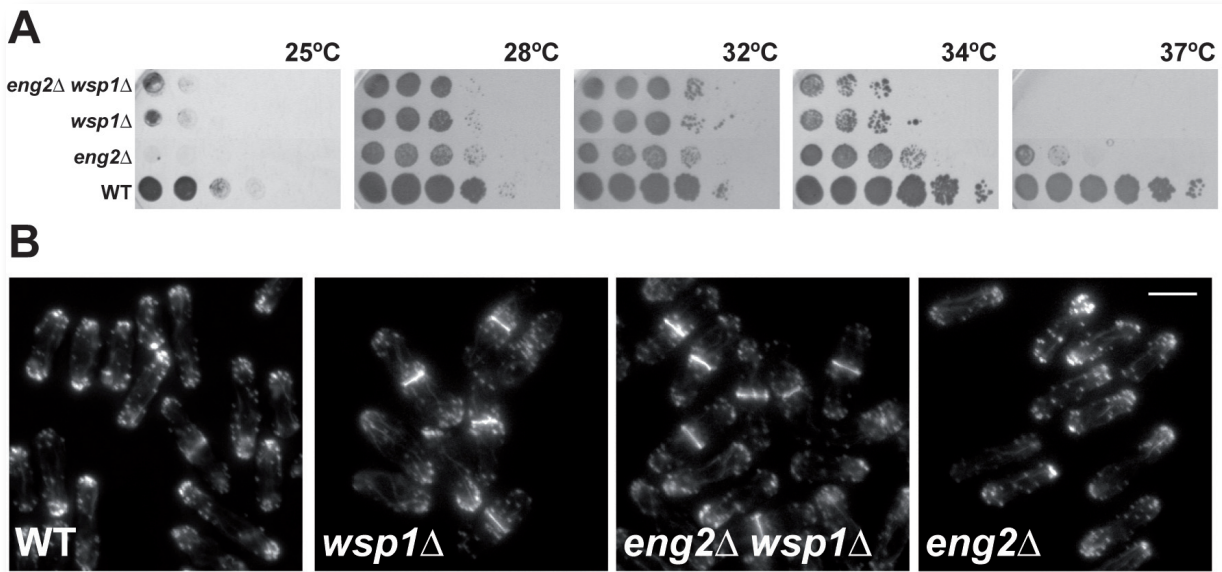


Figura 56.- Relación funcional entre *eng2* y *wsp1*. **A.** Ensayo de crecimiento en placa (medio mínimo). Diluciones seriadas de las cepas *eng2*Δ (OL773), *wsp1*Δ (OL916) y el mutante doble *wsp1*Δ *eng2*Δ (OL907) se incubaron a distintas temperaturas durante 5-7 días. **B.** Tinción del citoesqueleto de actina de las cepas *eng2*Δ (OL773), *wsp1*Δ (OL916) y el mutante doble *wsp1*Δ *eng2*Δ (OL907). Se muestran imágenes representativas del patrón general de organización del citoesqueleto de actina en cada cepa teñidas con faloidina-Alexa-Fluor488. Barra de escala, 5 μm.

unos segundos, *arpC5* y *eng2* se separaban (Fig. 55B). Además, se pudo comprobar que *eng2* tenía la capacidad de actuar de forma secuencial sobre distintos parches del complejo *arp2/3*. Como se puede apreciar en la Figura 55C, el mismo punto de *eng2* colocaliza sucesivamente con dos parches de *arpC5* que se generan en zonas próximas de la membrana (las distancias recorridas y velocidades de desplazamiento eran similares a las descritas anteriormente). Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó otro de los activadores del complejo, la proteína *myo1* (datos no mostrados). Estos resultados, por tanto, indican que la función de *eng2* se localiza temporalmente después de la activación del complejo *arp2/3* por *wsp1*, y parece participar en la internalización del complejo.

Para confirmar si *eng2* se encontraba funcionalmente en la misma ruta que *wsp1*, se construyó el mutante doble *wsp1*Δ *eng2*Δ. El mutante *wsp1*Δ presenta un citoesqueleto de actina desorganizado con parches despolarizados y un elevado número de células con anillos, lo cual genera células con morfologías aberrantes. Además, en medio mínimo forma colonias más pequeñas que la cepa silvestre, es sensible a KCl y conjuga de manera ineficiente (Lee *et al.*,

2000). Cuando se analizó el crecimiento en medio sólido a distintas temperaturas, se comprobó que el crecimiento del mutante *wsp1*Δ *eng2*Δ era similar al del mutante simple *wsp1*Δ (Fig. 56A). Además, la organización del citoesqueleto de actina del mutante *wsp1*Δ *eng2*Δ era muy similar a la del mutante *wsp1*Δ, con un citoesqueleto desorganizado y un elevado porcentaje de anillos de actomiosina (Fig. 56B). Estos resultados indican que *eng2* podría actuar en la misma ruta que *wsp1*.

De manera conjunta, todos estos resultados indican que *eng2* interacciona brevemente con el complejo *arp2/3*, y que esta interacción tiene lugar después de que se haya producido la activación del mismo.

Una segunda aproximación para establecer la posición de *eng2* en esta cascada fue estudiar la secuencia de interacciones entre el complejo *arp2/3*, *crn1* y *eng2*. La coronina (*crn1*) ha sido relacionada con la inactivación del complejo *arp2/3* y el reciclaje de la actina (Gandhi *et al.*, 2009; Rodal *et al.*, 2005b). Estudios recientes apuntan a que la proteína *crn1* es una de las últimas en aparecer durante el ensamblaje de los parches de actina, lo que concuerda con su

función en la inactivación del complejo arp2/3 y el reciclaje de la actina (Pollard T.D., comunicación personal). Por ello, se construyó la cepa arpC5-CFP crn1-YFP eng2-mCherry, para poder estudiar su dinámica e interacciones a lo largo del tiempo. Esta cepa se analizó de forma similar a la anterior, capturando imágenes de los tres canales en un único plano por campo a lo largo del tiempo con un intervalo entre imágenes de 3 segundos. Los resultados obtenidos permiten concluir que la interacción entre arpC5 y eng2 ocurre antes de que se detecte la presencia de crn1, como puede comprobarse en los ejemplos mostrados en la Figura 57. Además, la interacción de eng2 y crn1 con arpC5 parece ser excluyente, de tal manera que arpC5 y crn1 sólo son capaces de colocalizar de forma precisa después de que se ha producido la separación de eng2 y el complejo arp2/3.

En conjunto, los resultados presentados en este apartado parecen relacionar directamente a eng2 con la dinámica de los parches de actina,

situando temporalmente su función después de que los activadores se han disociado del complejo arp2/3, pero antes de que se una la coronina a dicho complejo.

9. La movilidad del complejo arp2/3 depende de eng2

Todos los datos anteriores indican que la proteína eng2 podría participar en la regulación del complejo arp2/3. Ya que eng2 localiza con arpC5 cuando ésta se mueve desde la membrana hacia el interior de la célula, una posibilidad es que eng2 fuera necesaria para este desplazamiento. Si esta hipótesis fuera cierta, cabría esperar que en el mutante *eng2Δ* el movimiento del complejo arp2/3 hacia el interior del citoplasma estuviera comprometido. Para comprobar si esta hipótesis era cierta, se eliminó el gen *eng2⁺* en la cepa arpC5-CFP wsp1-YFP (*arpC5-CFP wsp1-YFP eng2Δ*), y se analizó la dinámica de ambas proteínas en comparación con la cepa parental

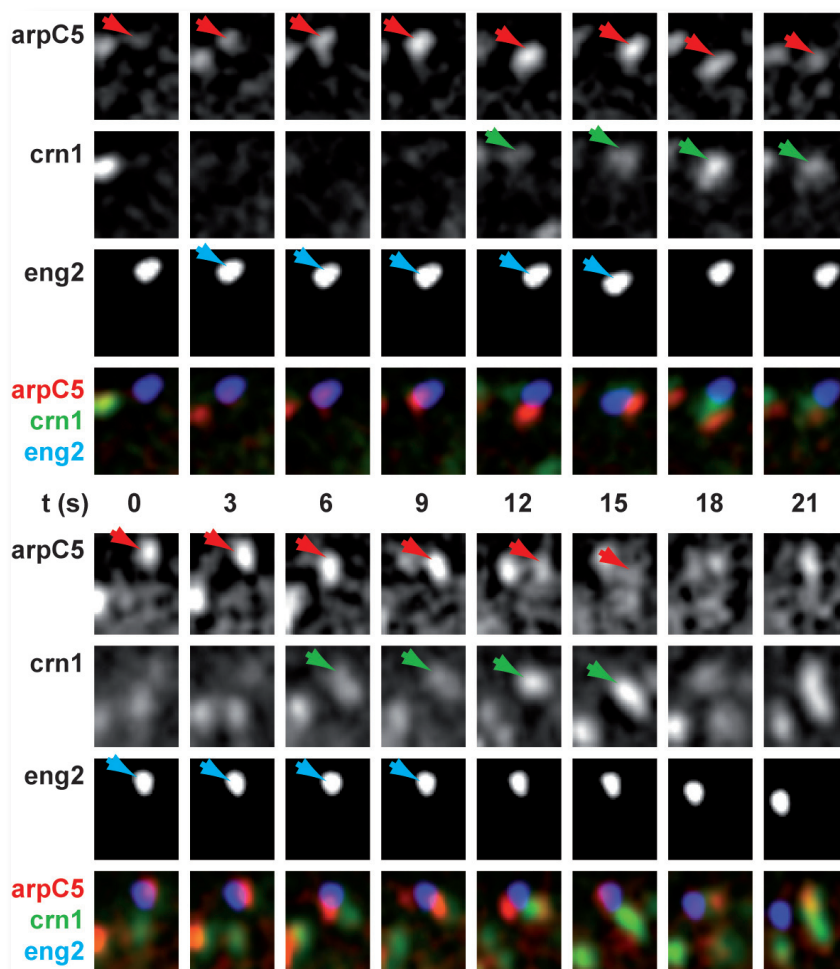


Figura 57.- eng2 interactúa con el complejo arp2/3 antes que la coronina. Análisis de la cepa *crn1-YFP arpC5-CFP eng2-mCherry* (OL1003) mediante "time-lapse" (se capturó un único plano cada 3 segundos). Se muestran dos ejemplos diferentes de la interacción temporal de las tres proteínas. Los paneles muestran ampliaciones de la región próxima a la membrana, orientadas de tal manera que la membrana plasmática queda en la parte superior de cada imagen. Se muestran los tres canales independientes y su mezcla, en la que se ha coloreado crn1 en verde, arpC5 en rojo y eng2 en azul. Las flechas verdes indican los tiempos en los que es visible la proteína crn1, las flechas rojas indican los tiempos en los que es visible arpC5 y las flechas azules indican el tiempo de interacción entre eng2 y arpC5.

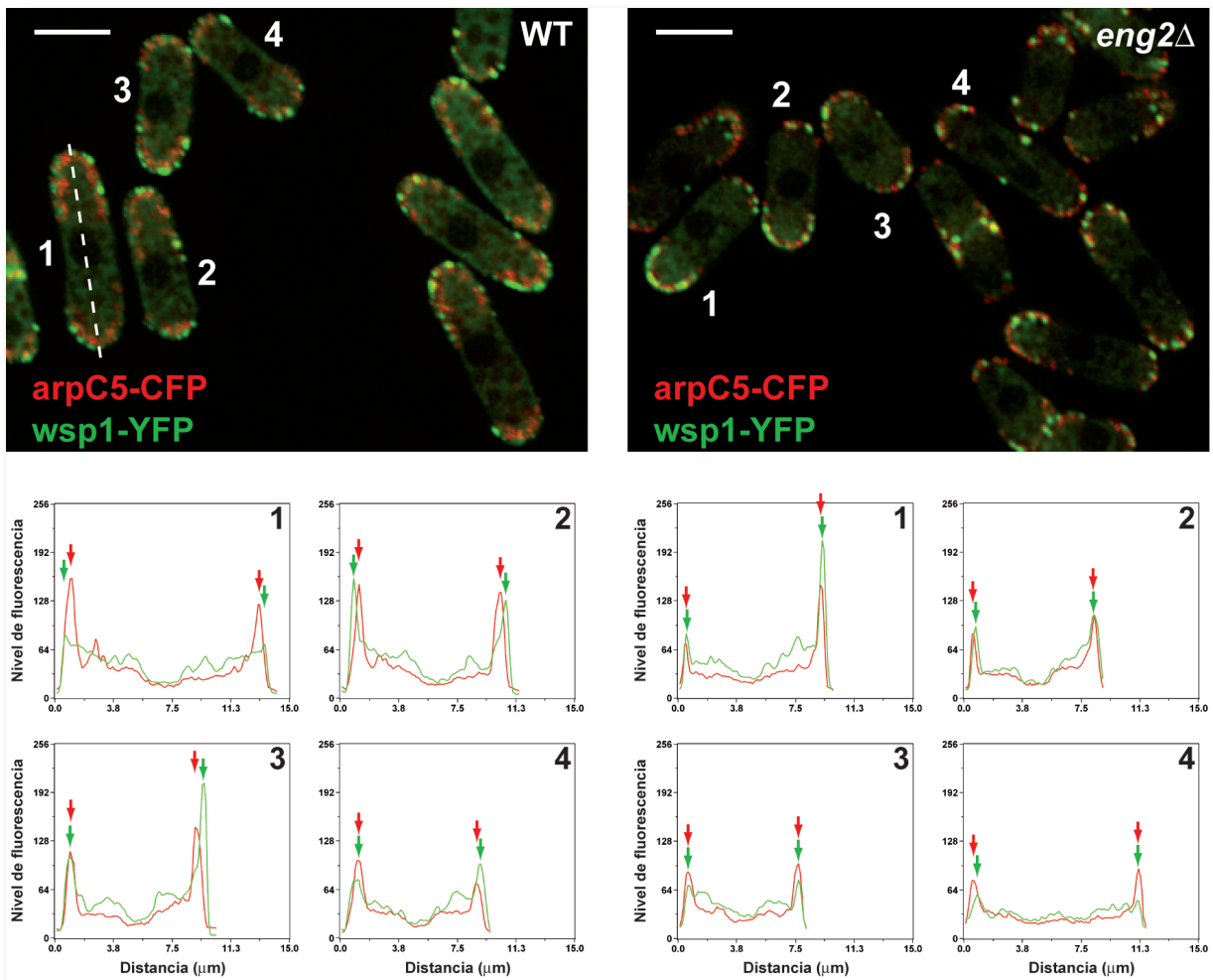


Figura 58.- La movilidad del complejo arp2/3 depende de eng2. Las cepas arpC5-CFP wsp1-YFP (OL988) y arpC5-CFP wsp1-YFP *eng2*Δ (OL1053) fueron analizadas mediante experimentos de “time-lapse”, capturando un único plano cada 1,5 segundos. En las imágenes se muestra la proyección temporal de uno de los experimentos, en la que la señal de arpC5-CFP se ha cargado en el canal rojo y la de wsp1-YFP en el verde. Barra de escala, 5 μm. Los paneles inferiores muestran las gráficas de la intensidad de la fluorescencia de cada uno de los canales a lo largo del eje mayor (línea punteada del panel superior) de las células señaladas en la foto. Las flechas verdes indican la máxima fluorescencia de la proteína wsp1-YFP, mientras que las flechas rojas apuntan a la máxima fluorescencia de la proteína arpC5-CFP.

(arpC5-CFP wsp1-YFP *eng2*⁺). En este caso, se hicieron experimentos de “time-lapse” capturando independientemente cada uno de los canales en el plano medio de la célula cada segundo. Ya que el ensamblaje y desensamblaje de estas dos proteínas es muy rápido, como primera aproximación para comprobar si existían defectos en el mutante *eng2*Δ utilizamos de nuevo la proyección temporal, para condensar toda la información sobre la localización de wsp1 y arpC5 en una única imagen. En estas imágenes, se cargó la señal de wsp1-YFP en el canal verde y la de arpC5-CFP en el rojo. El análisis indicó que la localización de wsp1 era similar en ambas cepas, quedando la fluorescencia verde

asociada a la membrana en todo momento. Por el contrario, existían defectos en la localización del complejo arp2/3 en el mutante *eng2*Δ con respecto a la cepa control. Así, mientras que en la cepa *eng2*⁺ se pudo observar que la fluorescencia correspondiente a arpC5 se localizaba en la membrana y se internalizaba ligeramente en el citoplasma, en la cepa *eng2*Δ la señal de arpC5 y wsp1 solapaban en los bordes celulares al lado de la membrana plasmática (Fig. 58, paneles superiores). Para cuantificar estos resultados, se analizó la intensidad de la señal de fluorescencia a lo largo de la célula con el programa MetaMorph. En ambas cepas, wsp1 estaba localizada en la periferia celular (asociada a la membrana

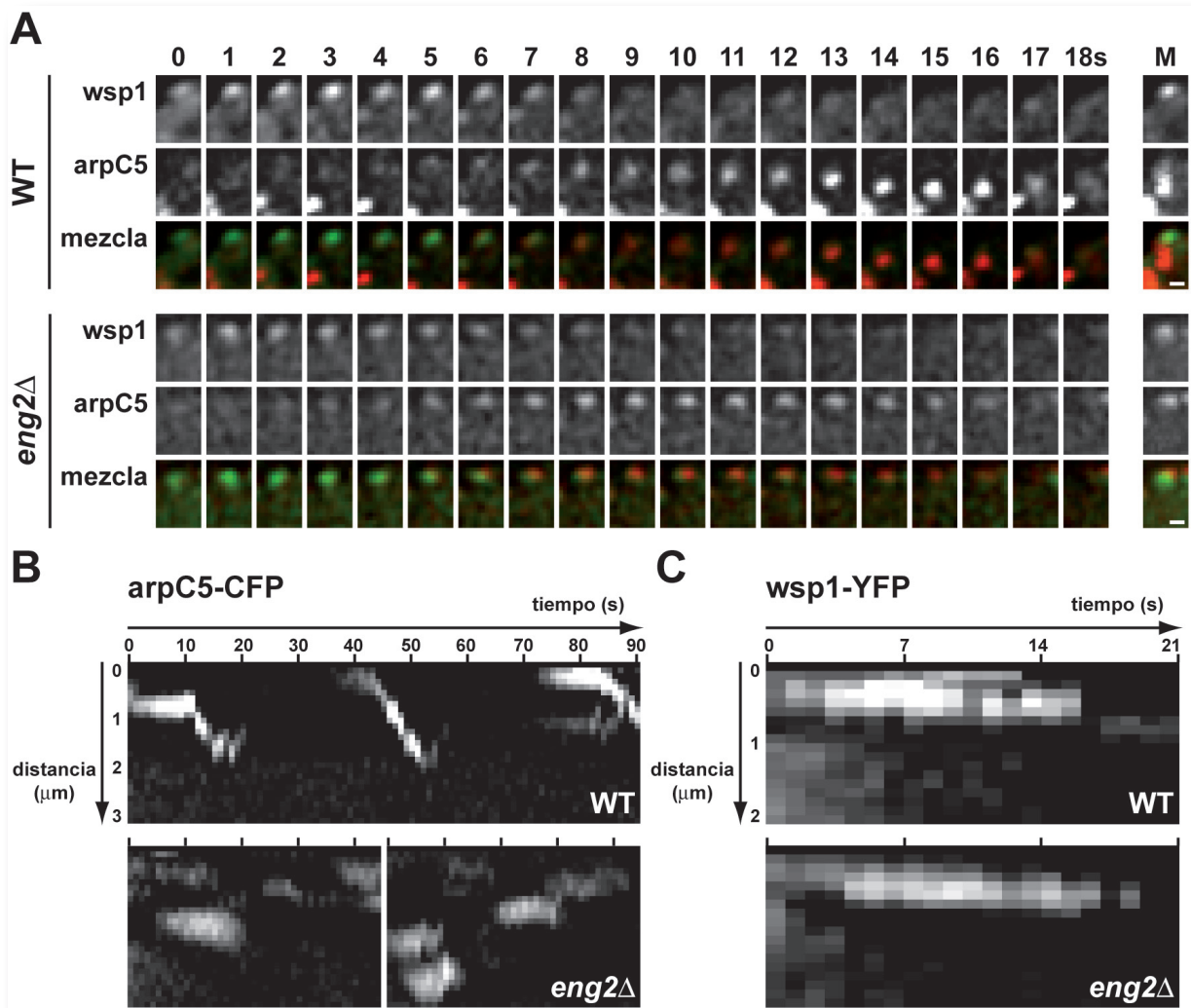


Figura 59.- La vida medida del complejo arp2/3 depende de eng2. **A.** Las imágenes de la Figura 58 fueron utilizadas para estudiar el comportamiento de los parches de *wsp1* y *arpC5* en la cepa silvestre y el mutante *eng2Δ*. Cada uno de los paneles muestra la localización de *wsp1*, *arpC5* y la mezcla de ambos canales para la cepa silvestre y el mutante *eng2Δ*. A la derecha se muestra la proyección máxima de todas las imágenes del ensayo (rojo = *arpC5*; verde = *wsp1*). Barra de escala, 0,5 μm. **B** y **C.** Quimografías de *arpC5* (**B**) y *wsp1* (**C**) en la cepa silvestre y el mutante *eng2Δ* generadas con el programa Metamorph. El eje x representa la información temporal (cada pixel es un segundo) mientras que el eje y contiene la información espacial (en μm).

plasmática). En las células silvestres, el pico de la señal de *arpC5* se encontraba desplazado hacia el interior celular en la mayoría de las células (por dentro del pico de *wsp1*); por el contrario, en el mutante *eng2Δ*, el pico de fluorescencia de *arpC5* solapaba con el de *wsp1* (Fig. 58, paneles inferiores), indicando un defecto en su movimiento hacia el interior del citoplasma. El recuento de estos resultados mostró que este defecto era bastante severo, ya que en el mutante *eng2Δ* tan sólo el 25% de las células mostraban un desplazamiento del complejo arp2/3 hacia el interior celular frente al 90% en la cepa silvestre ($n \geq 40$ células).

Los resultados anteriores indicaban la existencia de un defecto a nivel global en el desplazamiento del complejo arp2/3 al interior del citoplasma. Para confirmar estas observaciones, se analizó el ensamblaje y desensamblaje de algunos parches de *arpC5* de manera individual. En la Figura 59A se muestra un ejemplo del comportamiento de uno de ellos en la cepa silvestre y en el mutante *eng2Δ*. Como puede observarse, en la cepa silvestre *arpC5* presenta el comportamiento descrito anteriormente, es decir, se ensambla en la membrana junto a *wsp1* y se mueve hacia el interior del citoplasma una vez que el activador ha desaparecido.

Por el contrario, en la cepa *eng2Δ* no existe tal movimiento hacia el interior de la célula, sino que la fluorescencia va decayendo lentamente tras producirse la desaparición de *wsp1*. En este análisis de parches individuales parecía que la vida media del complejo arp2/3 (el tiempo en que era visible la fluorescencia de arpC5) era ligeramente inferior en la cepa *eng2Δ* que en la silvestre. Para analizar con más detalle este aspecto, se generaron quimografías de *wsp1* y arpC5 en la cepa silvestre y el mutante. La quimografía es una representación gráfica de una posición espacial a lo largo del tiempo, lo que permite analizar fácilmente la vida media de los distintos complejos o su movimiento espacial. Este análisis nos permitió determinar que la vida media del complejo arp2/3 era inferior en el mutante *eng2Δ*. Así, mientras que en la cepa silvestre la vida media del complejo era de $17,5 \pm 2,2$ s ($n = 15$ parches), en el mutante *eng2Δ* esta vida media estaba reducida a $12,5 \pm 2,8$ s ($n = 15$ parches) (Fig. 59B). Además, en este análisis también se puede comprobar claramente que arpC5 es incapaz de desplazarse al interior de la célula en ausencia de la proteína *eng2*. Por el contrario, la vida media y la dinámica de *wsp1* no estaban afectadas por la delección de *eng2*⁺ (Fig. 59C).

En conjunto, estos resultados indican que *eng2* está implicado en la estabilidad y movimiento del complejo arp2/3 hacia el interior de la célula una vez que se ha disociado de sus activadores.

10. *eng2* participa en los procesos de endocitosis en *S. pombe*

La pérdida de funcionalidad del complejo arp2/3 ha sido relacionada con defectos en endocitosis (Daugherty y Goode, 2008; Moseley y Goode, 2006; Pollard, 2007; Schaerer-Brodbeck y Riezman, 2000). Como se ha mostrado anteriormente, el mutante *eng2Δ* es defectivo en el movimiento del complejo arp2/3 hacia el interior celular, por lo que se planteó la hipótesis de que también presentara un bloqueo o retraso en la endocitosis. Para estudiar esta posibilidad, se llevaron a cabo ensayos de

endocitosis usando el colorante FM4-64, que tiñe los esteroides de membrana o “*lipid-rafts*” y puede ser endocitado (Gachet y Hyams, 2005; Wachtler y Balasubramanian, 2006; Wachtler *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009). Ambas cepas, silvestre y mutante *eng2Δ*, se incubaron con FM4-64 y se siguió el proceso de internalización del colorante a lo largo del tiempo mediante ensayos de “*time-lapse*” en el microscopio de fluorescencia (ver Materiales y Métodos). En la cepa silvestre, era posible comenzar a ver pequeños endosomas al cabo de 1-2 minutos, que aumentaban en tamaño y número a medida que transcurría el tiempo (Fig. 60A). Este no fue el caso del mutante *eng2Δ*, en el que la formación de endosomas parecía estar retrasada, y sólo en algunos casos se pudieron observar, aunque eran más pequeños y menos abundantes que en la cepa silvestre (Fig. 60B).

Ya que el proceso de endocitosis es muy rápido y la preparación de las muestras requiere un cierto tiempo antes de poder ser analizadas en el microscopio, los resultados anteriores no se consideraron definitivos, pues el tiempo empleado en la preparación de las muestras podría haber sido diferente en cada cepa. Para analizar la endocitosis del mutante *eng2Δ* en relación con la silvestre en idénticas condiciones, se utilizó una cepa silvestre que contenía etiquetada la proteína cut11 con GFP. La proteína cut11-GFP es completamente funcional y no está relacionada de forma directa con los procesos de endocitosis. De esta forma, era posible mezclar células silvestres y mutantes en el mismo ensayo y diferenciarlas al microscopio, permitiendo un análisis de ambas cepas en las mismas condiciones. Así, las cepas cut11-GFP y *eng2Δ* se inocularon en las mismas condiciones hasta crecimiento exponencial ($DO = 0,8$), se tomó 1 ml de cada una y se mezclaron en un tubo, se incubaron con FM4-64 y se siguió su evolución a lo largo del tiempo. A los 5 minutos, en la cepa cut11-GFP se observaron endosomas bien formados y relativamente abundantes, mientras, la cepa *eng2Δ* apenas presentaba endosomas (Fig. 61A). Además, otra peculiaridad observada fue el hecho de que mientras en la cepa silvestre la tinción con FM4-64 se limitaba a la región de los polos, en el mutante *eng2Δ* esta

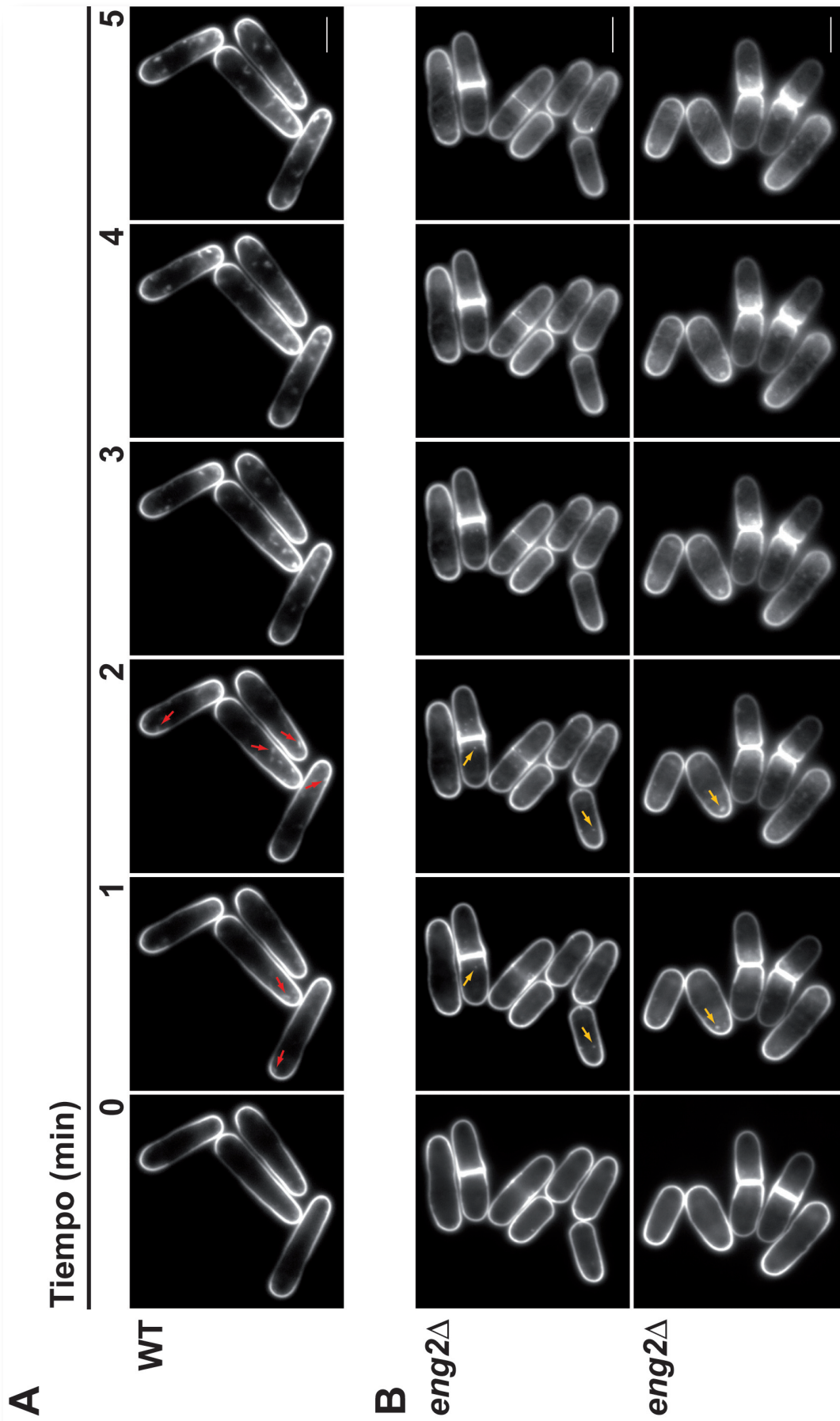


Figura 60.- eng2 participa en los procesos de endocitosis en *S. pombe*. Ensayos de endocitosis mediante tinción con FM4-64 y "time-lapse" en el microscopio de fluorescencia. **A.** Endocitosis en la cepa silvestre. Las flechas rojas indican los lugares de formación de endosomas. **B.** Endocitosis en la cepa *eng2 Δ* (se muestran dos ensayos independientes). Las flechas amarillas indican los lugares de formación de endosomas. Barra de escala, 5 μ m.

tinción era más homogénea alrededor de toda la célula (Fig. 61B). Este hecho apuntaba a una posible deslocalización de los “lipid-rafts” en el mutante *eng2Δ*. Para confirmar este resultado se repitió el experimento anterior, pero en este caso la tinción se llevó a cabo con filipina. La filipina también tiñe los “lipid-rafts”, pero no se endocita tan fácilmente. El resultado fue similar al obtenido con el FM4-64, con una tinción más homogénea a lo largo de la célula en el mutante *eng2Δ*, mientras que en el silvestre la tinción se concentraba en los polos (Fig. 61C). Para cuantificar este defecto, se analizó la intensidad de fluorescencia en la región central de la célula. Mientras que en el silvestre apenas se detecta fluorescencia, el mutante *eng2Δ* presenta unos niveles de fluorescencia claramente detectables (Fig. 61D). Para tratar de concluir si este defecto era un bloqueo o un retraso en la endocitosis, se realizaron nuevas

tinciones con FM4-64 a tiempos más largos. Se pudo comprobar que a tiempos largos, tanto la cepa silvestre como el mutante *eng2Δ* formaban endosomas, aunque éstos parecían más grandes y abundantes en el silvestre (Fig. 62A). En ambas cepas se pudo observar tinción en la membrana vacuolar, indicando que pasos posteriores del proceso de endocitosis no estaban afectados.

Dado que la delección del gen *eng2+* provocaba un retraso en la endocitosis, la sobre-expresión del mismo podía ocasionar algún tipo de efecto en este proceso. Para analizar esta posibilidad se utilizó la cepa OL984, en la que *eng2+* estaba bajo el control de un promotor reprimible por tiamina (P_{nmt1+} , versión 3x). Se sobreexpresó el gen durante unas 20-22 horas antes realizar los ensayos de endocitosis. A tiempos cortos (1-5 minutos) no mostró diferencia alguna con

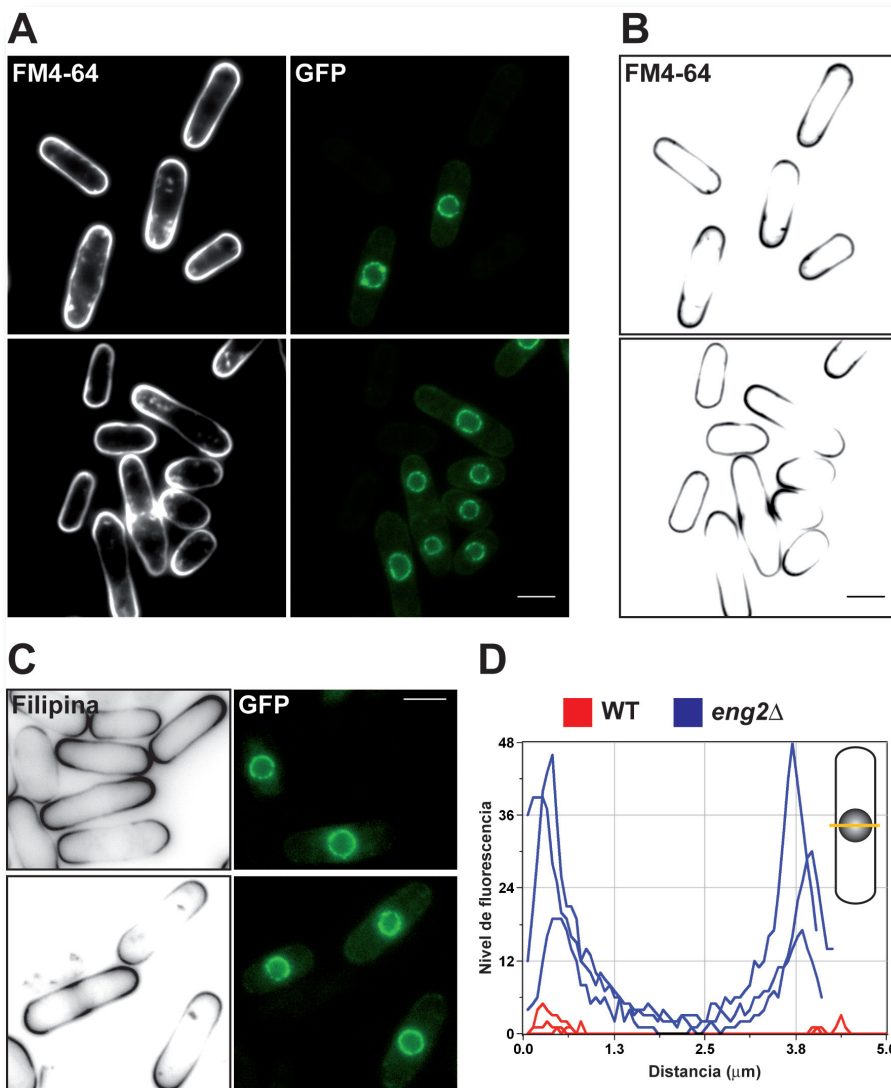


Figura 61.- La delección de *eng2+* afecta a la endocitosis y a la organización de los esteroides de membrana o “lipid-rafts”. Patrón de endocitosis de la cepa silvestre (OL925, cut11-GFP) y el mutante *eng2Δ* (OL759) analizados en idénticas condiciones. Células de ambas estirpes se mezclaron en un tubo y se tiñeron con FM4-64. **A.** Imágenes tras 5 minutos de incubación con FM4-64. A la derecha se muestra una imagen de fluorescencia para diferenciar ambas cepas. **B.** Localización de los “lipid-rafts” mediante tinción con FM4-64 (tiempo 0). **C.** Localización de los “lipid-rafts” mediante tinción con Filipina. A la izquierda se muestra la tinción tras 1 minuto de incubación con Filipina y a la derecha una imagen de fluorescencia. Barra de escala, 5 μm. **D.** Análisis de la intensidad de fluorescencia de las células en el eje menor (MetaMorph).

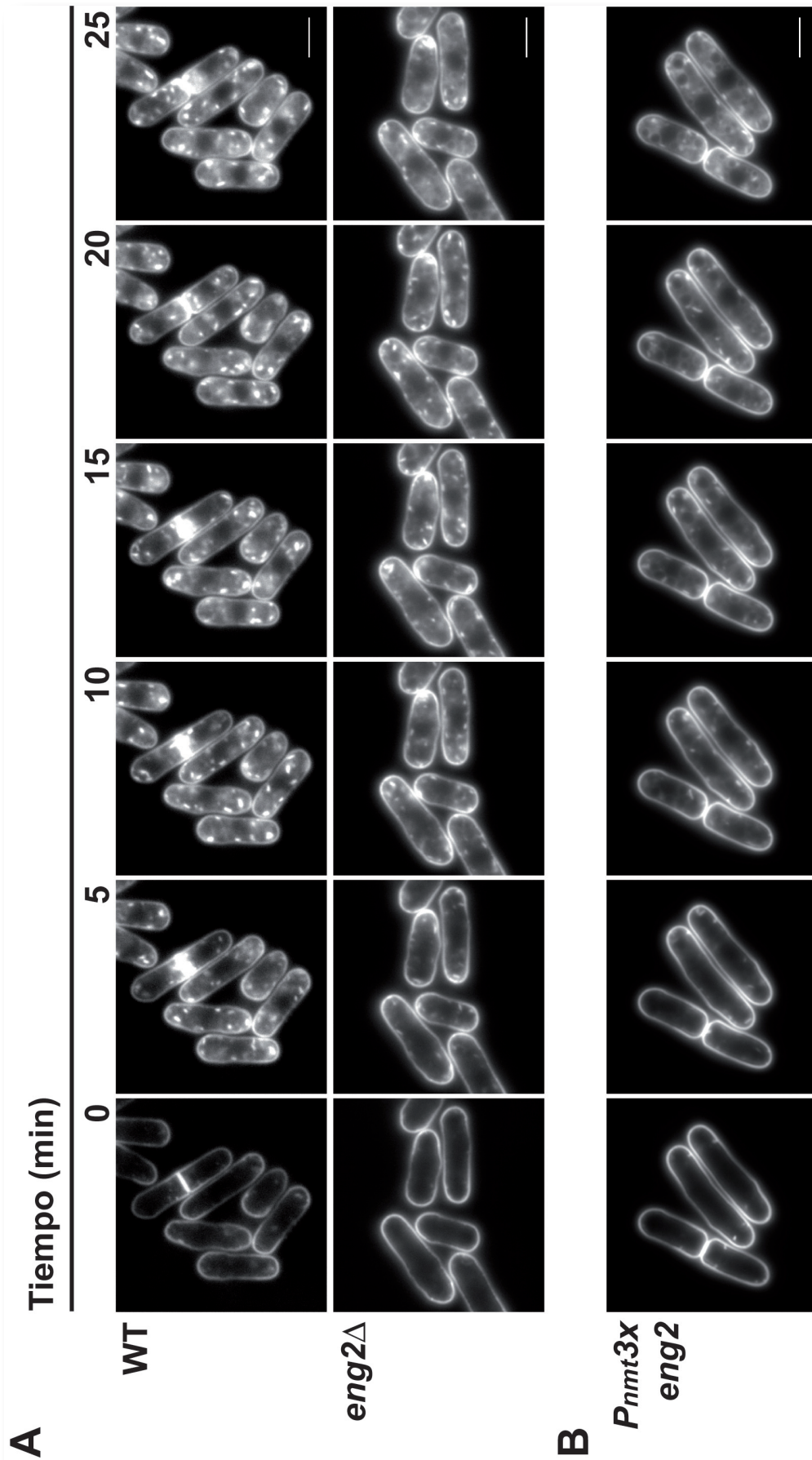


Figura 62.- La delección de *eng2*⁺ retrasa la endocitosis aunque no la bloquea completamente. A. Las cepas OL177 (WT) y OL759 (*eng2Δ*) se tiñeron con FM4-64 y se analizó la internalización del colorante a lo largo del tiempo en el microscopio de fluorescencia. **B.** Experimento similar utilizando la cepa que sobre-expresa el gen *eng2*⁺ (*P_{nmt3x} eng2*, OL984). Barra de escala, 5 μ m.

respecto al silvestre. A tiempos más largos, en la cepa que sobreexpresaba *eng2*⁺ parecía que el colorante llegaba antes a la membrana vacuolar (Fig. 62B).

En conjunto, todos estos datos indican que la proteína *eng2* interviene en los procesos de endocitosis, quizás por su efecto sobre la movilidad del complejo *arp2/3*. Además, la ausencia de *eng2* conlleva un retraso en estos procesos y la desorganización de los esteroides de membrana o “*lipid-rafts*”.

Se ha descrito que en *S. pombe* los mutantes de endocitosis conocidos, como *end4Δ* o *btn1Δ*, presentan algunos defectos característicos, como

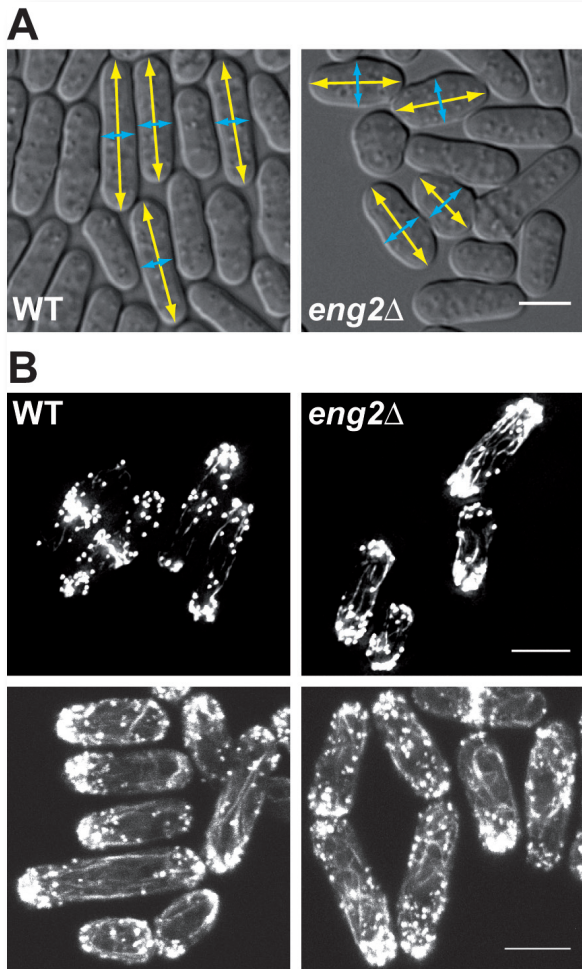


Figura 63.- El mutante *eng2Δ* presenta fenotipos característicos de los mutantes de endocitosis en *S. pombe*. **A.** Detalle de la morfología de las células de *S. pombe* en una cepa silvestre (WT) y el mutante *eng2Δ*. La longitud y anchura celular se representan mediante flechas amarillas y azules, respectivamente. **B.** Detalle de la organización de los cables de actina. Las imágenes superiores muestran células fijadas y teñidas con faloidina-Alexa-Fluor488; las imágenes inferiores corresponden a células vivas que contienen la proteína CHD-rng2-GFP. Barra de escala, 5 μ m.

la disminución de su longitud y el aumento en la anchura celular (Castagnetti *et al.*, 2005; Codlin *et al.*, 2008; Iwaki *et al.*, 2004). Por ello, se decidió comprobar si esto era cierto para el mutante *eng2Δ*. En la Figura 37A ya se mostró que la delección de *eng2*⁺ produce células ligeramente más cortas que las del silvestre, por lo que en este caso se analizó la anchura de las mismas (Fig. 63A). Así, mientras que las células silvestres tenían una anchura promedio de $3,18 \pm 0,19 \mu\text{m}$ ($n = 40$ células), en las células *eng2Δ* éste era de $3,7 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ($n = 40$ células). Otro defecto relacionado con los mutantes de endocitosis en levaduras es la desorganización del citoesqueleto de actina. Concretamente, una desorientación y aumento en el número de los cables de actina (Castagnetti *et al.*, 2005; Daugherty y Goode, 2008; Iwaki *et al.*, 2004; Schaerer-Brodbeck y Riezman, 2000). Con objeto de determinar si este defecto también estaba presente en el mutante *eng2Δ*, se realizaron tinciones con faloidina conjugada con Alexa-Fluor488 y ensayos de localización de la proteína GFP-CHD-rng2. Los cables de actina en *S. pombe* son nucleados por la formina for3, y discurren de forma más o menos longitudinal de polo a polo (Fig. 63B, panel izquierdo). En el mutante *eng2Δ* la morfología de los cables difiere respecto a un silvestre, siendo más abundantes, desorganizados y con morfologías aberrantes (Fig. 63B, panel derecho). Para tratar de amplificar este defecto se empleó el mutante *arp5Δ*. La proteína *arp5* forma parte del complejo INO80, implicado en procesos de transcripción, replicación y reparación del DNA (Conaway y Conaway, 2009). En *S. pombe*, el mutante *arp5Δ* presenta entre 5-7 veces más actina que la cepa silvestre (Fig. 64A), esta peculiaridad fue utilizada para tratar de ver los defectos del mutante *eng2Δ* de forma más clara. Para ello se construyó el mutante doble *eng2Δ arp5Δ*, y como controles se utilizaron los mutantes *eng2Δ*, *arp5Δ* y la cepa silvestre. El resultado de la tinción de actina reveló que el mutante *arp5Δ* presentaba cables muy aparentes y parches muy brillantes (Fig. 64B), similar a lo observado en *S. cerevisiae* (Bonangelino *et al.*, 2002). El mutante *eng2Δ arp5Δ* también presentaba un citoesqueleto de

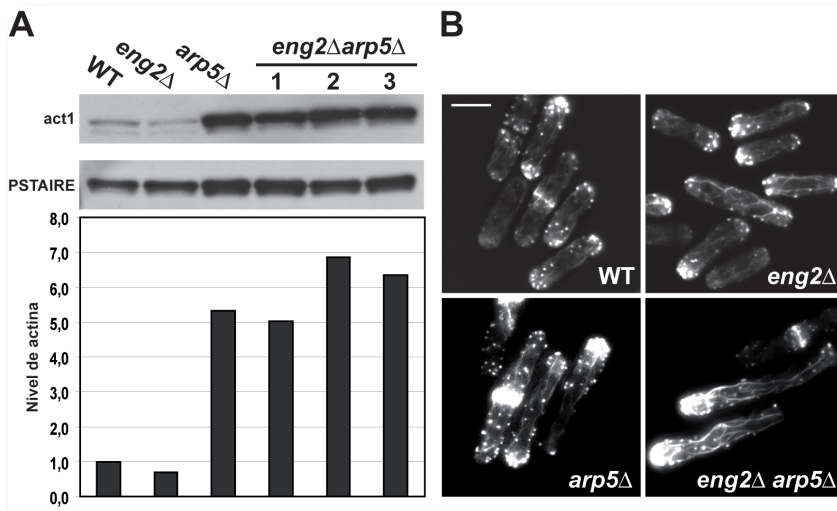


Figura 64.- Amplificación del defecto en la organización de los cables de actina en el mutante *eng2Δ*. **A.** En el panel superior se muestra un ensayo tipo Western de las cepas silvestre (OL023), *arp5Δ* (OL903), *eng2Δ* (OL024) y tres clones independientes del doble mutante *arp5Δ eng2Δ* (OL904, OL905, OL906). Los anticuerpos utilizados fueron anti-actina (arriba) y anti-*cdc2* (abajo). En la parte inferior se muestra un gráfico normalizado de los niveles de actina en cada una de las cepas. **B.** Tinción del citoesqueleto de actina con faloidina-Alexa-Fluor488. Se muestra una imagen representativa del patrón general de organización de la actina en cada cepa. Barra de escala, 5 μm.

actina desorganizado, pero en este caso los cables presentaban un nivel de desorganización mayor (Fig. 64B). La cepa silvestre y el mutante *eng2Δ* presentaban un fenotipo similar al observado en ocasiones anteriores (Fig. 64B).

Todos estos fenotipos, apoyan la teoría de que las proteínas *eng2* y *lsb1* forman parte de un complejo implicado en la regulación de la morfología celular, la endocitosis y la organización del citoesqueleto de actina.

CAPÍTULO II: La β -glucanasa eng2 es necesaria después de esporulación para la lisis de la pared del asca en la levadura de fisión *S. pombe*

La β -glucanasa eng2 es necesaria para la disolución de la pared del asca durante el proceso de esporulación en *S. pombe*

Antecedentes

Según se ha comentado en apartados anteriores, muy poca era la información de que se disponía al comienzo de este trabajo sobre la proteína eng2 en los distintos “organismos modelo”. Nuestro conocimiento se limitaba a dos conceptos; por un lado, que en *S. cerevisiae* se había descrito como una proteína citoplásmica con actividad $\beta(1,3)$ -glucanasa *in vitro* (Baladrón *et al.*, 2002), y por otro lado, en *S. pombe* no era necesaria durante el proceso de separación celular, ya que las células del mutante *eng2* Δ eran capaces de separarse de forma similar a la cepa silvestre (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003).

Trabajos desarrollados por el grupo del Dr. F. Hochstenbach (Dekker *et al.*, 2004; Dekker *et al.*, 2007) demostraron que *agn2* es una $\alpha(1,3)$ -glucanasa que se expresa durante todo el ciclo de vida de *S. pombe*, aunque se induce durante el proceso de esporulación. La delección del gen *agn2*⁺ no afecta al crecimiento vegetativo, ya que las células tienen una tasa de generación similar a la de la cepa silvestre. Además, las células presentan una morfología similar a la del silvestre y no se observan células encadenadas, lo cual descarta que *agn2* tenga una función similar a la descrita para *agn1* durante la separación celular (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005). Estudios durante el ciclo sexual mostraron que *agn2* no es necesaria durante las primeras etapas del ciclo (conjugación y formación de las esporas), ya que estos procesos se llevan a cabo con una eficiencia similar a los descritos para la cepa silvestre. Sin embargo, *agn2* tiene un papel importante en la dehiscencia, ya que cepas diploides *agn2* Δ /*agn2* Δ presentan un severo defecto en la liberación de las esporas (tan sólo el 5-10% de las esporas se liberan tras 5-7 días). Finalmente, la adición exógena de la

proteína *agn2*-6xHis es capaz de complementar los defectos mostrados por la cepa diploide *agn2* Δ /*agn2* Δ , confirmando de esta manera que *agn2* tiene un importante papel durante la dehiscencia de las esporas en *S. pombe*.

Estos trabajos nos permitieron plantear la hipótesis de que *agn2* y *eng2* pudieran colaborar en la degradación de la pared celular durante el proceso de dehiscencia, de forma similar a como lo hacían *agn1* (disolución del cilindro de pared que rodea el septo) y *eng1* (degradación del septo primario) durante el proceso de separación celular (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Este trabajo se presenta en detalle en el artículo que acompaña este resumen.

Objetivos

- 1.- Estudiar la función de la proteína eng2 durante el ciclo sexual de *S. pombe*, prestando especial atención a su papel como $\beta(1,3)$ -glucanasa durante la dehiscencia de las esporas.
- 2.- Analizar el perfil de expresión y localización de eng2 a lo largo del ciclo sexual y compararla con la del ciclo vegetativo.

Resultados

1.- eng2 se induce durante el proceso de esporulación en *S. pombe*

Para confirmar que *eng2*⁺ se inducía durante la esporulación se realizó un ensayo tipo Western en células diploides sincronizadas en el que ambas copias del gen *eng2*⁺ estaban marcadas con la proteína fluorescente verde. Estos estudios confirmaron que existía un aumento de la cantidad de proteína en torno a las 10-12 horas, después de que las células habían superado la meiosis II del ciclo sexual. La $\alpha(1,3)$ -glucanasa *agn2* se comportaba de una manera similar.

2.- eng2 no presenta un papel relevante durante las primeras etapas del ciclo sexual

Para analizar la importancia de *eng2* durante las primeras etapas del ciclo sexual, células

eng2Δ de tipo sexual opuesto fueron cultivadas en condiciones limitantes en nitrógeno para inducir los procesos de conjugación y esporulación. Estas células presentaban unos porcentajes de conjugación y esporulación similares a los descritos para la cepa silvestre, lo que indicaba que *eng2* no era esencial para la conjugación y la formación de las esporas. La progresión a lo largo del ciclo sexual tampoco se vio afectada en relación con la cepa silvestre. Así, todos estos resultados indican que *eng2* no es necesaria para la duplicación del DNA, la segregación meiótica o la formación de las esporas.

3.- *eng2* es necesaria para la disolución de la pared del asca

A partir de células *eng2Δ* de tipo sexual opuesto crecidas en condiciones que inducen esporulación, se estudiaron las últimas etapas del ciclo sexual (como controles se utilizaron células silvestres y el mutante *agn2Δ* incapaz de generar esporas dehiscientes). Al igual que ocurría para el caso del mutante *agn2Δ* (Dekker *et al.*, 2007), las células diploides *eng2Δ/eng2Δ* eran incapaces de liberar las esporas tras 5-7 días de incubación (el 90% de las esporas quedaban retenidas en el interior del asca).

Para confirmar este defecto en la dehiscencia de las esporas, se creó una cepa diploide (P_{nmt1} -*eng2/eng2Δ*) en la que la expresión del gen *eng2*⁺ estaba controlada mediante un promotor reprimible por tiamina (P_{nmt1} versión 41x). En condiciones de represión, esta cepa mostraba un fenotipo similar al observado para el mutante *eng2Δ/eng2Δ* con la mayoría de las esporas retenidas en el interior del asca. Cuando se inducía la expresión, el fenotipo de la cepa P_{nmt1} -*eng2/eng2Δ* era muy similar al de la cepa silvestre, con más del 60% de las esporas fuera del asca (los niveles de proteína se controlaron mediante ensayos de tipo Western-blot). De esta manera, se pudo concluir que *eng2* tiene un papel relevante en la dehiscencia de las esporas.

4.- La actividad β(1,3)-glucanasa durante esporulación depende de *eng2* y es necesaria para la liberación de las esporas

Para estudiar si la actividad β(1,3)-glucanasa era relevante durante el proceso de esporulación, se utilizaron diferentes aproximaciones. En primer lugar, se analizó si la actividad β-glucanasa presentaba un perfil similar al observado para la proteína *eng2*, lo que indicaría que esta actividad es dependiente de la misma. Para ello se siguió la evolución de la actividad glucanasa a lo largo del ciclo sexual en una cepa diploide *eng2Δ/eng2Δ* (utilizando como controles la cepa silvestre y el mutante *eng1Δ/eng1Δ*). Estos análisis mostraron que la actividad glucanasa aumentaba durante la esporulación y que era dependiente de *eng2*.

Por otra parte, se analizó si la actividad glucanasa era esencial para la dehiscencia de las esporas durante el ciclo sexual. Esta posibilidad se estudió mediante dos aproximaciones diferentes:

- Analizando el efecto de una mutación puntual (E537A) en el par catalítico de la proteína que elimina su actividad glucanasa. El resultado fue que las células eran incapaces de liberar las esporas quedando secuestradas en el interior del asca.
- Comprobando el efecto de la adición exógena de la proteína (GST-*eng2*) en el mutante *eng2Δ/eng2Δ*. La adición de la proteína lograba liberar las esporas hasta niveles similares a los observados en la cepa silvestre (como control se utilizó la proteína GST-Eng2 de *S. cerevisiae*).

Finalmente, y aunque no se incluye en el artículo publicado que acompaña este resumen, se ha comprobado que la proteína *eng2Δ1-36* es capaz de complementar perfectamente el defecto de esporulación del mutante *eng2Δ/eng2Δ*, lo que indica que esta región de la proteína (y la posible formación de complejos) no son necesarias para permitir la dehiscencia de las esporas.

En resumen, todos estos datos indican que la actividad glucanasa durante el ciclo sexual depende de *eng2* y que esta actividad es esencial para la eficiente liberación de las esporas durante este proceso.

5.- *eng2* se localiza en el epiplasma de la célula desde donde lleva a cabo su función

Para examinar la localización de *eng2* durante esporulación, células de tipo sexual opuesto que contenían *eng2*-GFP fueron crecidas en condiciones que inducen la esporulación. Durante las primeras etapas del ciclo sexual, *eng2*-GFP se localizó en forma de puntos, similar

a lo descrito durante el ciclo vegetativo. A partir de un determinado momento (una vez superada la meiosis II), estas estructuras en forma de punto se desorganizaban y la fluorescencia quedaba localizada en el epiplasma del asca y rodeando las ascosporas (esta era la primera vez que se observaba una desorganización de la estructura de puntos en condiciones fisiológicas). Este patrón de localización, en el epiplasma y rodeando las ascosporas, era muy similar al descrito para la $\alpha(1,3)$ -glucanasa *agn2* (Dekker *et al.*, 2004). Así, *eng2* durante las etapas finales del ciclo sexual se localiza en el epiplasma del asca, desde donde disuelve de forma controlada y cooperativa (junto a *agn2*) la pared de la misma.

β -Glucanase Eng2 Is Required for Ascus Wall Endolysis after Sporulation in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*[∇]

Javier Encinar del Dedo, Encarnación Dueñas, Yolanda Arnáiz,
Francisco del Rey, and Carlos R. Vázquez de Aldana*

*Instituto de Microbiología Bioquímica, Dpto. Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca,
Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain*

Received 22 May 2009/Accepted 16 June 2009

Meiosis is the developmental program by which sexually reproducing diploid organisms generate haploid gametes. In yeast, meiosis is followed by spore morphogenesis. When *Schizosaccharomyces pombe* diploid cells undergo meiosis, they differentiate into asci containing four haploid ascospores that are highly resistant to environmental stress. The formation of the ascospore wall requires the activity of several enzymes involved in the biosynthesis and modification of its components, such as α - and β -glucan synthases. Once the spores are completely mature, the wall of the ascus undergoes an endolytic process that results in the release of ascospores from the ascus, allowing their dispersal into the environment. This process requires the activity of the endo- α -1,3-glucanase Agn2. Here, we focus on the characterization of the endo- β -1,3-glucanase Eng2, which is also required for ascospore release from the ascus. Although Eng2 is present during the mitotic cycle, the protein accumulates after meiosis II. The expression of *eng2*⁺ is required for the efficient release of ascospores, as shown by placing *eng2*⁺ under the control of a repressible promoter. Furthermore, a point mutation that destroys the catalytic activity of the protein results in a phenotype similar to that of the mutant strain. Finally, we demonstrate that exogenous addition of purified Eng2 releases the ascospores from asci generated by an *eng2* Δ mutant. We propose that Eng2 would act together with Agn2 to completely hydrolyze the ascus wall, thereby assisting in the release of ascospores in *S. pombe*.

Cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* have a rod-like shape and grow at the poles. *S. pombe* cells are stable in the haploid state and proliferate asexually until there is a shortage of nutrients. When cells are starved, especially of nitrogen, a sexual development program is triggered, and hence, cells from the opposite mating types conjugate to form zygotes. These immediately undergo meiosis, giving rise to four haploid zygotic ascospores (34).

Spore formation is a complex differentiation program in which two sequential processes, meiosis and ascospore formation, occur in a coordinate fashion. During meiosis, the recently formed diploid nucleus undergoes a round of DNA replication, followed by two successive nuclear divisions generating four haploid nuclei (34). The morphogenetic program that leads to the formation of ascospores starts during meiosis II, when the four spindle-pole bodies (SPBs) differentiate into a sporulation-specific shape and change into a multilayered structure (15). These modified SPBs serve as the nucleation points for the fusion of membrane vesicles, resulting in the formation of a double-membrane structure, known as the forespore membrane, which engulfs each nuclear lobe and isolates the four haploid nuclei (15, 33, 34). Following this, the cell wall of the ascospore is synthesized de novo within the lumen of the forespore membrane through the deposition of successive layers of cell wall material mediated by the action of specific synthases. The synthesis of spore cell wall material

requires the activity of several sporulation-specific enzymes, such as the α -glucan synthase subunits Mok12, Mok13, and Mok14, paralogues of the vegetative α -glucan synthase Mok1 (14, 16, 34). Additionally, the biosynthesis of the spore wall β -1,3-glucan is carried out by a specific β -1,3-glucan synthase complex, whose catalytic subunit is encoded by *bgs2*⁺ (20, 22). Synthesis of the ascospore cell wall also requires the activity of other enzymes, such as the chitin synthase Chs1, the putative chitin deacetylase Cda1, and the β -glucanosyl transferase Gas4 (2, 8, 29). Interestingly, all these genes are induced during the sporulation process, and most of them belong to the middle and late groups, which contain genes induced during meiosis I and II and spore formation, respectively (27). Furthermore, the expression of most of these genes involved in spore wall assembly requires the meiosis-specific transcription factor Mei4 (28).

The final step in the sporulation process is the hydrolysis of the ascus wall surrounding the ascospores for release of the meiotic products into the environment, allowing their dispersal. The ascus wall is the cell wall of vegetative cells that fuse to form a diploid and is thus mainly composed of α - and β -glucans (17, 21). Recently, it has been shown that the α -1,3-glucanase Agn2 functions late in sporulation and that it is necessary for the hydrolysis of the α -1,3-glucan of the ascus wall for release of the ascospores (6, 7). Agn2 lacks a signal sequence for secretion, and the protein localizes to the epiplasm, the material surrounding the ascospores inside the ascus wall (6). Interestingly, the *S. pombe* genome also contains an endo- β -1,3-glucanase, named Eng2, which lacks a secretion signal and whose expression is induced during the sporulation process (27, 36). This suggests that it might also be involved in

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC/Universidad de Salamanca, Edificio Departamental, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: 34-923-252092. Fax: 34-923-224876. E-mail: cvazquez@usal.es.

[∇] Published ahead of print on 19 June 2009.

PCR approach described by Wach (35). To accomplish this, DNA fragments of 300 to 500 bp corresponding to the 5' and 3' flanking regions of each gene were PCR amplified using specific oligonucleotide pairs. The resulting fragments were then fused by recombinant PCR to the *kanMX4* cassette or to the *ura4⁺* gene.

The C-terminally GFP-tagged (*eng2*-GFP and *agn2*-GFP) strains were constructed by direct chromosome integration of PCR fragments, generated using the pFA6a-GFP-*kanMX6* plasmid as a template and specific oligonucleotides (1391/1392 for *eng2*-GFP and 1465/1466 for *agn2*-GFP) (3). The amplified fragments contained the GFP-coding region fused in-frame to the last codon of the *eng2⁺* and *agn2⁺* genes and the *kanMX6* cassette, which was used to select for transformants. The N-terminally three-hemagglutinin (HA₃)-tagged (HA₃-*eng2*) strain under the control of the repressible *nmt1⁺* promoter was constructed by direct chromosome integration of PCR fragments generated using the pFA6a-3HA-*kanMX6* plasmid as a template and specific oligonucleotides (1393/1394) (3). Correct integration of the DNA fragment was verified by PCR.

Plasmid pJED12 carries the wild-type *eng2⁺* gene cloned under the control of its own promoter. Oligonucleotides 366/367, which generated Sall/SacI sites at the ends, were used for PCR amplification, and Sall/SacI restriction sites were used to clone the fragment into the pAU-KS vector. pJED13 carries the *eng2*(E537A) allele. Site-directed mutagenesis was accomplished by recombinant PCR according to the protocol described by Wach (35). The DNA fragment containing the desired mutation was amplified using a pair of oligonucleotides that generated the mutation substitution (743/744) and two external primers (1440/1445). The amplified fragment (968 bp) containing the mutation was then cloned into plasmid pJED12 (BamHI-SpeI).

Ascospore release. For ascospore release experiments, diploid strains were sporulated for 7 days. Mature asci were washed, resuspended in 300 μ l of 50 mM acetate buffer, pH 5.5, and incubated with 0.8 μ g of purified *S. pombe* Eng2 or purified *S. cerevisiae* Eng2 (25) at 37°C for 1 h. The percentage of ascospore release was calculated as the number of free spores versus the total number of mature spores counted.

Extract preparation, electrophoresis, and immunoblotting. Sporulating cells were collected by centrifugation; a small aliquot was used to assess the sporulation process by microscopy. Pellets were boiled for 10 min, quickly frozen (in dry ice), and stored at -80°C. Total cell extracts of sporulating cells were prepared by breaking the cells or the spores with glass beads in lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM PMSF, and 1% Triton X-100).

For immunoblotting, 60 μ g of protein extract was resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels. Protein transfer, blotting, and chemiluminescence detection were performed using standard procedures. Anti-GFP (JL-8 Living Colors; Clontech) or antiactin (ICN Biomedicals) antibodies were used.

Microscopy techniques. For light microscopy, cells were stained with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) for DNA visualization. Samples were viewed using a Leica DMRXA microscope equipped for bright-field and Nomarski optics and epifluorescence and were photographed with a Hamamatsu ORCA-ER camera. To estimate the proportion of cells in meiosis I, meiosis II, or sporulation, the percentages of cells with one, two, or four nuclei observed after DAPI staining and the percentage of asci with mature spores observed under Nomarski microscopy were determined.

β -Glucanase activity assay and substrates. Activity was detected using reduced laminarin (Sigma) as a substrate. Laminarin was reduced by treatment with NaBH₄ in 50 mM NaOH, dialyzed against acetate buffer (50 mM, pH 5.5), and freeze dried. Determination of β -glucanase activity was performed at 37°C for different incubation times with 50 mM acetate buffer, pH 5.5, containing 0.64 mg/ml of laminarin and 0.1 to 0.6 mg of protein extract. Activity was determined by measuring the amount of reducing sugars released from the substrate with the *p*-amino-hydroxybenzoic acid hydrazide method (12). After enzyme incubation, an aliquot of 50 μ l was added to a solution of 950 μ l of 50 mM sodium sulfite, 250 mM NaOH, 25 mM sodium citrate, 10 mM CaCl₂ containing 1 g *p*-amino-hydroxybenzoic acid hydrazide per 100 ml. Following a 10 min boiling period, reduced sugars were quantified at 405 nm, using glucose as a standard. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the release of reducing sugar groups equivalent to 1 μ mol of glucose per h, and specific activity was expressed as U per milligram of protein.

RESULTS

Eng2 is induced during ascospore formation. In its genome, *S. pombe* contains two genes, *eng1⁺* and *eng2⁺*, that code for proteins belonging to glycosyl hydrolase family 81 (GH81). While Eng1 is necessary for controlled dissolution of the pri-

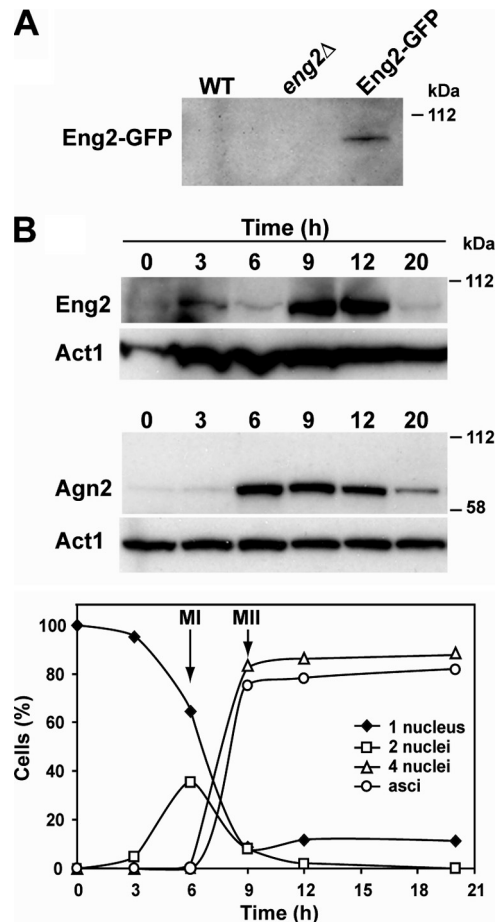


FIG. 1. Eng2 accumulates during sporulation. (A) Western blot analysis of Eng2-GFP during vegetative growth. Samples were collected from exponentially growing cultures of wild-type (WT; OL23), *eng2* Δ mutant (OL24), and *eng2*-GFP (OL896) strains to prepare protein extracts. Anti-GFP antibody was used. (B) Western blot analysis of Eng2-GFP and Agn2-GFP during sporulation. The diploid strains OL961 and OL962 were induced to sporulate. Samples were collected at the indicated times after the induction of sporulation to prepare protein extracts. Anti-GFP antibody was used. Actin was used as a loading control. Meiotic progression was followed by DAPI staining of nuclei, and sporulation was checked by microscopic observation of asci. The percentages of mononucleate, binucleate, and tetranucleate cells and spores at each time point for the strain carrying Eng2-GFP are shown in the graph.

mary septum during cell separation at the end of mitosis (23), no function has been described for Eng2. Genome-wide transcription-profiling experiments on synchronously sporulating *S. pombe* cells have revealed that the expression of *eng2⁺*, which belongs to the middle group of genes (27), is induced during this process. This induction pattern is similar to that of the endo- α -1,3-glucanase Agn2, which is required for hydrolysis of the ascus wall before spore release (7), suggesting that Eng2 might perform its function during the sporulation process. To confirm that this induction pattern was accompanied by an increase in Eng2 protein levels, *eng2⁺* was tagged with GFP to analyze protein levels along the sporulation process; the fusion protein was detected during vegetative growth (Fig. 1A). A diploid strain carrying Eng2-GFP was induced to sporu-

late, and samples were collected at different times after induction and analyzed using anti-GFP antibodies. The results indicated that Eng2 was strongly induced along the sporulation process, maximum accumulation coinciding with the end of meiosis II and spore formation (9 h after induction of sporulation). As a control, a strain bearing Agn2-GFP was used, and a similar pattern was observed, although Agn2-GFP was detected earlier than Eng2 (Fig. 1B). Thus, although Eng2 is present during vegetative growth, its synthesis is strongly induced during sporulation, with an induction profile slightly slower than that observed for Agn2.

Endo- β -1,3-glucanase activity during sporulation depends on $eng2^+$. Previously, we have shown that Eng2 is a glucanase with high specificity for β -1,3-glucans, acting with an endohydrolytic mode of action (25). To analyze whether the increase in Eng2 protein levels during sporulation might result in an increase in β -1,3-glucanase activity, the activity of sporulating cells was assayed using laminarin as a substrate. As shown in Fig. 2A, β -1,3-glucanase activity gradually increased in wild-type sporulating cells, reached a peak at the moment that the culture completely sporulated (12 h), and thereafter decreased slowly, in good agreement with the results obtained by Western analysis (Fig. 1B). Since *S. pombe* contains two proteins belonging to the GH81 family encoded by the $eng1^+$ and $eng2^+$ genes (23, 25), homozygous $eng2\Delta/eng2\Delta$ and $eng1\Delta/eng1\Delta$ diploids were constructed to confirm that the increase in β -1,3-glucanase activity during sporulation was indeed due to $eng2^+$. We observed that the basal level of β -1,3-glucanase activity of the $eng2\Delta/eng2\Delta$ strain did not increase along sporulation, which can be attributed to the activity of the Eng1 glucanase (Fig. 2A). In contrast, $eng1\Delta/eng1\Delta$ diploids had low levels of glucanase activity during vegetative growth (time zero) that increased over time, with kinetics identical to that of wild-type diploids, although the amplitude of the increase was smaller. These results therefore indicate that the bulk of β -1,3-glucanase activity produced during sporulation corresponds to Eng2.

$eng2^+$ functions after ascospore formation. To analyze the moment at which Eng2 exerts its function during sporulation, we first tested the possibility that Eng2 might play a role during mating or sporulation. Wild-type, $eng1\Delta$, or $eng2\Delta$ cells of opposite mating types were allowed to mate and sporulate at 25°C for 3 days. Mating and sporulation efficiency levels were monitored by microscopic inspection of the cultures. The percentages of mature spores in $eng2\Delta/eng2\Delta$ and $eng1\Delta/eng1\Delta$ crosses were similar to those found for wild-type haploid strains, indicating that $eng1^+$ and $eng2^+$ are not essential genes for conjugation and subsequent sporulation.

Progression through meiosis was also analyzed for wild-type and homozygous $eng2\Delta/eng2\Delta$ mutant strains. The kinetics of the appearance of bi- and tetranucleate cells was measured for wild-type and $eng2\Delta$ mutant strains incubated in sporulation medium for different time intervals. Microscopic inspection of the DAPI-stained cells indicated that bi- and tetranucleate cells were present in the $eng2\Delta$ mutant. When progression through meiosis was quantified, the results indicated that the kinetics of appearance of bi- and tetranucleate cells in the $eng2\Delta$ mutant was almost identical to that of the wild-type strain (Fig. 2B). Mature spores started to appear after 9 h of incubation and accounted for about 70% of the culture at 12 h

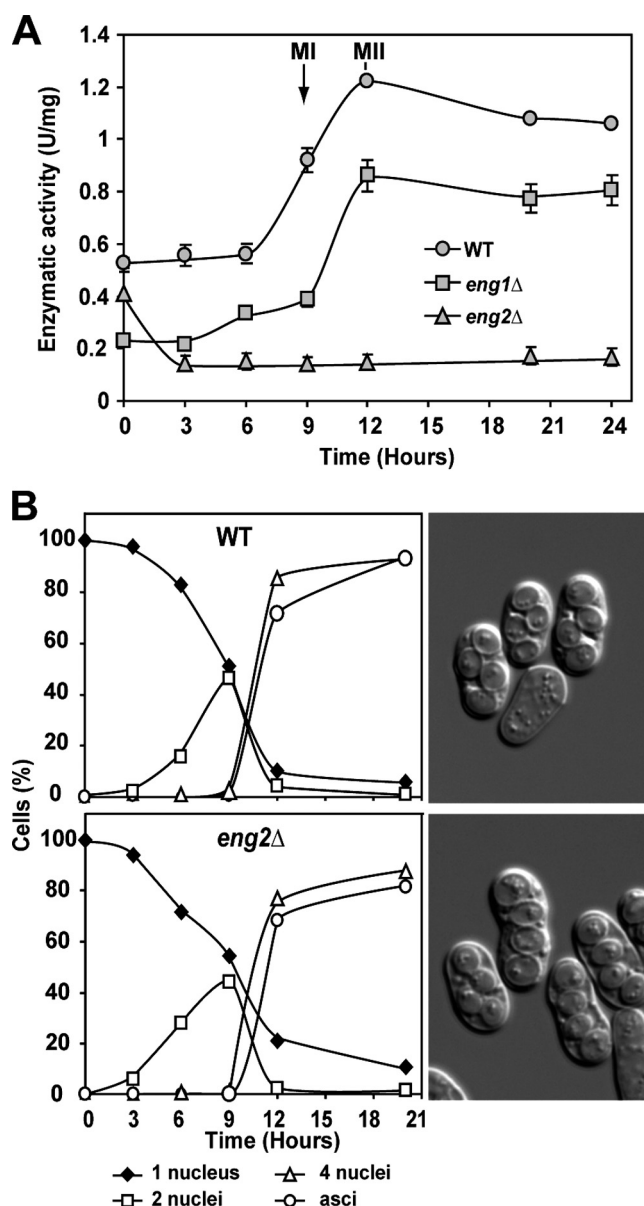


FIG. 2. β -1,3-Glucanase activity during sporulation. (A) The diploid strains OL946 (WT), OL948 ($eng1\Delta/eng1\Delta$), and OL950 ($eng2\Delta/eng2\Delta$) were grown on EMM-AC and then transferred to EMM-SG to induce sporulation. Samples were collected at the indicated times after the induction of sporulation to prepare protein extracts and to assay β -1,3-glucanase activity, using laminarin as substrate. Activity is represented as units/mg protein. Values are means of results from three independent measurements, and standard deviations are shown. MI, meiosis I; MII, meiosis II. (B) Meiotic progression of the wild-type (WT) and $eng2\Delta/eng2\Delta$ strains. Aliquots of the culture were stained with DAPI, and the percentages of mononucleate, binucleate, and tetranucleate cells and spores at each time-point are shown. Images show mature spores after 24 h of incubation in sporulation medium.

of incubation in the wild-type strain, and a similar value was observed for the $eng2\Delta$ mutant. Microscopic inspection of spores incubated for 24 h in sporulation medium suggested that the spores produced by the $eng2\Delta$ mutant were fully mature (Fig. 2B), although the spatial arrangement of the mutant spores had a slight tendency to be linear rather than the typical

diamond shape. Together, these results indicate that *eng2*⁺ is not required for DNA duplication, meiotic segregation, or spore formation.

Eng2 is required for endolysis of the ascus wall. It has been reported that the endo- α -1,3-glucanase Agn2 is directly involved in endolysis of the ascus wall and that Agn2 is necessary for the release of ascospores into the medium (6, 7). *agn2*⁺ expression is also induced during sporulation, and the protein lacks a signal sequence for entry into the secretory pathway, localizing to the cytoplasm of the ascus. Since Eng2 also lacks a signal sequence for secretion, we analyzed whether Eng2 might play a similar role in the endolysis of the ascus wall after sporulation at the time of ascospore release. To test this idea, *eng2* Δ /*eng2* Δ diploid cells were transferred to sporulation medium and incubated for long periods of time. As controls, we used isogenic wild-type and *agn2* Δ /*agn2* Δ diploid strains. The three strains formed similar percentages of asci containing four ascospores within 24 to 48 h after the start of induction. In the wild-type tetrads, the ascus walls started to lyse, releasing the individual ascospores over time, a maximum of free spores (>95%) being reached at 96 h after induction (Fig. 3). In contrast, the ascus walls remained intact in most *agn2* Δ /*agn2* Δ and *eng2* Δ /*eng2* Δ tetrads. The defect in spore release was slightly more prominent in *agn2* Δ /*agn2* Δ cells than in *eng2* Δ /*eng2* Δ mutants (1% free spores versus 8%, respectively), suggesting that Agn2 might play a more relevant role than Eng2 in hydrolysis of the ascus wall (Fig. 3B).

To confirm that *eng2*⁺ expression was required for proper ascospore dispersal, the *eng2*⁺ open reading frame was placed under the control of the *nmt1*⁺ thiamine-repressible promoter at its chromosomal locus. The HA epitope was also introduced at the N terminus in order to monitor protein levels. Subsequently, we created a heterozygous diploid strain carrying the *P_{nmt1}-eng2* allele and the *eng2* Δ allele (*P_{nmt1}-eng2/eng2* Δ) and transferred the cells to sporulation medium. As controls for the experiment, we used a heterozygous wild type (*eng2*⁺/*eng2* Δ) and the *eng2/eng2* mutant. Haploid strains were grown on YES medium to repress the expression of the *P_{nmt1}-eng2* allele and then spotted on EMM-N plates, with or without thiamine, to allow mating and sporulation. Eng2 protein levels were analyzed after 24 h to confirm that no protein was produced under repressing conditions (Fig. 4A). The sporulation efficiencies of the three strains were similar in both media (data not shown). When free spores were analyzed over time, we found that the wild-type strain released similar numbers of spores under both repressing and inducing media (Fig. 4B and C). In the presence of thiamine (promoter off), the *P_{nmt1}-eng2/eng2* Δ strain produced asci with four ascospores that remained encapsulated by the ascus wall, like the *eng2* Δ /*eng2* Δ diploids. In contrast, under inducing conditions, most *P_{nmt1}-eng2/eng2* Δ ascus walls lysed to release free ascospores to a degree comparable to that of the heterozygous wild type (Fig. 4B and C). Together, these experiments indicate that Eng2 is also involved in endolysis of the ascus wall, like the α -1,3-glucanase Agn2.

Eng2 enzymatic activity is necessary for spore release. GH81 proteins share a conserved region of around 650 amino acids in which the catalytic domain is included (25). Within this domain, two perfectly conserved Glu residues (E550 or E554) have been proposed as putative nucleophiles of the active site of the *Aspergillus fumigatus* Eng1 endoglucanase, while the

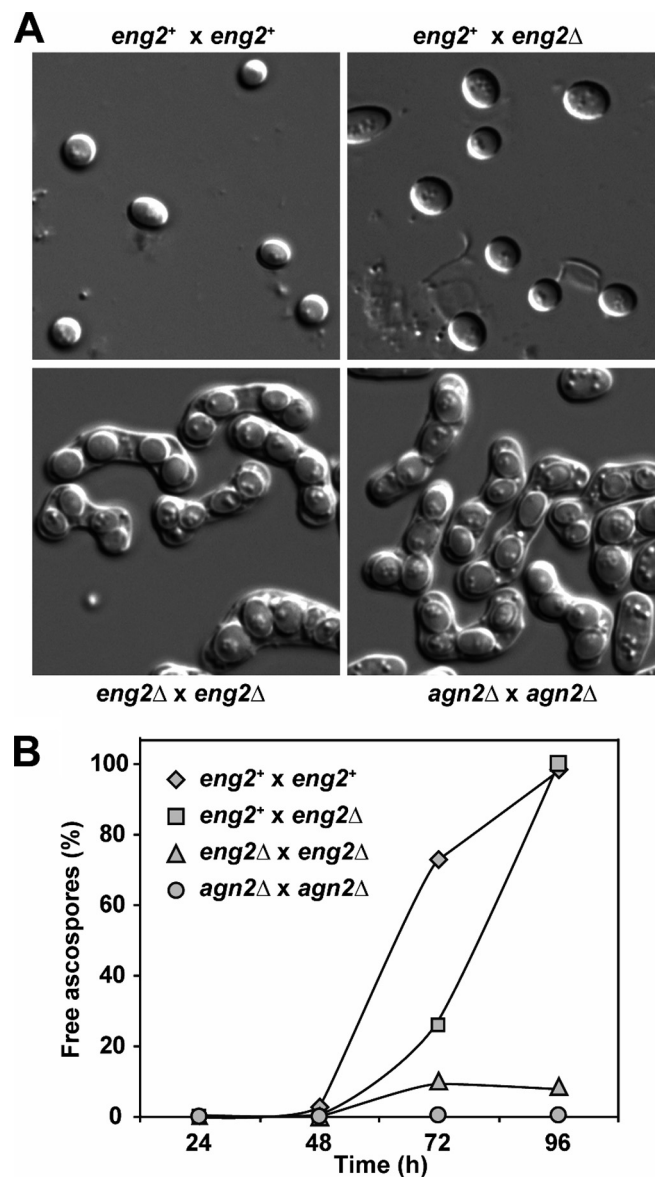


FIG. 3. Eng2 participates in ascus wall hydrolysis following sporulation. (A) Microscopic appearance of sporulated cultures obtained from crosses between wild-type haploid (OL176/OL177), *eng2*⁺/*eng2* Δ (OL176/OL773), *eng2* Δ /*eng2* Δ (OL759/OL773), and *agn2* Δ /*agn2* Δ (OL763/OL777) strains. Cultures were incubated for 96 h before the images were taken. (B) Quantification of ascospore release from the asci indicated in sporulated cultures from the same crosses. At the indicated time intervals, the percentages of free ascospores were determined by light microscopy. At least 150 cells were counted for each time point.

proton donor would be D475 (31). These conserved residues are also required for the activity of *S. cerevisiae* Eng2 and soybean glucan-binding elicitor protein, since point mutations abolish catalytic activity without affecting protein levels (10, 25). To test whether hydrolysis of the ascus wall requires the enzymatic activity of Eng2, a point mutant in which one of the conserved Glu residues had been replaced by Ala was constructed [*eng2*(E537A) allele] (Fig. 5A). The plasmid was introduced into an *eng2* Δ mutant, and the resulting strain was

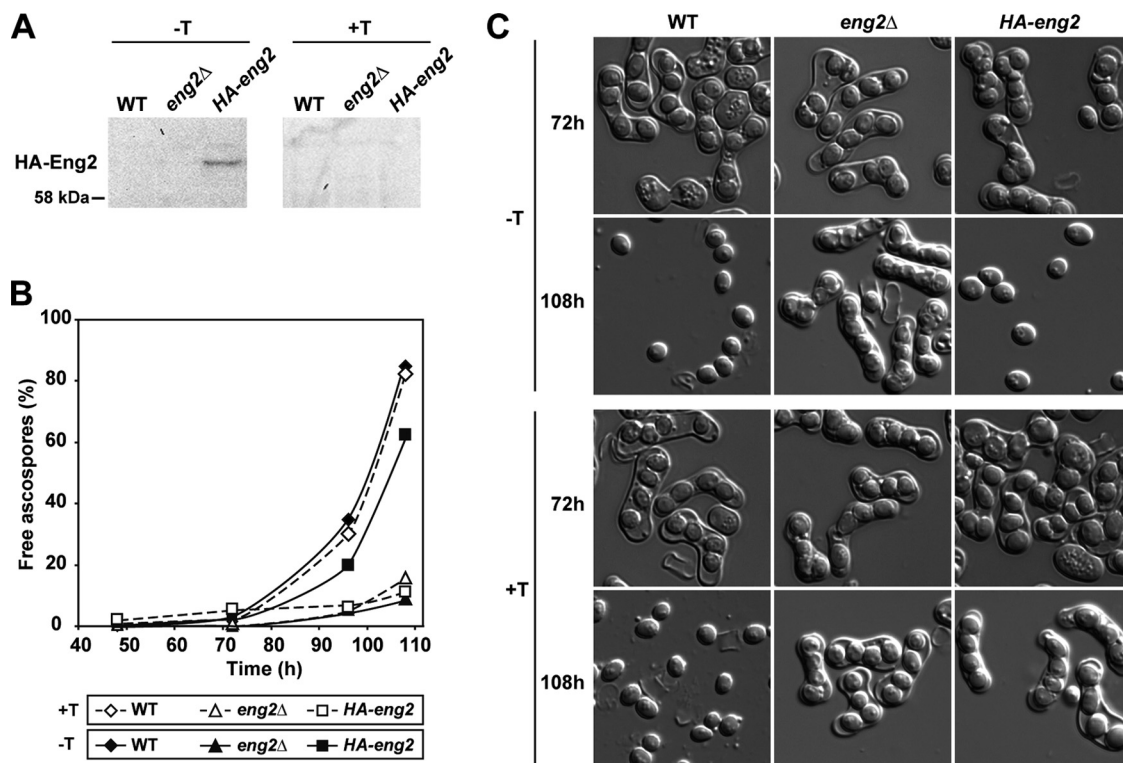


FIG. 4. Expression of *eng2*⁺ is essential for the release of ascospores from asci. The haploid *eng2Δ* strain carrying *P_{nmr1}-eng2* (OL958) and the haploid strains from the opposite mating type, OL176 (WT) and OL773 (*eng2Δ*), were grown on YES medium to mid-log phase. Equal numbers of cells were collected and spotted onto EMM-N plates with (+T) and without (-T) thiamine to induce mating and sporulation. At the indicated times, aliquots were collected for microscopic inspection and quantification of the percentage of free spores. The crosses were *eng2*⁺/*eng2Δ* (WT), *eng2Δ*/*eng2Δ* (*eng2Δ*), and *eng2Δ*/*eng2Δ* plus *P_{nmr1}-eng2* (HA-*eng2*). (A) Western analysis of Eng2-HA after 24 h of incubation in EMM-N medium. (B) Percentages of free spores. (C) Sample images of the different strains grown in the presence and absence of thiamine.

crossed with an *eng2Δ* mutant of the opposite mating type. When the efficiency of spore release was analyzed, we found that it was almost identical to that of the *eng2Δ*/*eng2Δ* mutant (around 5% free spores after 96 h) (Fig. 5B), while *eng2Δ*/*eng2Δ* mutants carrying a plasmid with the wild-type *eng2*⁺ gene were similar to the wild-type control strain in this respect (>70% free spores). Thus, the endo- β -1,3-glucanase activity of Eng2 is essential for efficient spore release.

Eng2 is directly involved in endolysis of the ascus wall. To corroborate the cellular function of Eng2, *eng2Δ*/*eng2Δ* diploid cells were induced to sporulate. When they had completely developed and matured, they were incubated with purified Eng2 from *S. pombe* and the percentage of ascospores released was determined by microscopic inspection (Fig. 6). As controls, we used purified *S. cerevisiae* Eng2 and an *agn2Δ*/*agn2Δ* diploid. The results indicated that the *S. pombe* Eng2 was able to complement the defect of the *eng2Δ*/*eng2Δ* mutant and hydrolyze the remnants of the ascus walls to release free ascospores, but Eng2 failed to complement the defect of the *agn2Δ*/*agn2Δ* mutant. Interestingly, *S. cerevisiae* Eng2 was largely deficient in complementing the defect of the *eng2Δ*/*eng2Δ* mutant, releasing hardly any ascospores. This failure to complement the phenotype of *eng2Δ*/*eng2Δ* mutants was not due to the absence of enzymatic activity, since both proteins were seen to have similar glucanase activities when laminarin was used as a substrate (58 mU/mg for *S. pombe* Eng2 versus 66 mU/mg for *S.*

cerevisiae Eng2). This demonstrates directly that Eng2 is able to restore the endolysis defect of the *eng2Δ*/*eng2Δ* mutant, presumably by hydrolyzing the β -1,3-glucan present in the ascus wall. Furthermore, it demonstrates that the *S. pombe* and *S. cerevisiae* proteins have different specificities for their substrates in vivo.

Eng2 localizes to the epiplasm. The α -glucanase Agn2 lacks a signal sequence for entry into the secretory pathway, and Agn2 localizes to the cytoplasm of the ascus, the epiplasm (6). Since Eng2 also lacks a conventional signal for secretion, it is possible that it might have a similar cytoplasmic localization. To test this, we used the Eng2-GFP construct to monitor Eng2 localization along the sporulation process. Microscopic observation of sporulating cells revealed that Eng2-GFP localized to the epiplasm when the spores had already matured (Fig. 7A), in a pattern similar to that of Agn2-GFP. However, some differences were observed during the early stages of spore development. While Agn2-GFP was not observed in sporulating cells in which the spores had not formed, Eng2-GFP appeared concentrated as two intense dots (one in each cell). This difference could be due to the fact that Eng2 is also present in vegetative cells, where it localizes as a dot in the cells. However, the significance of this dot and its function are currently unknown.

We also found that a faint signal for Agn2-GFP and Eng2-GFP could be observed at the periphery of the released spores

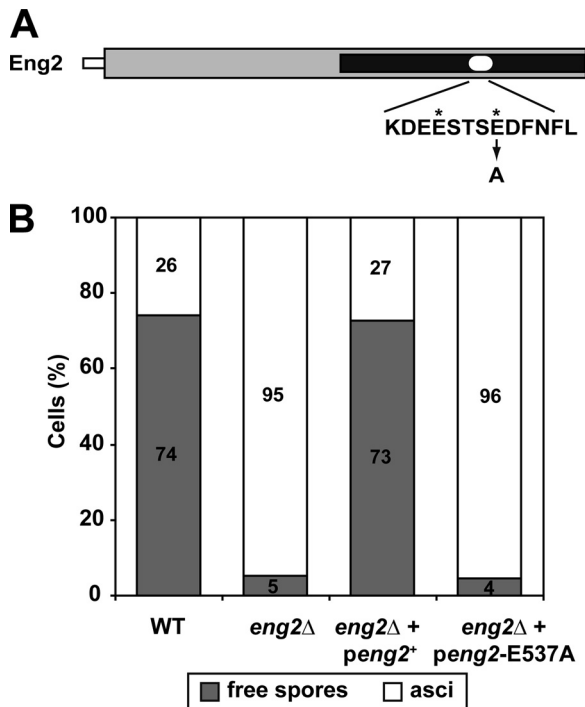


FIG. 5. Eng2 catalytic activity is required for ascus endolysis. (A) Schematic representation of Eng2. The gray rectangle indicates the common region present in GH81 proteins that contains the putative catalytic domain of the protein (black rectangle). The white circle marks the position of the two perfectly conserved Glu residues, which have been proposed to act as putative nucleophiles (asterisks). E537 was mutated to Ala. (B) Quantification of ascospore release from the asci in sporulated cultures. At the indicated time intervals, the percentages of free ascospores were determined by light microscopy. At least 150 cells were counted for each time point. The crosses were OL176/OL177 (WT), OL759/OL773 (*eng2Δ*), OL759/OL773 carrying pJED12 (*eng2Δ/peng2+*), and OL759/OL773 carrying pJED13 [*eng2Δ/peng2(E537A)*].

(Fig. 7B), raising the possibility that these two enzymes might have a function in spore wall degradation during germination. To test this possibility, we analyzed the spore germination and viability of *eng2Δ/eng2Δ* mutants in comparison with those of the wild-type strain. The results indicated that similar numbers of spores were able to germinate in the two strains (>70%) (Fig. 6C), ruling out the possibility that Eng2 is required for spore germination.

DISCUSSION

S. pombe contains two proteins belonging to the GH81 family encoded by the *eng1+* and *eng2+* genes. Both proteins have been shown to have endo-glucanase activity, specifically hydrolyzing β -1,3-glucan chains (25), like most of the members of this family described so far (4, 11, 12, 31). Even though they display the same enzymatic activity, Eng1 and Eng2 function at different moments of the life cycle of fission yeast. Thus, whereas Eng1 is involved in the controlled dissolution of the linear β -1,3-glucan of the primary septum during the last step of the cell cycle, i.e., cell separation (23), in the present study, we demonstrate that not only *eng2+* expression but also the catalytic activity of Eng2 is required for endolysis of the ascus

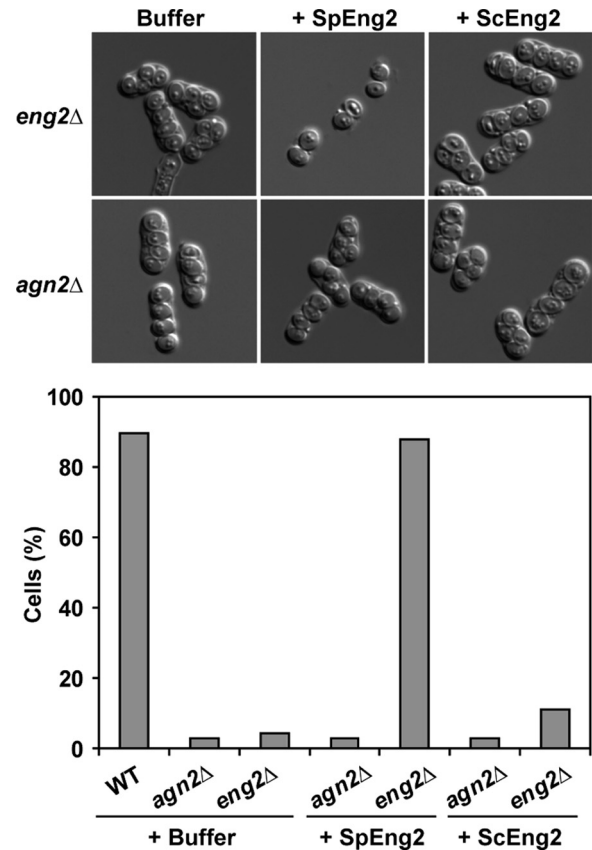


FIG. 6. Exogenous addition of purified Eng2 results in ascospore release. *eng2Δ/eng2Δ* (OL759/OL773) or *agn2Δ/agn2Δ* (OL763/OL777) diploid cells were allowed to sporulate for 7 days. After spore formation, the asci were incubated for 60 min at 37°C with buffer or 0.05 units of purified *S. pombe* Eng2 (SpEng2) or *S. cerevisiae* Eng2 (ScEng2). The percentage of ascospores released in each culture was examined by light microscopy. At least 100 cells were counted. WT, wild type.

wall, the last step in the sexual cycle. The ascus wall is the cell wall of mating haploid cells or the cell wall of a sporulating diploid cell and is therefore expected to have a composition similar to that of vegetative cells, consisting mainly of α -1,3-glucan and β -1,3-glucan (17, 21). In light of its high substrate specificity, it is very likely that Eng2 is required for the degradation of the β -1,3-glucans of the ascus wall prior to spore release.

Interestingly, *S. pombe* contains another pair of hydrolytic enzymes that appear to function at similar times of the life cycle and have functions complementary to those of Eng1 and Eng2. These are the α -1,3-glucanases Agn1 and Agn2, belonging to the GH71 family. The β -glucanase Eng1 and the α -glucanase Agn1 fulfill their function during the last step of the vegetative cell cycle, i.e., controlled dissolution of the primary septum and the cylinder of cell wall that surrounds it, termed the septum edging (6, 13, 23). The complementary action of these two enzymes is necessary for the efficient degradation of the linear β -1,3-glucan of the primary septum and the α - and β -glucans of septum edging, allowing the two daughter cells to become two independent entities. The two genes, *eng1+* and *agn1+*, show a periodic pattern of expression during the cell

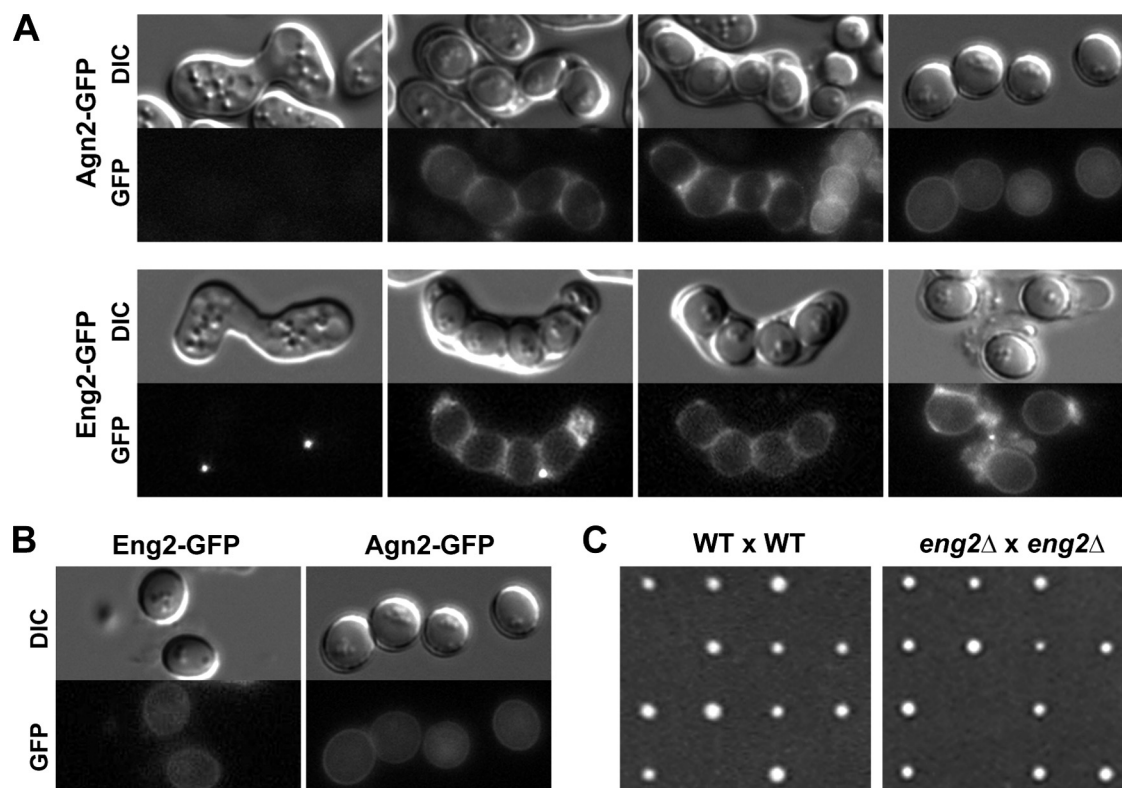


FIG. 7. Eng2 localizes to the cytoplasm of the ascus. (A) Haploid Eng2-GFP (OL952) or Agn2-GFP (OL954) cells were allowed to mate on sporulation plates with cells from the opposite mating type carrying the same tagged proteins (strain OL953 or OL955, respectively), and the resulting zygotic asci were examined using fluorescence microscopy. Bar, 10 μ m. (B) Details of free spores. (C) Germination of spores from the wild-type (WT) and *eng2Δ/eng2Δ* crosses. DIC, differential interface contrast.

cycle, with a peak at the end of mitosis, and their transcription is controlled by the transcription factor Ace2 (1, 5, 32). Both Eng1 and Agn1 contain a signal sequence for entry into the secretory pathway, and they are transported to the septum region, where they initially localize as a ring that surrounds the septum in a process that is dependent on septins and the exocyst (1, 23, 26).

Similarly, the β -glucanase Eng2 and the α -glucanase Agn2 form another pair of complementary enzymes with some shared characteristics, and they function during the final step of the *S. pombe* sexual cycle. The expression of *eng2*⁺ and *agn2*⁺, belonging to the middle group of genes, is highly up-regulated during the sporulation process, and their products are mainly involved in spore morphogenesis (27). Additionally, Eng2 lacks a signal peptide for entry into the secretory pathway and therefore localizes intracellularly to the cytosol of the diploid cell, as has been described for Agn2 (6). Since the ascus wall corresponds to the cell wall of the diploid cell or to the cell wall of conjugating haploids, this wall is expected to have a composition similar to that of the vegetative cell wall. The fact that the deletion of either of these enzymes produces a similar defect in spore release suggests that both α -1,3-glucan and β -1,3-glucan must be hydrolyzed for ascospores to be released efficiently, and this is achieved by the concerted action of Agn2 and Eng2. Both of these enzymes localize to the cytosol of the cell, but they exert their function at the extracellular side of the plasma membrane of the ascus. Since the synthesis of the spore

wall requires a modification in the vesicular traffic to target the secretion of the components of the biosynthesis machinery to the forespore membrane, the absence of a secretory signal sequence might be essential for Eng2 and Agn2 to localize correctly and fulfill their cellular function. When the spore cell wall is synthesized, the inner layer of the forespore membrane becomes the spore plasma membrane, whereas the outer layer autolyzes. It is possible that a similar degradation occurs with the plasma membrane of the ascus, allowing Eng2 and Agn2 to access their substrates, as has been previously proposed (7). Interestingly, the genomes of other yeasts, such as *S. cerevisiae* and *Candida albicans*, contain a pair of endo- β -1,3-glucanases, one of which lacks a signal peptide (4, 9). Whether the cytoplasmic β -glucanase plays a role during other moments of the life cycle remains to be investigated.

Another interesting issue is the differences in the in vivo substrate specificities of the GH81 proteins. We have shown that purified Eng2 from *S. pombe* fully complements the defect of an *eng2Δ/eng2Δ* mutant, while *S. cerevisiae* Eng2 is largely deficient in this process. Although the two proteins are found to have similar enzymatic activities when assayed in vitro, the present results could be an indication that they have different substrate specificities in vivo and that the β -1,3-glucans of the *S. pombe* spore wall are inefficiently recognized and cleaved by *S. cerevisiae* Eng2. Alternatively, this difference could reflect the differences between the biological properties of *S. cerevisiae* and *S. pombe*, since asci are not autolyzed before spore

germination in budding yeast. Additionally, the two *S. pombe* proteins of this family, Eng1 and Eng2, also seem to have different *in vivo* substrates. *In vitro*, both proteins are able to degrade β -1,3-glucans (25). However, *in vivo*, their substrates must be different, since Eng1 acts specifically on the primary septum, which is rich in linear chains of β -1,3-glucan (18), while Eng2 should act on the β -1,3-glucans of the cell wall. These differences could be due to the fact that at the C terminus, Eng1 contains three repeats of a sequence acting as a carbohydrate-binding domain that are necessary for its correct localization to the septum region and that might provide strong specificity for the linear β -glucan chains whereas Eng2 lacks this region (24).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ana Belen Martín-Cuadrado for Eng2 protein purification, members of the laboratory for help and support, and Nick Skinner for language revision.

This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2004-00778 and BFU2007-60390).

REFERENCES

- Alonso-Núñez, M. L., H. An, A. B. Martín-Cuadrado, S. Mehta, C. Petit, M. Sipiczki, F. del Rey, K. L. Gould, and C. R. Vázquez de Aldana. 2005. Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **16**:2003–2017.
- Arellano, M., H. Cartagena-Lirola, M. A. Nasser Hajjibagheri, A. Durán, and M. H. Valdivieso. 2000. Proper ascospore maturation requires the *chs1+* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **35**:79–89.
- Bähler, J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**:943–951.
- Baladrón, V., S. Ufano, E. Dueñas, A. B. Martín-Cuadrado, F. del Rey, and C. R. Vázquez de Aldana. 2002. Eng1p, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **1**:774–786.
- Dekker, N., A. de Haan, and F. Hochstenbach. 2006. Transcription regulation of the α -glucanase gene *agn1* by cell separation transcription factor Ace2p in fission yeast. *FEBS Lett.* **580**:3099–3106.
- Dekker, N., D. Speijer, C. H. Grün, M. van den Berg, A. de Haan, and F. Hochstenbach. 2004. Role of the α -glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell* **15**:3903–3914.
- Dekker, N., J. van Rijssel, B. Distel, and F. Hochstenbach. 2007. Role of the α -glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast* **24**:279–288.
- de Medina-Redondo, M., Y. Arnáiz-Pita, T. Fontaine, F. del Rey, J. P. Latgé, and C. R. Vázquez de Aldana. 2008. The β -1,3-glucanase *gas4p* is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **68**:1283–1299.
- Esteban, P. F., I. Ríos, R. García, E. Dueñas, J. Plá, M. Sánchez, C. R. Vázquez de Aldana, and F. del Rey. 2005. Characterization of the *CaENG1* gene encoding an endo-1,3- β -glucanase involved in cell separation in *Candida albicans*. *Curr. Microbiol.* **51**:385–392.
- Fliegmann, J., A. Mithofer, G. Wanner, and J. Ebel. 2004. An ancient enzyme domain hidden in the putative β -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J. Biol. Chem.* **279**:1132–1140.
- Fliegmann, J., E. Montel, A. Djulic, S. Cottaz, H. Driguez, and J. Ebel. 2005. Catalytic properties of the bifunctional soybean β -glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases. *FEBS Lett.* **579**:6647–6652.
- Fontaine, T., R. P. Hartland, A. Beauvais, M. Diaquin, and J. P. Latgé. 1997. Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Biochem.* **243**:315–321.
- García, I., D. Jiménez, V. Martín, A. Durán, and Y. Sánchez. 2005. The α -glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol. Cell* **97**:569–576.
- García, I., V. Tajadura, V. Martín, T. Toda, and Y. Sánchez. 2006. Synthesis of α -glucans in fission yeast spores is carried out by three α -glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol. Microbiol.* **59**:836–853.
- Hirata, A., and C. Shimoda. 1994. Structural modification of spindle pole bodies during meiosis II is essential for the normal formation of ascospores in *Schizosaccharomyces pombe*: ultrastructural analysis of *spo* mutants. *Yeast* **10**:173–183.
- Hochstenbach, F., F. M. Klis, H. van den Ende, E. van Donselaar, P. J. Peters, and R. D. Klausner. 1998. Identification of a putative α -glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9161–9166.
- Horisberger, M., and M. Rouver-Vauthey. 1985. Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* **41**:748–750.
- Humbel, B. M., M. Konomi, T. Takagi, N. Kamasawa, S. A. Ishijima, and M. Osumi. 2001. *In situ* localization of β -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**:433–444.
- Ito, H., K. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cation. *J. Bacteriol.* **153**:163–168.
- Liu, J., X. Tang, H. Wang, and M. Balasubramanian. 2000. Bgs2p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **478**:105–108.
- Manners, D. J., and M. T. Meyer. 1977. The molecular structures of some glucans from the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydr. Res.* **57**:189–203.
- Martín, V., J. C. Ribas, E. Carnero, A. Durán, and Y. Sánchez. 2000. *bgs2+*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol. Microbiol.* **38**:308–321.
- Martín-Cuadrado, A. B., E. Dueñas, M. Sipiczki, C. R. Vázquez de Aldana, and F. del Rey. 2003. The endo- β -1,3-glucanase Eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **116**:1689–1698.
- Martín-Cuadrado, A. B., J. Encinar del Dedo, M. de Medina-Redondo, T. Fontaine, F. del Rey, J. P. Latgé, and C. R. Vázquez de Aldana. 2008. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol. Microbiol.* **69**:188–200.
- Martín-Cuadrado, A. B., T. Fontaine, P. F. Esteban, J. Encinar del Dedo, M. de Medina-Redondo, F. del Rey, J. P. Latgé, and C. R. Vázquez de Aldana. 2008. Characterization of the endo- β -1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family. *Fungal Genet. Biol.* **45**:542–553.
- Martín-Cuadrado, A. B., J. L. Morrell, M. Konomi, H. An, C. Petit, M. Osumi, M. Balasubramanian, K. L. Gould, F. del Rey, and C. R. Vázquez de Aldana. 2005. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell* **16**:4867–4881.
- Mata, J., R. Lyne, G. Burns, and J. Bahler. 2002. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat. Genet.* **32**:143–147.
- Mata, J., A. Wilbrey, and J. Bahler. 2007. Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol.* **8**:R217.
- Matsuo, Y., K. Tanaka, H. Matsuda, and M. Kawamukai. 2005. *cdal+*, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **579**:2737–2743.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetics analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**:795–823.
- Mouyna, I., J. Sarfati, P. Recco, T. Fontaine, B. Henrissat, and J. P. Latgé. 2002. Molecular characterization of a cell wall-associated β (1-3)endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **40**:455–464.
- Rustici, G., J. Mata, K. Kivinen, P. Lió, C. J. Penkett, G. Burns, J. Hayles, A. Brazma, P. Nurse, and J. Bähler. 2004. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat. Genet.* **36**:809–817.
- Shimoda, C. 2004. Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J. Cell Sci.* **117**:389–396.
- Tanaka, K., and A. Hirata. 1982. Ascospore development in the fission yeasts *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*. *J. Cell Sci.* **56**:263–279.
- Wach, A. 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**:259–265.
- Wood, V., R. Gwilliam, M. A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles, S. Baker, D. Basham, S. Bowman, K. Brooks, D. Brown, S. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, M. Collins, R. Connor, A. Cronin, P. Davis, T. Feltwell, A. Fraser, S. Gentles, A. Goble, N. Hamlin, D. Harris, J. Hidalgo, G. Hodgson, S. Holroyd, T. Hornsby, S. Howarth, E. J. Huckle, S. Hunt, K. Jagels, K. James, L. Jones, M. Jones, S. Leather, S. McDonald, J. McLean, P. Mooney, S. Moule, K. Mungall, L. Murphy, D. Niblett, C. Odell, K. Oliver, S. O'Neil, D. Pearson, M. A. Quail, E. Rabinowitz, K. Rutherford, S. Rutter, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, J. Skelton, M. Simmonds, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, R. G. Taylor, A. Tivey, S. Walsh, T. Warren, S. Whitehead, J. Woodward, G. Volckaert, R. Aert, J. Robben, B. Grymonprez, I. Weltjens, E. Vanstreels, M. Rieger, M. Schafer, S. Muller-Auer, G. Gabel, M. Fuchs, C. Fritze, E. Holzer, D. Moestl, H. Hilbert, K. Borzym, I. Langer, A. Beck, H. Lehrach, R. Reinhardt, T. M. Pohl, P. Eger, W. Zimmermann, H. Wedler, R. Wambutt, B. Purnelle, A. Goffeau, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, V. Lelaure, S. Mottier, F. Galibert, S. J. Aves, Z. Xiang, C. Hunt, K. Moore, S. M. Hurst, M. Lucas, M. Rochet, C. Gaillardin, V. A. Tallada, A. Garzon, G. Thode, R. R. Daga, L. Cruzado, J. Jimenez, M. Sanchez, F. del Rey, J. Benito, A. Dominguez, J. L. Revuelta, S. Moreno, J. Armstrong, S. L. Forsburg, L. Cerrutti, T. Lowe, W. R. McCombie, I. Paulsen, J. Potashkin, G. V. Shpakovskii, D. Ussery, B. G. Barrell, and P. Nurse. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**:871–880.

Discusión

Discusión

Las glicosil hidrolasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, implicadas en la hidrólisis de enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y una molécula de naturaleza distinta. La familia 81 de las glicosil hidrolasas está formada por unas 80 proteínas (según CAZy) con actividad $\beta(1,3)$ -glucanasa, dentro de la cual se incluyen las proteínas eng1 y eng2 de *S. pombe*. Ambas contienen el dominio común de unos 650 aminoácidos característico de las proteínas de esta familia, y se ha demostrado que *in vitro* son capaces de llevar a cabo la endólisis de polisacáridos con glucosas unidas mediante enlaces $\beta(1,3)$ (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b). Sin embargo, existen diferencias en el patrón de expresión, localización y secuencia que apuntan a funciones diferentes en el ciclo de vida de *S. pombe*.

eng1⁺ presenta un patrón de expresión cíclico durante el crecimiento vegetativo, con un máximo que coincide con la septación, mientras que durante el ciclo sexual su expresión se va reduciendo paulatinamente. Por el contrario, *eng2*⁺ se expresa de forma constitutiva durante el crecimiento vegetativo pero se induce fuertemente durante el ciclo sexual. Otra diferencia entre eng1 y eng2 radica en las peculiaridades de su secuencia aminoacídica, ya que eng1 contiene en su extremo N-terminal una secuencia señal que le permite incorporarse a la ruta de secreción y un dominio adicional en el extremo C-terminal que contiene una región rica en treoninas y serinas con varias cisteínas y tirosinas conservadas, que ha sido identificada como un Dominio de Unión a Carbohidratos, necesario para su correcta localización en la región del septo (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008a; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005). Por su parte, eng2 no contiene ninguna secuencia señal de secreción y en su lugar presenta una región rica en prolinas con las características de los motivos de interacción con dominios SH3. Por ello, la proteína eng2 se localiza en el citoplasma de las células.

La función de eng1 ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años en nuestro laboratorio, habiéndose descrito que es la proteína responsable de la disolución controlada del septo primario durante el proceso de separación celular, lo que permite que las dos células surgidas de la mitosis se independicen (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). En este proceso, eng1 actúa de forma coordinada con la α -glucanasa agn1, que es la responsable de la hidrólisis del cilindro de pared celular que rodea al septo (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se conocía de la función de la proteína eng2 en *S. pombe* o de su homólogo en *S. cerevisiae* al comienzo del presente trabajo, salvo que en esta última levadura era una proteína citoplásmica (Baladrón *et al.*, 2002). Es por ello que en este trabajo se abordó la caracterización de la función de eng2 usando como modelo la levadura de fisión. Los resultados descritos en la presente Memoria permiten afirmar que eng2 desempeña no sólo una función en la levadura de fisión, sino dos funciones completamente diferentes dependiendo del momento del ciclo de vida. Así, durante el crecimiento vegetativo eng2 participa en el proceso de endocitosis junto con otro conjunto de proteínas, siendo necesaria para el desplazamiento del complejo arp2/3 hacia el interior del citoplasma, y para desempeñar esta función no se requiere la actividad catalítica de la proteína. Adicionalmente, eng2 también es necesaria durante las etapas finales del proceso de esporulación. En esta parte del ciclo, eng2 actúa como una verdadera glucanasa, hidrolizando los $\beta(1,3)$ glucanos de la pared celular del asca una vez que las esporas han madurado y permitiendo de esta manera su liberación. De forma similar a lo que ocurre en células vegetativas con eng1 y agn1, en la disolución de la pared celular de las ascas eng2 colabora con la α -glucanasa agn2, que hidrolizaría el $\alpha(1,3)$ glucano (Dekker *et al.*, 2007).

Estos resultados permiten considerar a la endoglucanasa eng2 como una nueva proteína bifuncional o proteína “moonlighting”. El término “moonlighting” hace referencia a proteínas “pluriempleadas” que desempeñan dos o más

funciones diferentes a partir de una única cadena peptídica. Quedan excluidas de este grupo aquellas proteínas que desempeñan funciones diferentes debido a la fusión de varios genes o que son el resultado de distintos tipos de procesamiento. Tampoco se incluyen dentro de esta categoría las proteínas que llevan a cabo la misma función en distintas localizaciones o tipos celulares, o distintas proteínas de una misma familia donde cada una de ellas realiza una única función (Gancedo y Flores, 2008; Jeffery, 1999; Jeffery, 2005; Jeffery, 2009). *eng2* muestra muchas de las características propias de las proteínas “*moonlighting*”, como por ejemplo variaciones en el nivel de expresión a lo largo del ciclo de vida, diferencias en la localización subcelular o en la capacidad para formar parte de distintos complejos. Así, durante el crecimiento vegetativo *eng2* localiza en puntos discretos en el citoplasma celular, mientras que durante la esporulación aparece de forma difusa en el epiplasma del asca rodeando las ascosporas. Otra característica que comparte con este grupo de proteínas es su capacidad para formar parte de distintos complejos. La localización como puntos en células vegetativas requiere de los motivos de interacción con proteínas SH3 (regiones ricas en Pro del extremo N-terminal), lo que indicaría que en esta fase del ciclo es importante la interacción con otras proteínas (como *Isb1*) para desempeñar correctamente su función, mientras que esta región es completamente dispensable durante el proceso de dehiscencia de las ascas, en la que actúa de forma coordinada con la $\alpha(1,3)$ -glucanasa *agn2*. Finalmente, el hecho de que la actividad endoglucanasa sea necesaria para desempeñar su función durante esporulación pero no en el proceso de endocitosis y crecimiento celular nos permite clasificar a *eng2* como una nueva proteína “*moonlighting*”.

eng2 interviene en la regulación del crecimiento polarizado en *S. pombe*

La proteína *eng2* ha sido incluida dentro de la familia GH81 en base a su secuencia y a su actividad $\beta(1,3)$ -endoglucanasa, presente

en la mayoría de los miembros estudiados pertenecientes a esta familia (Esteban *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b; McGrath *et al.*, 2009; McGrath y Wilson, 2006; Mouyna *et al.*, 2002). A pesar de ser una glucanasa necesaria para la dehiscencia de las esporas, el resultado más relevante del trabajo descrito en esta Memoria ha sido el determinar que *eng2* desempeña una función adicional durante el crecimiento vegetativo relacionada con el crecimiento celular y la endocitosis que no requiere la actividad catalítica.

Los resultados obtenidos indican que existen dos defectos fundamentales en los mutantes *eng2* Δ . En primer lugar, la proteína *eng2* parece estar relacionada con la regulación del crecimiento polarizado, ya que el mutante *eng2* Δ es incapaz de realizar NETO y cambiar el patrón de crecimiento de monopolar a bipolar. Al mismo tiempo, el nivel de expresión de *eng2*⁺ parece modular el crecimiento celular, ya que la delección produce células más cortas y anchas que las del silvestre mientras que su sobre-expresión genera células de mayor longitud. El segundo fenotipo observado es un defecto en el ensamblaje del citoesqueleto de actina y en la endocitosis. Cabe preguntarse, por tanto, si estos dos defectos son independientes y se deben a dos funciones diferentes de la proteína *eng2* o están relacionados, siendo uno de ellos consecuencia del otro. El mutante *eng2* Δ muestra un citoesqueleto de actina alterado, en el cual los parches están localizados de forma mayoritaria en uno de sus polos y al mismo tiempo los cables son más abundantes y desorganizados en comparación con una cepa silvestre. Esta distribución monopolar de los parches de actina no es debida a un retraso en el ciclo celular, ya que los ensayos con cultivos sincrónicos han demostrado que la progresión por el ciclo celular del mutante *cdc10-129 eng2* Δ es idéntica a la de la cepa *cdc10-129*, produciéndose la citoquinesis al mismo tiempo. Por otra parte, la sobre-expresión de *eng2*⁺ también muestra un citoesqueleto de actina ligeramente alterado, en el que los parches están distribuidos de forma más homogénea a lo largo de la célula en lugar de estar concentrados

en las regiones de crecimiento activo. Como ya se ha comentado, estas variaciones en el nivel de expresión de *eng2* se traducen en cambios en el tamaño de las células, siendo las células del mutante *eng2Δ* más cortas y anchas que las del silvestre. Es interesante que estos defectos también han sido descritos para otros mutantes afectados en distintas etapas de la endocitosis, como *end4Δ* o *btn1Δ* (Castagnetti *et al.*, 2005; Codlin *et al.*, 2008; Iwaki *et al.*, 2004), en los que las células también son más cortas y anchas que las de la cepa silvestre. Otro defecto característico de los mutantes de endocitosis es la alteración de la organización de los lípidos de membrana o “*lipid-rafts*” (Attanapola *et al.*, 2009; Codlin *et al.*, 2008; Iwaki *et al.*, 2004; Takeda y Chang, 2005). Los ensayos *in vivo* de internalización del colorante FM4-64 y la tinción con filipina indican que el mutante *eng2Δ* también presenta una distribución anormal de estos lípidos, perdiéndose su localización específica en los polos de la célula. Esta alteración en el patrón de distribución de los lípidos de membrana posiblemente sea una consecuencia derivada de los defectos en endocitosis, como ocurre en los mutantes *end4Δ*, *myo1Δ* o *btn1Δ* (Attanapola *et al.*, 2009; Codlin *et al.*, 2008; Iwaki *et al.*, 2004). También se ha descrito que las células carentes de *btn1*, el ortólogo del gen que produce la enfermedad de Batten en humanos y que es necesario para la endocitosis en *S. pombe*, son mayoritariamente monopolares y presentan un defecto en NETO (Codlin *et al.*, 2008). Es posible, por tanto, que

el defecto primario del mutante *eng2Δ* sea un defecto en la endocitosis, y que los cambios en el patrón de crecimiento y el tamaño celular sean una consecuencia de la incapacidad para realizar la endocitosis de forma correcta.

En *S. pombe*, se ha descrito que la mutación de numerosos genes relacionados con el crecimiento celular producen modificaciones en el patrón de crecimiento y la organización del citoesqueleto de actina (Das *et al.*, 2007; Feierbach y Chang, 2001; Glynn *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2000; Martin y Chang, 2005; Martin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2007b; Nakano y Mabuchi, 2006a; Rincón *et al.*, 2009). Dependiendo de la función que desempeñan las distintas proteínas, se han descrito diferentes patrones de crecimiento (Fig. 65). Así, los mutantes carentes de proteínas que actúan como marcadores de polaridad (*tea1Δ* o *tea4Δ*) presentan un patrón de crecimiento en el que tras la división celular una de las células hijas crece por el polo viejo mientras que la otra crece por el polo nuevo (Martin *et al.*, 2005; Snaith *et al.*, 2005). Este patrón también ha sido observado en el mutante *tea3Δ* y en menor medida en el mutante *mod5Δ*, cuyas proteínas están implicadas en el establecimiento de los polos de crecimiento (Snaith *et al.*, 2005). En el mutante *for3Δ* -carente de la formina que nuclea los cables de actina- tras la división, una célula hija crece por el polo viejo mientras que la otra crece por ambos polos (Feierbach y Chang, 2001). Otra proteína implicada en el crecimiento

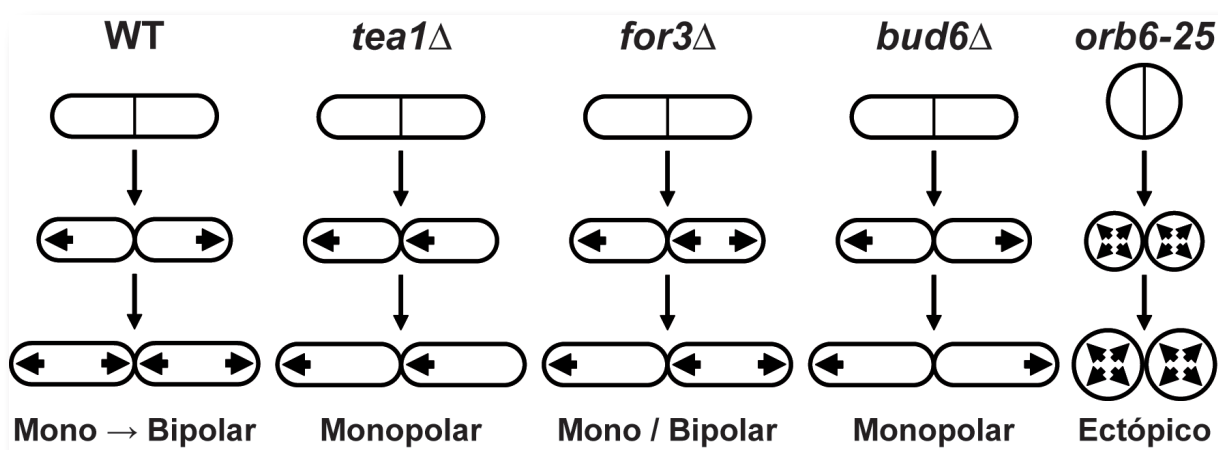


Figura 65.- Patrón de crecimiento de mutantes de polaridad en *S. pombe*.

celular y cuyo ausencia produce un patrón alterado es bud6. En el mutante *bud6Δ*, tras la división celular aproximadamente un 50% de las células son incapaces de llevar a cabo el NETO, manteniendo un patrón monopolar a lo largo de todo el ciclo (Glynn *et al.*, 2001). Finalmente, existe otro grupo de mutantes que son completamente incapaces de polarizar el crecimiento, por lo que crecen de manera isodiamétrica generando células redondeadas o abombadas, como ocurre en mutantes *orb6-25*, *cdc42-879*, *cdc42-1625* o cuando se reprime el gen *nak1⁺* (Huang *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2007b; Rincón *et al.*, 2009; Verde *et al.*, 1998). El patrón de crecimiento de otros mutantes afectados en endocitosis no ha sido analizado con detalle, por lo que no es posible compararlo con el del mutante *eng2Δ*, que presenta un patrón de crecimiento similar al del mutante *bud6Δ*, con un 60-70% de células incapaces de llevar a cabo el NETO. La proteína bud6 es necesaria para la activación y localización de la formina for3 y su delección presenta ligeros defectos en la localización de for3 en los polos, con cables de actina menos aparentes. Estos fenotipos pueden ser complementados por la versión “hiperactiva” de for3 que presenta una mutación puntual en el dominio DAD (for3-DAD*), lo que indica que bud6 colabora en la eliminación de la autoinhibición de for3 y que los defectos observados se deben a una incompleta activación de for3 (Martin *et al.*, 2007b). La proteína eng2 no parece estar relacionada de forma directa con for3, ya que la delección de *eng2⁺* no afecta a su localización, y en principio tampoco parece afectar a su actividad, ya que es capaz de formar cables más abundantes, aunque desorganizados, que una cepa silvestre, lo que podría indicar que la formina está más activa. Este defecto en la organización de los cables de actina podría ser una consecuencia de una menor actividad del complejo arp2/3. En *S. cerevisiae* se ha descrito la existencia de un mecanismo compensatorio entre los diferentes modos de organización de la actina en la célula, de tal manera que la sobre-expresión de una versión “hiperactiva” de una de sus forminas (Bnr1ΔRBD) causa la muerte celular debido a la masiva acumulación

de cables de actina. Este fenotipo de lisis celular puede complementarse por la sobre-expresión de proteínas relacionadas con el ensamblaje de los cables (tropomiosinas), el reciclaje de la actina (cofilina) o la activación del complejo arp2/3 (Las17/Bee1) (Gao y Bretscher, 2008). Por ello, la acumulación de cables de actina en el mutante *eng2Δ* podría deberse a una mayor actividad de la formina for3 en la célula al existir un mayor número de monómeros de actina libres en el citoplasma. Sin embargo, estas observaciones no explican los posibles defectos en la activación de for3 en el polo nuevo de la célula en el mutante *eng2Δ*. La localización monopolar de la miosina de Clase V myo52, implicada en la secreción polarizada y cuya delección produce una desorganización del citoesqueleto de actina y un crecimiento ectópico (Win *et al.*, 2001), indica que la secreción polarizada también se encuentra alterada en este mutante, y con ello las proteínas que necesitan de ella, como bgs4. La explicación más sencilla es que la desorganización del citoesqueleto de actina impida la llegada de myo52 y sus cargos (entre los que se encuentra bgs4) al polo nuevo, imposibilitando la activación del crecimiento en el mismo. Otra posibilidad para explicar el defecto en NETO del mutante *eng2Δ* podría ser que alguna de las proteínas implicadas en la activación de la formina for3 fuera incapaz de llegar al polo nuevo debido a los defectos de secreción. De hecho, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que el aparato secretor es necesario para la localización de Bud6 (Goode y Eck, 2007; Jin y Amberg, 2000). De esta manera, sólo las moléculas de for3 localizadas en el polo viejo estarían activas y funcionales, mientras que las localizadas en el polo nuevo estarían inactivas. Será necesario analizar los efectos de la expresión del alelo “hiperactivo” de for3 y su capacidad para complementar el fenotipo del mutante *eng2Δ* para validar esta hipótesis.

Otra posibilidad para explicar estas observaciones es que la endocitosis participe de forma activa en el crecimiento polarizado. De hecho, trabajos muy recientes en *S. cerevisiae* han demostrado que existe un crecimiento polarizado de la yema en células que presentan las forminas deslocalizadas o ausentes gracias al reciclaje

de las vesículas endocíticas (Gao y Bretscher, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010). Por ello, serían necesarios experimentos adicionales para determinar si este mecanismo también existe en *S. pombe* antes de poder concluir si el defecto de crecimiento en el mutante *eng2Δ* es debido a la alteración del citoesqueleto de actina, la secreción polarizada o la endocitosis.

eng2, una nueva proteína implicada en el proceso de endocitosis

La endocitosis es un proceso complejo que requiere de la modificación de la estructura lipídica de la membrana celular y el reclutamiento secuencial de una serie de proteínas que generan una invaginación de la membrana, que en último término va a dar lugar a una vesícula endocítica mediante un proceso de escisión (Gachet y Hyams, 2005; Kaksonen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). La idea de que los parches de actina son los sitios en los que ocurre la endocitosis en las células está ampliamente aceptada hoy en día (Galletta y Cooper, 2009; Kaksonen *et al.*, 2005; Moseley y Goode, 2006; Robertson *et al.*, 2009b). Mediante estudios de microscopía *in vivo* de los distintos componentes, se ha propuesto un modelo en el que existirían cinco módulos que se ensamblan de forma dinámica y cooperan en la formación de la vesícula (Galletta y Cooper, 2009; Kaksonen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). Las proteínas de los distintos módulos llegan de forma secuencial a los sitios de endocitosis con una cinética estrictamente regulada y su ensamblaje es necesario para la internalización de la vesícula endocítica. En primer lugar se produce la acumulación de PIP₂ en una región concreta de la membrana plasmática que comienzan a reclutar a las proteínas de la cubierta, (los componentes más representativos de este módulo son la clatrina y otras proteínas como Sla1, Sla2, End3 y Pan1) que se acumulan en la región donde se va a formar la vesícula, generando una curvatura en la membrana. El segundo módulo, denominado módulo WASP/MYO, contiene a las proteínas de la familia WASP y las miosinas de Clase I, siendo responsable de la activación del

complejo arp2/3 que inicia la polimerización de la actina. Recientemente, proteínas de este módulo también han sido relacionadas con la invaginación de la vesícula y la escisión de la misma (Idrissi *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2006). El módulo de la actina contiene las proteínas responsables de la polimerización de la actina y de generar la fuerza necesaria para la invaginación de la vesícula, siendo sus componentes más destacados la actina y el complejo arp2/3. Finalmente, el módulo de escisión, que incluye las proteínas Rvs161 y Rvs167 en *S. cerevisiae*, es el responsable de la separación de la vesícula, siendo el último módulo de proteínas en llegar al sitio de endocitosis. Adicionalmente, existe una familia de proteínas, conocida como Lsb (por “*Las17 Binding Proteins*”), que ha sido relacionada con la organización del citoesqueleto de actina, el tráfico de membranas y la endocitosis, aunque su función concreta en este proceso no se conoce (Costa y Ayscough, 2005; Costa *et al.*, 2005; Dewar *et al.*, 2002; Madania *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2009a). Algunas de estas proteínas (Lsb3 y Lsb4) podrían formar parte de un módulo responsable de la coordinación de los procesos de endocitosis (Tonikian *et al.*, 2009). Además, las proteínas Lsb presentan dominios SH3 de interacción proteína-proteína, habiéndose demostrado la interacción con otras proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina (Lsb4-Sla1, Lsb3-Sla1, Lsb4-Las17/Bee1) (Dewar *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido identificar a la glucanasa *eng2* como una nueva proteína que participa en el proceso de endocitosis en *S. pombe*. Estudios de proteómica y microscopía *in vivo* con diferentes proteínas fluorescentes indican que *eng2* interacciona con varias proteínas implicadas en la endocitosis, siendo necesaria para el movimiento del complejo arp2/3 hacia el interior de la célula. En el modelo actual aceptado de la endocitosis, este movimiento se corresponde con el desplazamiento de las vesículas endocíticas hacia el interior del citoplasma, que eventualmente se fusionan con los endosomas antes del desensamblaje de la actina (Galletta

y Cooper, 2009). En el presente trabajo se ha demostrado que eng2 y lsb1 colocalizan durante el ciclo vegetativo formando un complejo implicado en los procesos de endocitosis. Además, estas proteínas y el complejo arp2/3 colocalizan durante el desplazamiento del complejo desde la membrana plasmática hacia el interior celular y que la ausencia de eng2 provoca graves defectos en este movimiento. La colocalización de eng2 con lsb1 a lo largo del ciclo celular indica que eng2 es un nuevo componente del módulo de proteínas lsb en *S. pombe*. Aunque los fenotipos de los mutantes *lsbΔ* en la levadura de fisión no han sido analizados, los resultados aquí obtenidos parecen indicar que el módulo lsb-eng2 participaría en las etapas finales de la endocitosis, siendo necesario para la escisión de la vesícula y su internalización.

A pesar de que no se han obtenido datos sobre la interacción física de eng2 con lsb1 que permitan afirmar de forma inequívoca que estas dos proteínas se asocian en un complejo, existen varias evidencias en *S. cerevisiae* que indican que esto podría ser cierto. La levadura de gemación posee en su genoma una proteína ortóloga a eng2 de *S. pombe*, denominada Acf2 o Eng2, ya que fue identificada como un factor necesario para el ensamblaje de los parches de actina en un ensayo *in vitro* (y por ello se denominó Acf2, de *Assembly Complementing Factor*) y como una proteína con actividad $\beta(1,3)$ -endoglucanasa (Baladrón *et al.*, 2002; Lechler y Li, 1997). Las distintas aproximaciones que se han desarrollado en los últimos años en *S. cerevisiae* para identificar interacciones entre proteínas a escala genómica, bien mediante la técnica de los dos híbridos o bien por la purificación de complejos de proteínas, han permitido identificar un conjunto numeroso de proteínas que muestran interacciones con Eng2 y que aportan algunas claves sobre la posible función de esta proteína en *S. cerevisiae* (Drees *et al.*, 2001; Germann *et al.*, 2005; Krogan *et al.*, 2006; Tarassov *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2002). En la Figura 66 se muestra un esquema de las distintas interacciones descritas en estos análisis. Como puede observarse, dentro del grupo de proteínas que participan en los distintos pasos

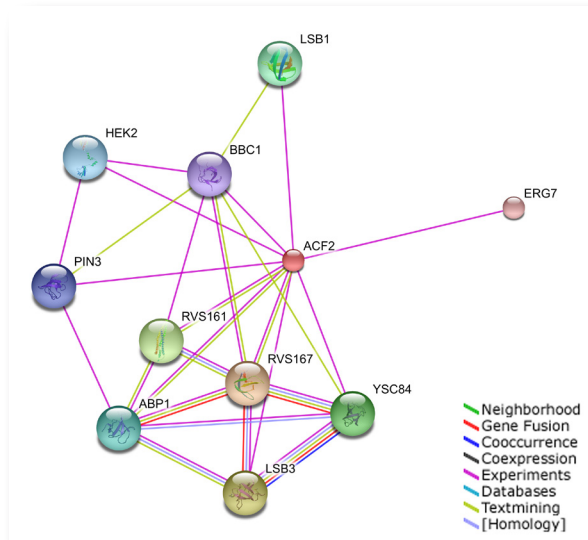


Figura 66.- Red de interacciones descritas para Acf2/Eng2 en *S. cerevisiae*. Imagen generada a partir de la información contenida en la base de datos STRING 8.2.

del proceso de endocitosis, parece que Eng2/Acf2 interacciona con las proteínas Lsb y los componentes del módulo de escisión (Rvs161 y Rvs167). Adicionalmente, recientemente se ha publicado un estudio en el que se describe el mapa de interacciones de todos los dominios SH3 de *S. cerevisiae* con otras proteínas (Tonikian *et al.*, 2009). Los dominios SH3 son pequeños módulos formados por unos 50 aminoácidos organizados en forma de barril β parcialmente abierto y que se encuentran presentes en una gran variedad de proteínas relacionadas con la transducción de señales y la organización del citoesqueleto. Los dominios SH3 se unen de forma específica a regiones ricas en prolina con el consenso RxxPxxP (Clase I) o PxxPxR (Clase II), aunque en ocasiones residuos situados fuera del núcleo contribuyen a la especificidad de unión de forma importante (Mayer, 2001). En el trabajo de Tonikian y colaboradores (2009), se han identificado las proteínas que contienen regiones ricas en prolina capaces de interactuar con cada dominio SH3 mediante varias aproximaciones experimentales, y las distintas interacciones detectadas fueron cuantificadas asignándoles un valor de puntuación normalizado, de tal manera que esta puntuación refleja la afinidad de un dominio SH3 determinado por las distintas proteínas con motivos de unión. Eng2/Acf2 fue

identificada como una de las proteínas capaces de interactuar con distintos dominios SH3, presentando las puntuaciones normalizadas más elevadas con los dominios SH3 de Lsb3, Lsb4, Pin3 (Lsb2) y Rvs167, lo que indicaría que posiblemente es capaz de interactuar con este grupo de proteínas.

Algunas de estas interacciones han sido confirmadas mediante ensayos de inmunoprecipitación, o TAP (*Tandem Affinity Purification*) (Drees *et al.*, 2001; Germann *et al.*, 2005). Así, mediante coimmunoprecipitación se ha demostrado que Eng2/Acf2 y Rvs167 interactúan de forma independiente a Rvs161. Ensayos de dos-híbridos sugieren que la interacción Eng2-Rvs167 está mediada por el dominio SH3 de Rvs167 y la región rica en prolinas del extremo N-terminal de Eng2/Acf2. Rvs167 y Rvs161 son las únicas proteínas de la Familia BAR de *S. cerevisiae*. Estas proteínas forman un heterodímero capaz de unirse a los lípidos de membrana y está implicado en la regulación del citoesqueleto de actina y la endocitosis. *In vivo*, el complejo Rvs167-Rvs161 ha sido relacionado con el proceso de escisión de la vesícula durante la endocitosis (Friesen *et al.*, 2006; Kaksonen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 1997). Los mutantes *rvs167Δ* y *rvs161Δ* comparten algunos fenotipos, como la incapacidad para crecer en medios limitantes en nutrientes o en condiciones de estrés salino, defectos en la organización del citoesqueleto de actina y fallos en el proceso de endocitosis (Munn *et al.*, 1995; Sivadon *et al.*, 1995). Por otra parte, las proteínas Lsb han sido relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina, el tráfico de membranas y la endocitosis (Costa y Ayscough, 2005; Costa *et al.*, 2005; Dewar *et al.*, 2002; Madania *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2009a). Además, podrían estar involucradas en el reclutamiento y ensamblaje de varios complejos implicados en los procesos de endocitosis a través de interacciones mediadas por sus dominios SH3 (Tonikian *et al.*, 2009; Toret *et al.*, 2008).

Localización de eng2 durante el ciclo vegetativo

Una característica notable de la proteína eng2 es su localización como puntos altamente dinámicos en el citoplasma de la célula durante el ciclo vegetativo. Mediante experimentos de microscopía *in vivo* a lo largo del tiempo (“*time-lapse*”), hemos comprobado que eng2 presenta dos tipos de movimientos, unos aleatorios y de corto recorrido en regiones próximas a los polos de la célula o en torno al septo, que se combinan con desplazamientos largos de polo a polo de la célula. A pesar de que eng2 es necesaria para la activación del crecimiento en el polo nuevo, no ha sido posible correlacionar el desplazamiento de eng2 al polo nuevo con NETO, lo que indicaría que eng2 no está directamente relacionada con este proceso. Los movimientos de largo recorrido son completamente dependientes de los cables de actina pero no dependen de la miosina de Clase V myo52. Ya que no existe ningún dominio motor en la secuencia de eng2 que le permita desplazarse a través de los cables de actina, cabe pensar que debería estar asociada a otras proteínas con dominios motores, como las miosinas de Clase II rlc1 o myp2, que también localizan como puntos móviles en el citoplasma (Coffman *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006). Además existen otra serie de proteínas, como la proteína lsb1 o la formina cdc12 durante interfase, que presentan un patrón de localización similar a eng2 (Coffman *et al.*, 2009; Chang, 1999; Matsuyama *et al.*, 2006; Yonetani *et al.*, 2008). Mediante experimentos de microscopía *in vivo*, hemos demostrado que eng2 únicamente colocaliza con la proteína lsb1, y que cdc12 y rlc1 se localizan en otros puntos que no contienen eng2. Por tanto, debe existir alguna proteína adicional no identificada en el complejo eng2-lsb1 que proporcione la fuerza motora necesaria para el movimiento sobre los cables de actina.

El análisis de distintas versiones truncadas de la proteína eng2 ha permitido determinar que el extremo N-terminal de eng2 desempeña un papel

esencial en su función durante el crecimiento vegetativo, tanto en la localización como en la actividad biológica. El motivo más característico presente en esta región es una zona rica en prolinas (PVF**PSRAHPSP**PLGL) que se ajusta perfectamente a los motivos de interacción con dominios SH3 (Mayer, 2001; Tong *et al.*, 2002; Tonikian *et al.*, 2009). Estos motivos PxxPxR o RxxPxxP están conservados en la proteína Eng2/Acf2 de *S. cerevisiae* y en wsp1 de *S. pombe*, lo que podría indicar que interactúan con el mismo dominio SH3. Como se ha comentado en apartados anteriores, varias proteínas relacionadas con la activación del complejo arp2/3 y los procesos de endocitosis presentan dominios SH3 (Tabla 1, negrita subrayado), y para algunas de ellas ya se tienen evidencias experimentales de su interacción y su implicación en el control del citoesqueleto de actina (Huang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2005). Para otras, a pesar de no tener evidencias

experimentales definitivas, el estudio de sus dominios, interacciones y/o localización han llevado a pensar en su implicación en estos procesos (Matsuyama *et al.*, 2006; Tonikian *et al.*, 2009). El hecho de que la delección de los primeros 40 aminoácidos de eng2 eliminara completamente la localización de esta proteína en forma de puntos, junto con las interacciones descritas en *S. cerevisiae*, nos llevó a analizar si eng2 colocalizaba con otras proteínas SH3, especialmente las proteínas lsb. Los resultados obtenidos indican que eng2 se localiza junto con lsb1 en forma de puntos dinámicos que se mueven en el citoplasma celular, lo que indica que estas dos proteínas podrían formar un complejo.

Un estudio detallado de la región N-terminal de eng2 reveló que los primeros 40 residuos de la proteína son esenciales para su localización, y que sólo cuando todos ellos se eliminan eng2 pierde completamente su funcionalidad. La delección de la región PVF**PSRAHPSP**PLGL

| Proteína | Función | Sc |
|--|--|---------------------------------------|
| cdc15 imp2 | Cell division control protein 15 Septation protein Imp2 | Hof1 Hof1 |
| cyk3 skb5 pob1 | Cytokinesis protein Cyk3 Shk1 kinase-binding protein 5 Protein Pob1 (Boi protein homolog) | Cyk3 Nbp2 Boi1 Boi2 Bud14 |
| tea4 | Tip elongation aberrant protein Tea4 | Bud14 |
| scd2 | Required for mating and morphogenesis. Interacts directly with scd1 and with cdc42. | Bem1 |
| Shd1 myo1 | (homolog of Sla1) Myosin-1 (myosin type I) | Sla1 Myo3 Myo5 Bbc1 Bzz1 |
| SPAC23A1.17 bzz1/lsb7 | WIP (Wiskott-Aldrich syndrome protein Interacting Protein) Diacylglycerol binding protein Bzz1 | Bbc1 Bzz1 |
| app1 | Protein App1 (homolog of Abp1) | Abp1 |
| csh3 | Wiskott-Aldrich syndrome homolog binding protein Lsb1 (predicted) | Pin3 Lsb1 |
| lsb4 SPAPJ696.02 | Actin cortical patch component Lsb4 | Lsb3 Ysc84 (Lsb4) |
| hob1 ste6 pex13 hse1 meu137 SPAC7D4.02c SPBC19C2.10 | Protein Hob1 Protein Ste6 Peroxisomal membrane protein Pex13 (peroxin-13) Class E vacuolar protein-sorting machinery protein Hse1 Meiotically up-regulated gene 137 protein SH3 domain-containing protein c7d4.02c SH3 domain-containing protein c19c2.10 | Rvs167 Cdc25 Pex13 Hse1 |

Tabla 2.- Proteínas que contienen dominios SH3 en *S. pombe* y su ortólogo en *S. cerevisiae*.

resulta en una pérdida parcial de su localización y actividad, lo que indica que algunos residuos adyacentes contribuyen a la interacción con los dominios SH3. Resultados similares han sido descritos para otras proteínas, en las que aminoácidos situados fuera del motivo PxxPxR o RxxPxxP contribuyen de manera importante a la especificidad de la interacción (Mayer, 2001; Tonikian *et al.*, 2009). Adicionalmente, la delección de la región “todo α ” que contiene el dominio catalítico de las proteínas GH81 (*eng2 Δ 348-706*) también fue incapaz de complementar totalmente el defecto de crecimiento del mutante *eng2 Δ* , aunque la actividad glucanasa es prescindible. Estos resultados indican que durante el crecimiento vegetativo este dominio podría ser necesario para la interacción con otras proteínas del complejo. La pérdida parcial de la localización de *eng2* en forma de puntos en el mutante *lsb1 Δ* indica que deben existir otras proteínas en el complejo *eng2-lsb1*, y apoyaría la idea de que distintas regiones de *eng2* establecen contactos con las distintas proteínas del complejo. Alternativamente, es posible que alguna de las proteínas del complejo también contenga dominios SH3, como por ejemplo *lsb4*, con las que podría interactuar *eng2* en ausencia de *lsb1*. En todo caso, los resultados descritos en el presente trabajo indican que *eng2* y *lsb1* se asocian en una estructura en forma de puntos que es muy estable durante todo el ciclo celular y al mismo tiempo presenta un gran dinamismo, moviéndose de forma continua en el citoplasma de la célula.

eng2 y el complejo arp2/3

Como se ha comentado en la Introducción, el complejo arp2/3 es una pieza clave en el proceso de endocitosis en levaduras, ya que su función esencial es la de generar, junto con las miosinas de Clase I, la fuerza motriz necesaria para la invaginación de la vesícula y su escisión (Girao *et al.*, 2008; Idrissi *et al.*, 2008; Pollard, 2007; Robertson *et al.*, 2009b; Sun *et al.*, 2006). En células eucariotas superiores, la dinamina desempeña un papel esencial en la separación de la vesícula de la membrana plasmática,

sin embargo en levaduras las vesículas endocíticas se forman en ausencia de esta proteína. Recientemente se ha propuesto que la miosina de Clase I Myo5 podría llevar a cabo esta función (Idrissi *et al.*, 2008). Estudios de numerosos laboratorios han puesto de manifiesto que el complejo arp2/3 actúa como nucleador de polimerización de actina en los parches, promoviendo la ramificación de los filamentos de actina a partir de un filamento existente, lo que permite la formación de las intrincadas redes de actina presentes en los parches (Moreau *et al.*, 1996; Moseley y Goode, 2006; Pollard, 2007; Winter *et al.*, 1997; Winter *et al.*, 1999b). Usando como anclaje a distintas proteínas (del módulo de la cubierta, familia WASP y posiblemente una pequeña red de actina), la polimerización de la actina por parte del complejo arp2/3, junto con la fuerza motora de las miosinas, empuja y deforma la membrana formando una invaginación en forma de tubo. Varias evidencias obtenidas a lo largo del presente trabajo indican que *eng2* está relacionada con el complejo arp2/3 en *S. pombe*. En primer lugar, ensayos de inmunoprecipitación apuntan a que *eng2* interactúa de forma directa con la subunidad arpC2. En segundo lugar, la localización de otra de las subunidades de este complejo (arpC5) presenta un patrón anormal en el mutante *eng2 Δ* , disponiéndose de forma simétrica en toda la célula en lugar de concentrarse en los polos. Además, en este mutante la movilidad y la vida media del complejo arp2/3 están alteradas en comparación con la cepa silvestre. Finalmente, mediante ensayos de microscopía *in vivo* a lo largo del tiempo se ha mostrado que *eng2* y arpC5 colocalizan de forma transitoria en la membrana plasmática y ha permitido establecer un patrón temporal de la interacción entre *eng2*, arpC5 y distintas proteínas reguladoras del complejo arp2/3.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *eng2* y *lsb1* (y posiblemente otras proteínas) forman parte de un complejo que interviene en la regulación del complejo arp2/3 y por extensión en el proceso de endocitosis, aunque los detalles del mecanismo molecular de su función todavía no están claros. Los ensayos

de inmunoprecipitación llevados a cabo apuntan a que eng2 podría interactuar de forma directa con el complejo arp2/3, concretamente con la subunidad arpC2. Basándonos en esta interacción y en el modelo propuesto por Rodal y colaboradores en 2005 sobre los distintos cambios conformacionales del complejo arp2/3, es posible especular una posible función de eng2 sobre este complejo. Estos autores han descrito la existencia de tres conformaciones diferentes del complejo arp2/3, denominadas abierta, intermedia o cerrada que están relacionadas con su activación (Fig. 16). Así, la conformación cerrada del complejo corresponde al estado activo y depende de la interacción con las proteínas de la familia WASP. WASP interactúa con las subunidades arpC1, arp2 y arp3 del complejo. Por el contrario, la conformación abierta corresponde con el estado inactivo y se establece cuando la coronina (inhibidor del complejo y necesaria para el reciclaje de la actina) interactúa con la subunidad arpC2. La conformación intermedia se ha considerado como una transición entre el estado activo y el inactivo (Rodal *et al.*, 2005b). Trabajos posteriores han confirmado que estos cambios conformacionales, tanto en el complejo arp2/3 como en el filamento madre de actina, son importantes para el correcto funcionamiento de la macroestructura (Rouiller *et al.*, 2008). El hecho de que eng2 interactúe con la subunidad arpC2 del complejo permite plantear la posibilidad de que eng2-Isb1 se unan al complejo arp2/3, estabilizándolo en el estado intermedio e impidiendo su desensamblaje prematuro e inactivación por la acción de la coronina (Fig.

67). Varias evidencias apoyan esta hipótesis. En primer lugar, el patrón secuencial de localización de las proteínas wsp1, eng2 y crn1 con la subunidad arpC5 en ensayos de microscopía *in vivo* indica que wsp1 es la primera proteína en aparecer en la membrana celular, seguida del complejo eng2-Isb1 e inmediatamente después comienza a ensamblarse el complejo arp2/3. Estas proteínas permanecen juntas durante unos segundos cerca de la membrana plasmática hasta que ocurre el desensamblaje de wsp1 y el movimiento de eng2-Isb1 y arp2/3 hacia el interior celular. Finalmente, se observa la separación de eng2-Isb1 del complejo arp2/3, casi coincidente con el momento en que crn1 comienza a colocalizar de forma evidente con el complejo arp2/3. El análisis del comportamiento de la localización de eng2 y crn1 en distintos parches y distintas células parece indicar que la asociación de eng2 y crn1 con arp2/3 puede ser mutuamente excluyente, de tal manera que mientras eng2 está interactuando con el complejo arp2/3 impediría la unión de la coronina, y una vez que crn1 se ensambla con el complejo desplaza a eng2, iniciando la inactivación de arp2/3. Una segunda evidencia que apoya esta hipótesis es el hecho de que la vida media del complejo arp2/3 es menor en el mutante *eng2Δ* ($12,5 \pm 2,8$ s) que en la cepa silvestre ($17,5 \pm 2,2$ s). Esto puede ser interpretado como que la ausencia de eng2 permite que crn1 se una antes de lo debido a la subunidad arpC2, cambiándolo a la conformación cerrada de forma prematura y desorganizando el complejo arp2/3. Por tanto, es posible que la función del complejo eng2-Isb1 sea regular la

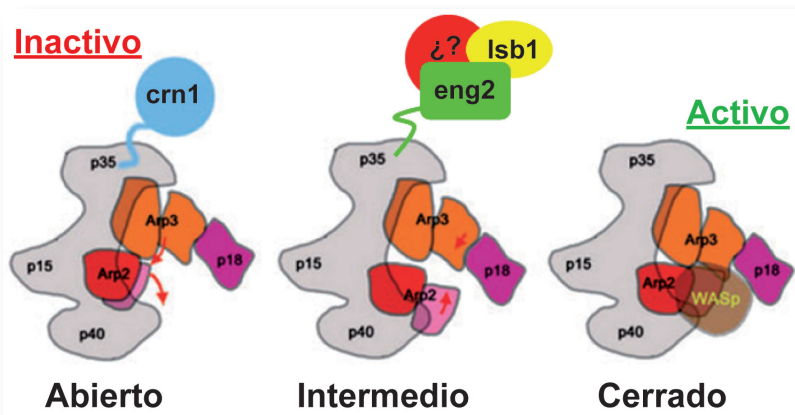


Figura 67.- Modelo propuesto por Rodal y colaboradores para la activación del complejo arp2/3.

actividad de arp2/3, manteniéndose unido al mismo durante su estado intermedio, impidiendo la unión prematura de la coronina y retrasando el desensamblaje del mismo (Fig. 67).

En adición a la disminución de la vida media del complejo arp2/3, la ausencia de eng2 también produce un claro defecto en su movilidad hacia el interior de la célula, movimiento que corresponde con el desplazamiento de la vesícula endocítica hacia el citoplasma. Este defecto podría explicarse de varias maneras. La primera posibilidad es que la reducción en la vida media del complejo arp2/3 resulte en una menor polimerización de actina en los parches, reduciendo la fuerza que genera el citoesqueleto de actina en la invaginación de la membrana. Se ha demostrado que durante la endocitosis el citoesqueleto de actina, junto a la actividad motora de las miosinas, es imprescindible para generar la fuerza motora necesaria para crear la invaginación de la membrana plasmática que acabará dando lugar a la vesícula endocítica (Kaksonen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009b; Sun *et al.*, 2006). Además, trabajos recientes han propuesto que las miosinas de Clase I podrían desempeñar una función adicional durante el proceso de escisión de la vesícula mediante la formación de una estructura en forma de anillo contráctil, con una función similar a la descrita para la dinamina en células animales (Idrissi *et al.*, 2008; Kaksonen, 2008). La disminución de la vida media del complejo arp2/3 en el mutante *eng2Δ* podría hacer que la fuerza generada por el citoesqueleto de actina no fuera suficiente para que se produjera una correcta invaginación, reduciendo la eficiencia de la endocitosis. Una segunda posibilidad es que la delección de *eng2*⁺ afecte al ensamblaje de las proteínas del módulo de escisión en la invaginación de la membrana, reduciendo la eficiencia de este proceso. De hecho, estudios recientes sugieren que las proteínas Lsb3 y Lsb4 de *S. cerevisiae* podrían funcionar agrupando y coordinando las actividades de los componentes de los distintos módulos en el sitio de endocitosis (Tonikian *et al.*, 2009). Además, en este organismo se ha descrito que las proteínas Rvs167 y Rvs161 participan en el proceso de

escisión de la vesícula durante la endocitosis y se han observado interacciones directas entre Eng2/Acf2 y Rvs167 mediante ensayos de dos híbridos y co-inmunoprecipitación (Friesen *et al.*, 2006; Germann *et al.*, 2005; Kaksonen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 1997). Estos resultados podrían indicar que Eng2/Acf2 está implicada en el proceso de escisión a través de su interacción con Rvs167. En *S. pombe*, el complejo eng2-lsb1 podría desempeñar un papel similar coordinando y manteniendo la estabilidad de los distintos módulos. Sin embargo, la proteína hob1 (ortólogo de Rvs167) parece estar implicada en la regulación del crecimiento polarizado a través de nak1 y wsp1 (Huang *et al.*, 2005), pero su papel en la endocitosis no está claro (Routhier *et al.*, 2003). Un estudio detallado de las posibles interacciones entre hob1 y eng2, y su papel durante los procesos de endocitosis será necesario para confirmar si el defecto observado en el mutante *eng2Δ* es debido a su relación con hob1. Finalmente, la última posibilidad para explicar la disminución de la vida media del complejo arp2/3 en el mutante *eng2Δ* es que el complejo lsb1-eng2 tenga un papel directo en la nucleación y polimerización de la actina. Esta posibilidad se basa en los resultados descritos recientemente para la proteína Lsb4 de *S. cerevisiae*. En este organismo, se ha encontrado que la proteína Lsb4 (Ysc84) tiene la capacidad de unir actina y promover la polimerización de filamentos de actina cuando interacciona mediante su dominio SH3 con una de las regiones ricas en prolinas de Las17, y se ha propuesto que Ysc84 contribuiría a los estados iniciales de la polimerización de la actina necesarios para la primera invaginación de la membrana (Robertson *et al.*, 2009a). El hecho de que en *S. pombe* lsb1 contenga un dominio SH3 y eng2 una región rica en prolinas necesaria para su función sugiere que este par de proteínas podrían desempeñar una función similar a la propuesta para Lsb4 en *S. cerevisiae*. Será necesario purificar eng2, lsb1 y wsp1 para realizar ensayos de polimerización de actina *in vitro* que permitan comprobar si esta hipótesis es correcta.

eng2 durante el ciclo vegetativo en *S. pombe*, modelo espacio-temporal

La endocitosis es un proceso extraordinariamente complejo que requiere de la actuación coordinada de un gran número de proteínas y de la modificación estructural de la membrana plasmática (Gachet y Hyams, 2005; Kaksonen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). Una estructura con un papel esencial durante este proceso es el citoesqueleto de actina, el cual es responsable de generar la fuerza necesaria para la invaginación de la membrana plasmática que en último término conducirá a la formación de una vesícula endocítica (Galletta y Cooper, 2009; Girao *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2009b). En levaduras, el citoesqueleto de actina presenta dos formas distintas de organización, los cables de actina implicados en la secreción polarizada y nucleados por las forminas (Bnr1 y Bni1 en *S. cerevisiae* y for3 en *S. pombe*) y los parches de actina, implicados en los procesos de endocitosis y sintetizados por el complejo arp2/3 (tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*). Los resultados obtenidos durante el presente trabajo han demostrado la implicación de la $\beta(1,3)$ -endoglucanasa eng2 de *S. pombe* en la organización del citoesqueleto de actina, el crecimiento polarizado y la endocitosis. Mediante distintas aproximaciones experimentales *in vivo* e *in vitro* se ha podido relacionar a eng2 con otras proteínas implicadas en los procesos de ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto de actina. En base a esos resultados, y apoyándonos en el modelo descrito por Kaksonen y colaboradores en 2005, es posible establecer un posible modelo de actuación espacio-temporal de eng2 dentro del proceso de endocitosis. Este patrón espacio-temporal se muestra con detalle en el siguiente modelo (Fig. 68):

- a) Paso 1: En primer lugar se produce una reorganización de los lípidos de membrana o “lipid-rafts”, que está asociada al patrón de crecimiento en *S. pombe* (Gachet y Hyams, 2005). Esta modificación de los lípidos sirve

de señal para el reclutamiento de las proteínas del módulo de la cubierta endocítica, que comprende proteínas como la clatrina o end4/sla2. Una vez ensamblado este módulo, el siguiente acontecimiento que ocurre es la unión de las proteínas activadoras del complejo arp2/3, como wsp1 y vrp1 (Sirotkin *et al.*, 2005). Los resultados de nuestro trabajo permiten asumir que el complejo eng2-lsb1 aparece en esta región de la membrana de forma concomitante con el ensamblaje de wsp1, existiendo un solapamiento parcial en la localización de estas dos proteínas.

- b) Paso 2: Una vez localizados eng2 y wsp1, se produciría el ensamblaje de la miosina de Clase I myo1, que participa en la activación del complejo arp2/3, la organización de los lípidos de membrana y el proceso de endocitosis (Attanapola *et al.*, 2009; Codlin *et al.*, 2008; Sirotkin *et al.*, 2005; Takeda y Chang, 2005). eng2, wsp1 y myo1 se localizan en la misma región, existiendo un solapamiento parcial entre ellas. Este conjunto de proteínas podrían formar una estructura proteica que podría servir como soporte para el ensamblaje de otras proteínas implicadas en este proceso. La idea de que las proteínas de la familia WASP pueden actuar como andamio para el ensamblaje de otras proteínas ha sido propuesta para *S. cerevisiae*, donde se ha sugerido que Las17/Bee1 puede ser capaz de formar un pequeño entramado de filamentos de actina que puede servir como soporte para el anclaje del resto de componentes (Idrissi *et al.*, 2008). Además, Las17/Bee1 también ha sido relacionada con las primeras etapas de la invaginación de la membrana celular previas a la polimerización de la actina mediada por el complejo Arp2/3 (Sun *et al.*, 2006). En *S. pombe* no existen estudios tan exhaustivos como en *S.*

cerevisiae, sin embargo, detalles como que *wsp1* presente una ligera movilidad hacia el interior celular (100-400 nm) (Sirotkin *et al.*, 2005) o la posible interacción entre *eng2* y *lsb1* apuntan a un patrón común de endocitosis en ambas levaduras.

- c) **Paso 3:** Se produce el ensamblaje y activación del complejo *arp2/3*, que comienza a formar una compacta red de filamentos de actina y genera una invaginación en la membrana. Durante esta etapa *eng2*, *wsp1*, *myo1* y *arp2/3* se localizan en la misma región junto al borde de la célula.
- d) **Paso 4:** La red de filamentos de actina se hace mayor, generando una invaginación de forma tubular en la membrana. A partir de este momento *eng2* y el complejo *arp2/3* colocalizan de forma precisa, comenzando a moverse hacia el interior celular y dejando a *wsp1*

y *myo1* en la membrana plasmática. Por homología con *S. cerevisiae*, este paso podría ser el momento aproximado en el que se produjera el ensamblaje o llegada de *hob1* (ortólogo de Rvs167).

- e) **Paso 5:** *wsp1* y *myo1* comienzan a desensamblarse mientras que *eng2* y *arp2/3* continúan su desplazamiento hacia el interior celular. En este momento *hob1* podría intervenir promoviendo la escisión de la vesícula.
- f) **Paso 6:** La vesícula se escinde y comienza a aparecer *crn1* en las inmediaciones de *eng2* y *arp2/3*, aunque *eng2* y el complejo *arp2/3* todavía colocalizan.
- g) **Paso 7:** La coronina (*crn1*) desplaza a *eng2* de su interacción con el complejo *arp2/3*, y a partir de este momento *crn1* y el complejo *arp2/3* colocalizan de forma precisa hasta que *arp2/3* se desensambla.

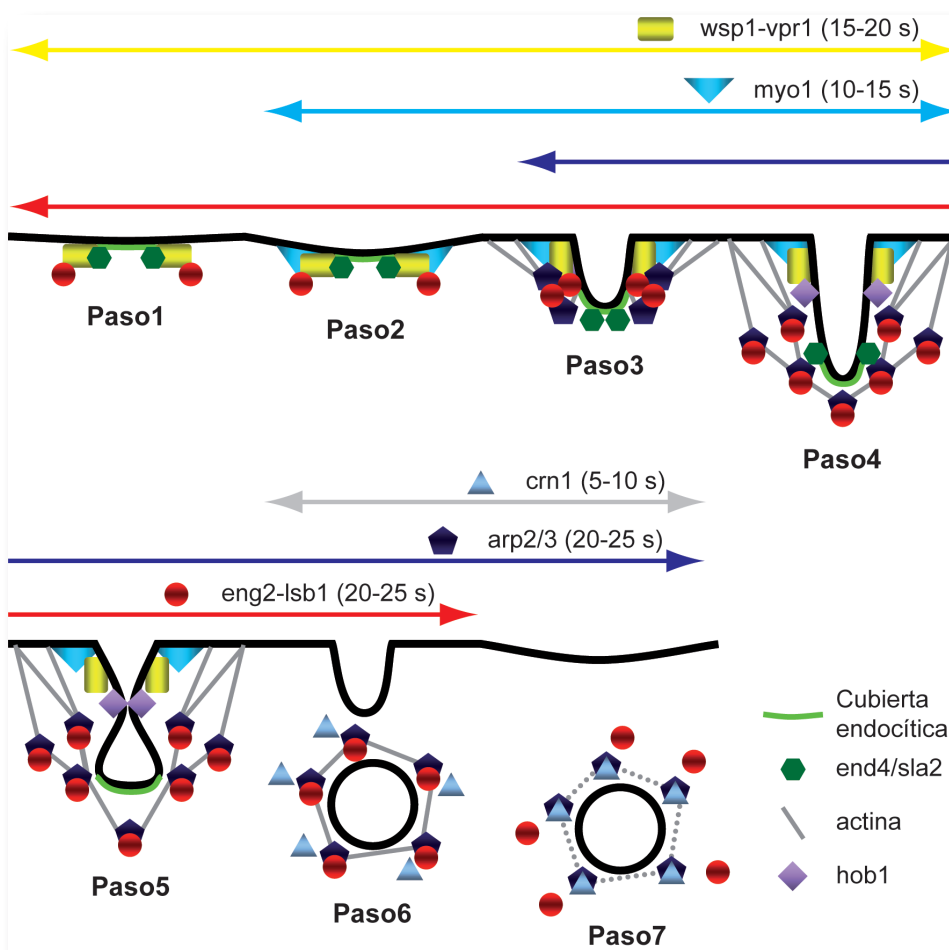


Figura 68.- Modelo espacio-tiempo de *eng2-lsb1* durante el proceso de endocitosis.

Este modelo espacio-temporal también está de acuerdo con el modelo propuesto por Rodal y colaboradores para la activación del complejo arp2/3 (Rodal *et al.*, 2005b), de tal manera que el Paso 3 correspondería con el estado cerrado y activo del complejo arp2/3 (Fig. 67, panel de la derecha), mientras que los momentos en los que eng2 y arp2/3 se mantienen unidas y colocalizan (Pasos 4, 5 y 6) el complejo arp2/3 se encuentra en el estado intermedio (Fig. 67, panel central). Finalmente, el Paso 7 correspondería con el estado abierto e inactivo del complejo arp2/3 (Fig. 67, panel de la izquierda), en el que eng2 es desplazada por crn1 haciendo que el complejo se inactive y, probablemente, iniciando la desorganización del parche de actina.

eng2 funciona como una $\beta(1,3)$ -endoglucanasa durante el ciclo sexual en *S. pombe*

Desde un primer momento, eng2 fue clasificada como una proteína con actividad $\beta(1,3)$ -endoglucanasa perteneciente a la familia 81 de las glicosil hidrolasas (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b). eng2⁺ presenta un claro pico de expresión durante el ciclo sexual de *S. pombe* una vez que la célula ha superado la meiosis II, lo que condujo a estudiar la función de esta proteína en esta fase del ciclo de vida. Los resultados obtenidos permiten afirmar que eng2 tiene un papel fundamental en la dehiscencia de las esporas, siendo necesaria para la disolución de los glucanos de la pared del asca que presentan enlaces de tipo $\beta(1,3)$ y permitiendo así la liberación de las ascosporas (Encinar del Dedo *et al.*, 2009). Durante este proceso, eng2

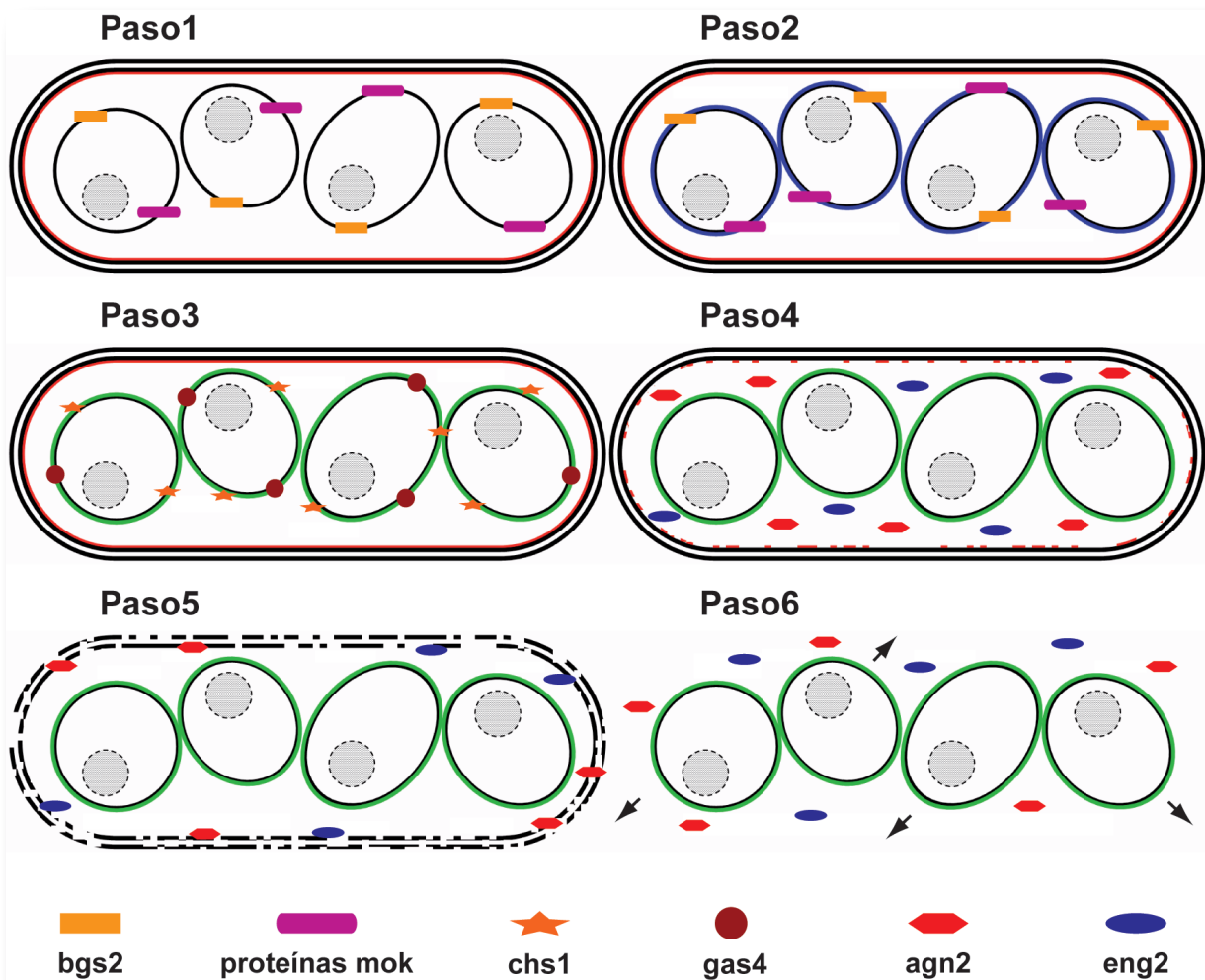


Figura 69.- Modelo de actuación de eng2 durante el proceso de esporulación.

actúa como una $\beta(1,3)$ -endoglucanasa, siendo su actividad catalítica esencial para su función. Este trabajo permite, por tanto, posicionar la acción de eng2 dentro del esquema de las etapas tardías del proceso de esporulación en *S. pombe* (Fig. 69). La entrada en el ciclo sexual viene precedida de un estrés nutricional, provocado por la ausencia de nitrógeno en el medio. Este estrés, provoca una serie de cambios morfológicos, mediados por feromonas, que llevan a las células a crecer de forma apical formando unas proyecciones características denominadas “shmoos”. Las células se aglutinan y fusionan, e inmediatamente después tiene lugar la cariogamia. Una vez formado el cigoto, éste sufre dos divisiones meióticas consecutivas que generan cuatro núcleos haploides, que son encapsulados formando las foresporas. Durante la meiosis, eng2 comienza a perder su localización en forma de puntos y aparece de forma difusa en el citoplasma del asca, quedando mayoritariamente excluido de las foresporas:

- a) Pasos 1 y 2: Una vez que las foresporas se han individualizado, comienza la síntesis de las primeras capas de la pared de las ascosporas gracias a la acción de las proteínas mok (α -glucán sintasas) y bgs2 (β -glucán sintasa) y sus reguladores rgf2 y rho1 (García *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000).
- b) Paso 3: Posteriormente, otra serie de proteínas como chs1, cda1 o gas4 participan en la síntesis de otros componentes de la pared de la ascospora o su modificación hasta su completa maduración (Arellano *et al.*, 2000; de Medina-Redondo *et al.*, 2008; Matsuo *et al.*, 2005).
- c) Pasos 4 y 5: Cuando la pared de las ascosporas está perfectamente formada, se produce la desorganización de la membrana plasmática de la célula vegetativa, permitiendo a la $\alpha(1,3)$ -endoglucanasa agn2 y la $\beta(1,3)$ endoglucanasa eng2 acceder hasta sus sustratos (los glucanos de la pared celular) para su degradación (Dekker *et al.*, 2007; Encinar del Dedo *et al.*, 2009).
- d) Paso 6: la degradación de α y β -glucanos de la pared del asca permite que las esporas puedan diseminarse hasta que las condiciones sean favorables para su germinación.

eng2 es una proteína multifuncional o “moonlighting protein” en *S. pombe*

Como se ha mostrado en el presente trabajo, eng2 es una proteína multifuncional o “moonlighting protein” con dos funciones completamente diferentes durante el ciclo de vida de *S. pombe*. Durante el crecimiento vegetativo eng2 interviene en la regulación del citoesqueleto de actina, el crecimiento polarizado y la endocitosis a través de su interacción con el complejo arp2/3, mientras que durante el ciclo sexual actúa como una $\beta(1,3)$ -endoglucanasa necesaria para la degradación de la pared celular del asca permitiendo la dehiscencia y dispersión de las esporas. Así, eng2 es un nuevo ejemplo de proteína multifuncional en levaduras y la primera de este tipo descrita en *S. pombe*.

Esta dualidad en las funciones de eng2 en la levadura de fisión plantea varios interrogantes desde el punto de vista evolutivo. El primero de ellos es cómo ha evolucionado eng2 hasta convertirse en una proteína multifuncional, y cuál de las funciones es la original y cuál la adquirida a lo largo de la evolución. Las proteínas de la familia GH81 están presentes no sólo en hongos, sino también en plantas y bacterias. Es interesante que en las bacterias en las que se han encontrado proteínas de esta familia (19 según CAZy) exista únicamente un miembro, mientras que en hongos y plantas hay al menos dos proteínas diferentes. Otro dato a tener en cuenta es que en el árbol filogenético de la familia GH81 (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?PF03639>) existen dos ramas bien diferenciadas, una de las cuales engloba las proteínas de bacterias y plantas y la otra las de hongos. Estas observaciones sugieren que a lo largo de la evolución ha ocurrido una duplicación de las secuencias de las proteínas de la familia GH81, lo que ha permitido la adaptación de cada

uno de los miembros a funciones específicas. Ya que al menos una de las proteínas de bacterias, la glucanasa Lam81A de *Thermobifida fusca*, parece tener actividad glucanasa con una posible función en la degradación de la biomasa de las plantas (McGrath y Wilson, 2006), o la propia eng1 de *S. pombe* también actúa como endoglucanasa, cabe suponer que la hidrólisis de las cadenas de glucanos sea la función original de las proteínas de la familia GH81. Otro dato que apoya esta idea es el hecho de que el complejo arp2/3 o la actina no estén presentes en bacterias, algas o eucariotas primitivos, lo que indicaría que su papel en la regulación del citoesqueleto de actina fue adquirido posteriormente a la actividad como $\beta(1,3)$ -endoglucanasa.

Otra pregunta que surge es cuál puede haber sido el mecanismo utilizado para adquirir la segunda función. Dos son los mecanismos más utilizados por la evolución para este propósito: la modificación de superficies de la proteína aparentemente “expuestas” y la incorporación de las proteínas a complejos sin que se produzcan cambios drásticos en la estructura de las mismas (Jeffery, 1999; Jeffery, 2005). En el caso de eng2, la combinación de ambas estrategias parece el supuesto más probable. La modificación del extremo N-terminal de una primitiva glucanasa en el que se encuentra la secuencia señal de secreción a una región rica en prolinas pudo ocurrir por mutación al azar o por recombinación con otras regiones del genoma que contienen motivos de unión a dominios SH3 (como por ejemplo, el gen *wsp1* con el que presenta mayor identidad), produciendo una glucanasa localizada en el citoplasma de la célula. Este tipo de recombinaciones o mutaciones no es exclusivo de eng2, ya que *S. pombe* tiene otras proteínas con actividad glucanasa que se localizan en el citoplasma, como agn2 o la exoglucanasa exg3 perteneciente a la familia GH5, aunque no se conoce si actúan como proteínas multifuncionales. Una vez que la proteína adquirió un nuevo dominio o motivo en el extremo N-terminal, esto le permitió interactuar con proteínas con dominios SH3 (como *myo1*, *hob1*, *lsb1*), integrándose en un complejo proteico y adquiriendo una función

adicional sin perder la capacidad de hidrolizar glucanos.

La tercera cuestión que se plantea es qué ventajas aporta a la célula contar con una proteína multifuncional como eng2. Algunas de las ventajas que las proteínas multifuncionales proporcionan a la célula son la capacidad para coordinar múltiples rutas o actividades celulares, proporcionar un mecanismo de respuesta rápido y eficiente ante condiciones cambiantes o aportar un mecanismo de retroalimentación (Jeffery, 1999; Jeffery, 2005). En el caso de eng2 dos podrían ser las ventajas, por un lado, el aprovechar el esqueleto de una proteína para otra función adicional, evitando la necesidad de sintetizar nuevas proteínas para realizar esta función. Por otro lado, la presencia de una pequeña cantidad de eng2 durante el ciclo vegetativo podría asegurar la disolución de la pared del asca durante el proceso de esporulación, en el caso de que la célula no recibiera las señales y/o condiciones necesarias para su expresión durante este proceso. En este sentido, estudios realizados por el laboratorio del Dr. F. Hochstenbach han demostrado que agn2 también se expresa durante el crecimiento vegetativo con un perfil de expresión similar al de eng2, aunque en este caso agn2 no se organiza en forma de puntos sino difusa por el citoplasma (Dekker *et al.*, 2004).

Finalmente, cabe preguntarse si el hecho de que una proteína funcione como “*moonlighting*” en un determinado organismo implica que ocurra lo mismo en otros organismos. En el caso de *S. cerevisiae*, aunque no hay pruebas directas de la participación de Eng2/Acf2 en la endocitosis, existen numerosas evidencias indirectas obtenidas de los ensayos masivos realizados, como se ha comentado anteriormente. Por otro lado, la proteína Eng2/Acf2 posee actividad $\beta(1,3)$ -endoglucanasa similar a la de *S. pombe in vitro* (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008b), aunque su función como $\beta(1,3)$ -endoglucanasa *in vivo* no está clara, ni siquiera durante el proceso de esporulación, pero podría actuar como tal en algún proceso celular aún sin identificar. Esto quizás sea debido a las diferencias entre el ciclo de vida

de *S. pombe* y *S. cerevisiae* y al hecho de que las esporas de *S. cerevisiae* no sean dehiscentes. Mientras que en la levadura de fisión las células diploides son inestables y sufren meiosis y esporulación rápidamente, en la levadura de gemación las células diploides son estables y pueden mantenerse en este estado sin llevar a cabo meiosis y esporulación. Esta característica podría hacer que la función de *eng2* en *S. pombe* sea mucho más relevante que en *S. cerevisiae*. Las ascosporas de *S. pombe* necesitan liberarse

del asca tras la esporulación para evitar que después de la germinación las células haploides de tipo sexual opuesto conjuguen de nuevo y formen un cigoto, lo que conduciría a una nueva meiosis y esporulación entrando de esta manera en un bucle que dificulte la transición entre el ciclo sexual y el ciclo vegetativo. Por tanto, aunque la función biológica como $\beta(1,3)$ -endoglucanasa de *Eng2/Acf2* en *S. cerevisiae* no sea conocida, no podemos descartar que también funcione como “*moonlighting*” en este organismo.

Conclusiones

Conclusiones

1. *eng2* es la primera proteína multifuncional o “*moonlighting protein*” descrita en la levadura de fisión *S. pombe* con dos funciones completamente independientes.
2. Durante el crecimiento vegetativo, *eng2* localiza como puntos discretos en el citoplasma junto con la proteína *Isb1*. *eng2* y *Isb1* forman parte de un complejo que regula la organización del citoesqueleto de actina, el crecimiento polarizado y la endocitosis en *S. pombe*. El control de estos procesos biológicos se realiza a través de la regulación del complejo *arp2/3*.
3. El extremo N-terminal de la proteína presenta una región rica en prolinas que actúa como motivo de unión a dominios SH3. Esta región es esencial para su funcionalidad durante el ciclo vegetativo, pero no su actividad $\beta(1,3)$ -endoglucanasa.
4. Durante la fase sexual del ciclo, *eng2*⁺ presenta una expresión máxima después de la meiosis II que se corresponde con un aumento de la actividad $\beta(1,3)$ -endoglucanasa. En esporulación, *eng2* funciona como una verdadera $\beta(1,3)$ -endoglucanasa hidrolizando la pared del asca. Esta función es esencial para la liberación de las ascosporas y se lleva a cabo de forma coordinada con la $\alpha(1,3)$ -endoglucanasa *agn2*.
5. El par catalítico y la actividad $\beta(1,3)$ -endoglucanasa son esenciales para la dehiscencia del asca, mientras que el extremo N-terminal es completamente prescindible durante esta fase del ciclo.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos utilizados

El presente trabajo se ha desarrollado utilizando distintas estirpes de *Escherichia coli* y *Schizosaccharomyces pombe*. Las características genéticas de todos estos organismos, así como su procedencia se recogen en la Tabla 3 (Anexo I). La levadura de fisión *S. pombe* se utilizó como modelo de estudio de los procesos de crecimiento celular, morfogénesis y esporulación. La bacteria *E. coli* se ha empleado en los trabajos rutinarios de clonación molecular, utilizando la estirpe DH5 α como hospedador habitual de los plásmidos empleados. La conservación de las cepas de levaduras se realizó a -80°C en viales con glicerol al 25%, mientras que para las estirpes bacterianas se empleó glicerol al 50%.

2. Medios y condiciones de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron preparados con agua destilada (Milli-Rho) y esterilizados en el autoclave. Los correspondientes medios sólidos se prepararon mediante la adición de agar al 2%. La selección de cepas resistentes a antibióticos se realizó añadiendo a los medios de cultivo *G418 Sulfate/Geneticina (Gibco)* a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ después de la esterilización en el autoclave. En las ocasiones en las que era necesaria la presencia de un estabilizador osmótico, se empleó sorbitol a una concentración de 0,8 M. Para la selección y/o cultivo de cepas auxótrofas, se añadieron al medio mínimo los suplementos necesarios a partir de soluciones concentradas y esterilizadas previamente en el autoclave.

2.1. Crecimiento de *S. pombe*

Todos los medios de cultivo empleados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* han sido descritos anteriormente (Moreno *et al.*, 1991) y su composición se recoge en el Anexo II.

2.1.1. Crecimiento vegetativo de *S. pombe*

Los experimentos se iniciaron con cultivos de cepas caracterizadas genéticamente que se

encontraban en fase exponencial de crecimiento. El crecimiento vegetativo de *S. pombe* se llevó a cabo generalmente en medio rico (YES) o medio mínimo (MM). Cuando fue necesario, este último se suplementó con 225 mg/l de adenina, histidina, leucina y/o uracilo. Las células se crecieron en placas Petri o en matraces en los que la relación volumen del cultivo líquido/capacidad del matraz era siempre inferior a 1/3. Para mantener estirpes diploides y para mantener la presión selectiva durante el crecimiento de los transformantes portadores de plásmidos, se utilizaron medios selectivos carentes del suplemento correspondiente. La temperatura de incubación de las cepas dependía de la estirpe utilizada en cada experimento. En la mayoría de los casos fue de 28-32°C, aunque las cepas termosensibles se incubaron a 25°C. Asimismo, los cultivos líquidos se mantuvieron con una agitación de 200 rpm. El crecimiento celular en medio líquido se determinó por el incremento en la turbidez de los mismos, el cual se controló mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro *Hitachi U-2001*. Siempre que fue necesario, se diluyeron las muestras para lograr lecturas entre 0,1 - 0,5, intervalo en el que existe una relación lineal entre el número de células y la densidad óptica. Estudios realizados previamente han permitido establecer la relación entre absorbancia y concentración de células en una muestra líquida, de modo que una D.O.595 = 1 equivale a 2×10^7 células/ml, para el caso de la levadura de fisión.

2.1.2. Sincronización de los cultivos celulares de *S. pombe* durante el crecimiento vegetativo

La sincronización de cultivos de *S. pombe* durante el crecimiento mitótico o vegetativo se realizó utilizando estirpes con mutaciones termosensibles en genes que controlan el ciclo celular, como es el caso de *cdc10⁺*. La cepa *cdc10-129* es capaz de crecer a temperatura permisiva (25°C), pero a temperatura restrictiva (37°C) detiene su ciclo celular en la fase G1 (Mitchison y Creanor, 1971). Esta propiedad fue aprovechada para sincronizar cultivos celulares de la levadura

de fisión. Para ello, la estirpe de interés se creció a 25°C hasta fase logarítmica ($D.O.595 = 0,6$), momento en el que se transfirió a temperatura restrictiva durante 4 horas para bloquear las células en G1. Posteriormente, los cultivos fueron incubados de nuevo a la temperatura permisiva, recogiendo muestras a los intervalos de tiempo deseados tras la liberación.

2.1.3. Conjugación y esporulación de *S. pombe*

Para la construcción de algunos mutantes dobles se realizaron cruces genéticos entre las correspondientes cepas parentales haploides. Con este fin, se mezcló un número similar de células de cada estirpe de tipo sexual opuesto (h^+ y h^-) en placas de medio sólido MEA o MM-N y se incubaron a 25°C durante dos o tres días (dependiendo del experimento). En los casos en los que fue necesario construir cepas combinando distintos marcadores genéticos, tras la esporulación se diseccionaron y separaron ascosporas mediante micromanipulación en medio rico YES (con la ayuda de un micromanipulador *MSM-200-T/2*, de *Singer Instruments*), seleccionando posteriormente los segregantes con el genotipo deseado mediante réplica en diferentes medios selectivos y/o distintas temperaturas. Alternativamente, se utilizó el denominado método de selección de esporas al azar o “*random spore analysis*”, resuspendiendo las esporas en 0,5 ml de agua con 2 μ l de *NEE-154 Glusulase* (*Dupont Company*) durante 12 horas, tras las cuales se sembraron 0,2 ml de diluciones (1/1000, 1/5000, 1/10000) de la mezcla anterior en placas de medio rico; una vez germinadas las ascosporas, se analizaron por réplica en medios selectivos.

2.2. Crecimiento de *E. coli*

El crecimiento de las estirpes bacterianas de *E. coli* se realizó a 37°C en los medios y condiciones descritos por Sambrook y Russell (2001), tanto en placas como en medio líquido. La composición de los medios se halla en el Anexo A. Para seleccionar los clones resistentes a antibióticos, los medios correspondientes se

suplementaron con ampicilina (200 μ g/ml).

3. Procedimientos generales de clonación molecular. Vectores de *S. pombe*

Los plásmidos utilizados en *S. pombe* poseen una serie de características comunes, como son: un origen de replicación y un marcador de selección bacterianos, una secuencia de replicación autónoma *ars* y un marcador de selección en levadura (generalmente, se trata de un marcador metabólico). Para la realización de este trabajo se emplearon en repetidas ocasiones los vectores pAL-KS+ o pAU-KS+. Éstos fueron construidos por el Dr. J. Ishiguro (Donan University, Japón) a partir del vector pBluescript II KS+ (*Stratagene*), al que se le añadió el marcador *LEU2* o *URA3* de *S. cerevisiae* y la secuencia *ars1+* de *S. pombe*. Contiene los siguientes elementos:

- Gen de resistencia a ampicilina (amp).
- Origen de replicación relajada *colE1* (ori).
- Fragmento del operón lactosa de *E. coli* (*lacZ*) que codifica el péptido α de la β -galactosidasa. En la región estructural de este gen y manteniendo la fase de lectura abierta se ha insertado un fragmento que incluye sitios de reconocimiento para 11 endonucleasas de restricción.
- Promotores de las ARN polimerasas T3 y T4.
- Fragmento de la región intergénica del fago f1 (f1 IG).
- El origen de replicación de *S. pombe* (*ars1+*), necesario para que el plásmido se mantenga de forma autónoma.
- El gen *LEU2* o *URA3* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *leu1-32* o *ura4.Δ18* de *S. pombe*.

3.1. Obtención de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la extracción de DNA plasmídico de *E. coli* de manera rápida y a pequeña escala (minipreps o minipreparaciones), se empleó el método de lisis alcalina Sambrook y Russell (2001). En los casos en los que era necesaria una concentración mayor de DNA y de mayor pureza, se recurrió a las columnas de intercambio iónico incluidas en el *Quantum Prep® Plasmid Miniprep*

Kit (BioRad), siguiendo las indicaciones del fabricante. La extracción de DNA plasmídico y/o genómico de la levadura de fisión, se realizó según los protocolos descritos por Moreno *et al.* (1991). La amplificación de fragmentos de DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador *MinicyclerTM (MJ Research)* y diferentes polimerasas: *Expand High Fidelity (Roche)*, *VentR[®] DNA Polymerase (New England Biolabs[®])* o *Biotoools DNA polimerasa (Biotoools)*. La reacción se efectuó siguiendo las instrucciones de la casa comercial en cada caso. Por lo general, se desnaturalizaba el DNA molde por incubación a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos consistentes en los siguientes pasos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a temperaturas que oscilaban entre los 50 y 58°C, para permitir el anillamiento de los oligonucleótidos y 1 minuto de extensión a 72°C por cada kilobase de DNA a amplificar, para permitir la síntesis de las cadenas de DNA. Al finalizar el último ciclo, se realizaba una extensión adicional a 72°C durante 10 minutos. Los oligonucleotidos empleados en este trabajo están recogidos en la Tabla 4 (Anexo I).

3.2. Manipulación del DNA

Los procedimientos empleados para la manipulación del DNA son los recogidos en el manual de laboratorio de Sambrook y colaboradores (2001), salvo en aquellas ocasiones en las que se utilizaron *kits* comerciales, en las que se siguieron las instrucciones de la casa fabricante. El análisis de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR o por tratamiento con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (*SeaKem[®] ME Agarose, FMC Bio Products*) preparados a concentración variable entre 0,8% y 1,5%, según el tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon con tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5-7,8) y añadiendo bromuro de etidio (0,5 mg/ml). El aislamiento y purificación de fragmentos específicos se realizó cortando la banda de DNA de interés tras su electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (*NuSieve[®] GTG[®] Low melting temperature agarose, FMC Bio Products*), que

se funde por calentamiento a 65°C durante unos minutos, y posterior procesamiento con el *Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)*. La ligación de fragmentos de DNA se realizó utilizando la ligasa del fago T4 (*Roche*), incubando la mezcla de la reacción durante, al menos, dos horas a temperatura ambiente. La mezcla de la ligación se empleó para transformar directamente *E. coli*.

3.3 Plásmidos utilizados en el estudio de *eng2*

pJED12: *eng2*

Este plásmido portaba la secuencia codificante de *eng2⁺* (con su propio promotor y terminador) obtenida a partir del plásmido pSPE351 cortando con *Sall* y *Sacl*. Este fragmento se clonó entre los sitios *Sall* y *Sacl* del vector pAU-KS.

pJED13: *eng2-E537A*

Se amplificaron fragmentos de unos 200-900 pb utilizando parejas de oligonucleótidos específicos (743-1440 y 744-1445) utilizando como molde el plásmido pJED12. A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados y clonados entre los sitios *Bam*HI y *Spe*I del plásmido pJED12.

pJED14: *eng2-mCherry (marcador URA3)*

Se amplificaron fragmentos de unos 800-750-400 pb utilizando parejas de oligonucleótidos específicos (1440-1441, 1442-1443 y 1444-1445) utilizando como molde DNA genómico. A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados y clonados entre los sitios *Bam*HI y *Spe*I del plásmido pJED12.

pJED15: *eng2Δ14-28*

Se amplificaron fragmentos de unos 1200-300 pb utilizando parejas de oligonucleótidos específicos (366-1447 y 1446-1454) utilizando como molde el plásmido pJED12. A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados y clonados entre los sitios *Sall* y *Nco*I del plásmido pSPE351. El plásmido resultante fue cortado con *Sall* y *Sacl*, el fragmento que contenía *eng2Δ14-28* fue clonado en vector pAU-KS entre los sitios *Sall* y *Sacl*.

pJED16: *eng2Δ1-303*

Se amplificaron fragmentos de unos 1200-450 pb utilizando parejas de oligonucleótidos específicos (366-1452 y 1453-1454) utilizando como molde el plásmido pJED12. A continuación, los fragmentos

resultantes fueron fusionados y clonados entre los sitios *Sall* y *NcoI* del plásmido pSPE351. El plásmido resultante fue cortado con *Sall* y *SacI*, el fragmento que contenía *eng2Δ1-303* fue clonado en el vector pAU-KS entre los sitios *Sall* y *SacI*.

pJED17: eng2Δ348-706

Se amplificaron fragmentos de unos 900-400 pb utilizando parejas de oligonucleótidos específicos (366-1450 y 1451-1445) utilizando como molde el plásmido pJED12. A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados y clonados entre los sitios *Sall* y *SpeI* del plásmido pJED12.

pJED18: eng2-mCherry (marcador LEU2)

El plásmido pJED14 fue cortado con *Sall* y *SacI*, el fragmento que contenía *eng2-mCherry* fue clonado en vector pAL-KS entre los sitios *Sall* y *SacI*.

pJED19: eng2Δ14-28-mCherry

El plásmido pJED14 fue cortado con *BamHI* y *SpeI*, el fragmento que contenía el extremo C-terminal de *eng2-mCherry* fue clonado en plásmido pJED15 entre los sitios *BamHI* y *SpeI*.

pJED20: eng2Δ1-36

Se amplificaron fragmentos de unos 1200-1200 pb utilizando parejas de oligonucleótidos específicos (366-1472 y 1471-1454) utilizando como molde el plásmido pJED12. A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados y clonados entre los sitios *Sall* y *NcoI* del plásmido pSPE351. El plásmido resultante fue cortado con *Sall* y *SacI*, el fragmento que contenía *eng2Δ1-36* fue clonado en vector pAU-KS entre los sitios *Sall* y *SacI*.

pJED21: eng2Δ1-36-mCherry

El plásmido pJED14 fue cortado con *BamHI* y *SpeI*, el fragmento que contenía el extremo C-terminal de *eng2-mCherry* fue clonado en plásmido pJED20 entre los sitios *BamHI* y *SpeI*.

3.4. Transformación de bacterias y levaduras

3.4.1. Transformación de *E. coli*

La transformación de la cepa bacteriana DH5α con las mezclas de ligación se realizó según el procedimiento diseñado por Kushner (1978) basado en el choque térmico. Para amplificar plásmidos ya construidos, se recurrió a

un método simplificado descrito por Golub (1988).

3.4.2. Transformación de levaduras

Las transformaciones de *S. pombe* se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Hill y colaboradores (1991), basado en sales de litio y dimetilsulfóxido (DMSO).

4. Métodos genéticos

4.1. Reemplazamientos génicos

La construcción de cepas carentes de un gen determinado se llevó a cabo empleando la técnica de reemplazamiento génico (Rothstein 1991), basada en la propiedad de transformación integrativa de las moléculas lineales de DNA. La estrategia consiste en la construcción de un cassette de interrupción en el cual la región codificante del gen de interés se sustituye por un marcador de selección en levaduras (en este trabajo, el módulo *KanMX4*, descrito por Bähler y colaboradores en 1998). Los diferentes cassettes utilizados se construyeron mediante amplificación por PCR de las regiones no codificantes 5' y 3' de cada gen y posterior fusión con el marcador de selección por PCR recombinante (Wach, 1996; Wach *et al.*, 1994). Para comprobar la integración en el locus correspondiente, los transformantes se analizaron por PCR.

5. Detección y análisis de proteínas

5.1. Obtención de los extractos proteicos y valoración de la concentración de proteínas

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de células en crecimiento exponencial en medio líquido. Las células se recogieron por centrifugación y se guardaron a -80°C hasta el momento de su análisis. Para la extracción de proteínas, se llevaron a cabo dos protocolos ligeramente diferentes en función de los su uso posterior:

- a) Las muestras se resuspendieron en 5 ml de tampón E (50 mM citrato sódico, 100 mM de tampón fosfato sódico, pH

6,0) a una concentración final 0,8 M de sorbitol. A esta solución se añadieron 250 µl de *Glucanex* (*Sigma-Aldrich*) (20 mg/ml) y 1,5 ml de *Zymoliasa-100T* (*ICN Biomedicals, Aurora, OH*) (20 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 2-3 horas. Posteriormente, se procedió a su ruptura en frío con bolitas de vidrio (*Sigma*) de 425-600 µm de diámetro mediante agitación en una *FastPrep FR120* (*Savant, Bio101*) o mediante la utilización de un molinillo criogénico (*FREEZER/MILL® 6770*). Los extractos totales se homogeneizaron y se utilizaron 2-4 µl de cada muestra para valorar la concentración proteica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando el kit *BioRad Protein Assay* (*BioRad*), y tomando como referencia una recta patrón de BSA (0-1 µg/µl). Este tipo de protocolo se utilizó para ensayos de inmunoprecipitación.

- b) Las muestras se descongelaron en hielo y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, DTT 1mM, PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml y pepstatina 1 µg/ml). Posteriormente, se procedió a su ruptura en frío con bolitas de vidrio (*Sigma*) de 425-600 µm de diámetro mediante agitación en una *FastPrep FR120* (*Savant, Bio101*) o mediante la utilización de un molinillo criogénico (*FREEZER/MILL® 6770*). Los extractos totales se homogeneizaron y se utilizaron 2-4 µl de cada muestra para valorar la concentración proteica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando el kit *BioRad Protein Assay* (*BioRad*), y tomando como referencia una recta patrón de BSA (0-1 µg/µl).

5.2. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas (Western-blot)

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando

el sistema de electroforesis “*NUPAGE® Novex Bis-Tris gels*” (*Invitrogen*). La electroforesis de proteínas (entre 50-200 µg de extracto proteico) se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en geles de Bis-Tris al 10%, en tampón MOPS, según las instrucciones del fabricante.

Una vez separadas, las proteínas eran transferidas a una membrana de PVDF *P-Hybond* (*GE Healthcare*) empleando los sistemas de transferencia *X-Cell Sure Lock Mini-Cell System* (*Invitrogen*), a 30-40 voltios constantes por gel durante 1-2 horas. Tras la transferencia de proteínas a la membrana, ésta se lavaba brevemente con PBS (1x)-Tween 1% (*Sigma*), también conocido como PBS-T, y se bloqueaba durante al menos 1 hora en una solución de leche desnatada en polvo (*Sveltesse, Nestlé*) al 5% en la solución anterior. La incubación con los anticuerpos primario y secundario se realizó en la solución de bloqueo, a la dilución indicada por el fabricante en cada caso, durante al menos 1 hora. Tras varios lavados, la detección de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó usando la detección de la actividad peroxidasa ligada al anticuerpo secundario mediante quimioluminiscencia (*ECL detection*, de *GE Healthcare*), la cual se utilizaba para impresionar una película fotosensible (*Hyperfilm™ MP*, *GE Healthcare*). Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron: anti-GFP (*Monoclonal Antibody JL-9, Living-colors™ BD Biosciences*), anti-actina (*ICN Biomedicals*) y anti-PSTAIRE (*Santa Cruz Biotechnology*).

6. Técnicas microscópicas

6.1. Microscopía óptica.

Las muestras de levadura se observaron en preparación húmeda en un microscopio óptico (*Leica DM RXA*), equipado con un sistema de iluminación halógena, filtros para microscopía de contraste interferencial (DIC) y contraste de fases, objetivos de inmersión en aceite y una cámara fotográfica digital (*Leica DFC350FX*) acoplada al microscopio. Asimismo, el microscopio estaba acoplado a un ordenador con el programa *Qfish*. En algunos casos se utilizó un microscopio *Nikon*

Eclipse i90 con una cámara *Orca-ER* controlada por el programa *MetaMorph*.

Tinción de calcoflúor

El calcoflúor es un fluorocromo que, en *S. cerevisiae* tiñe las zonas de pared celular ricas en quitina, pero que en *S. pombe* se une fundamentalmente al (1-3)- β -glucano lineal del septo y de los polos en crecimiento (Cortes *et al.*, 2007), ya que *S. pombe* carece de quitina. El calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul. El calcoflúor (*Blankophor BBH*, Bayer Corporation) se preparó en agua a una concentración de 10 mg/ml. Para conseguir la completa disolución, se añadieron gotas de KOH 10 N. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz. La tinción de calcoflúor se realizó partiendo de cultivos líquidos creciendo en fase logarítmica. A la muestra se le añadieron 2-3 μ l de calcoflúor, se recogieron por centrifugación (1 minuto a 6000 rpm) y se lavaron con PBS. Finalmente se concentraron para observar la fluorescencia.

Tinción de actina

Aprovechando la propiedad de la faloidina, una toxina extraída del hongo *Amanita phalloides*, de unirse con alta afinidad a la actina F (actina polimerizada), se puede usar conjugada a un compuesto fluorescente, en este caso Alexa-fluor 448 como sonda para detectar y teñir la actina en el interior celular. La tinción de actina se realizó siguiendo las indicaciones y modificaciones realizadas por el Dr. F. Chang a partir del protocolo inicial, descrito por Marks y Hyams (1985). Partiendo de un cultivo en fase exponencial, se tomaron 6 ml de células y se fijaron añadiendo 2 ml de formaldehído al 16% (EM-grade MeOH Free, Polysciences) y 1 ml de tampón PM (K_2HPO_4 35 mM, pH 6.8, $MgSO_4$ 0,5 mM). Las células se incubaron en agitación a la temperatura del cultivo durante 1 hora y, posteriormente, se lavaron 3 veces con tampón PM. Se recogieron de nuevo las células y se permeabilizaron resuspendiéndolas en PM con Tritón X-100 al 1% durante 30 segundos. Finalmente, se lavaron tres veces con PM,

se tomó 1 μ l de células permeabilizadas y se mezclaron con 5 μ l de Alexa-fluor 448-faloidina (*Molecular Probes*), resuspendida en PM. Estas muestras se incubaron en oscuridad durante 1 hora en agitador orbital a temperatura ambiente. Las muestras así teñidas pueden guardarse durante 1 ó 2 días a 4°C.

Tinción con FM4-64

El FM4-64 es un compuesto rojo-fluorescente de carácter lipofílico que se usa para el estudio de endocitosis, tráfico de membranas y transporte vesicular (Vida y Emr, 1995). Para la visualización de las zonas activas de endocitosis, se añadió FM4-64 (*Molecular Probes*) a una concentración final de 10 μ M al cultivo líquido de células. A continuación, se incubaron durante 1 minuto en hielo y se observó al microscopio de fluorescencia.

6.2. Microscopía de fluorescencia in vivo

La observación se realizó en un microscopio *Personal Deltavision* (*Applied Precision, LLC*) controlado mediante el software *softWoRx Resolve 3D* o *Spining Disk* (*Nikon Eclipse TE-2000U*) controlado mediante el software *MetaMorph®* (*MDS Analytical Technologies*). Las imágenes fueron capturadas con una cámara *CoolSNAP HQ2* (*PHOTOMETRICS*) o *Ixon^{EM+}* (*ANDOR TECHNOLOGY*) acopladas a cada uno de los microscopios y procesadas con los programas *MetaMorph®* (*MDS Analytical Technologies*), *ImageJ 1.37a* (*Nacional Institutes of Health, USA*) y *Adobe® Photoshop CS2* (*Adobe System, Inc*). Para la observación de proteínas que contenían la proteína fluorescente verde (GFP), amarilla (YFP), cian (CFP) o roja (mCherry), se recogieron células en crecimiento exponencial en medio líquido.

Cuando fue necesario analizar muestras mediante microscopía a lo largo del tiempo, las células se prepararon en portaobjetos con medio sólido que contenía los nutrientes necesarios para garantizar el crecimiento celular, así como la inmovilidad de las células en el portaobjetos. La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera. Se preparó en un tubo de

vidrio una suspensión de agarosa (*Seakem® ME Agarose, FMC Bio Products*) al 2% en 2 ml del medio de cultivo en el que se pretendía hacer el estudio. Esta mezcla se calentó a la llama hasta conseguir la fusión de la agarosa, obteniendo una solución homogénea, 15 µl de la misma se vertieron sobre un portaobjetos de manera que, al enfriarse, formase una capa fina y plana de menos de 1 mm de grosor. Una vez solidificada, se añadieron 1,5 µl de cultivo líquido de la cepa a estudiar, se colocó el cubreobjetos y se sellaron los cuatro vértices del porta. En función del objetivo del experimento, se tomó una foto del plano central de la célula, o bien de 8 a 16 imágenes de secciones transversales de todo el volumen celular (series en Z) con una separación de 0,6-0,3 µm cada una.

6.3. Microscopía confocal

Se utilizó un microscopio confocal espectral, Leica TCS-SL, para obtener composiciones en 3 dimensiones de estructuras celulares. En cada experimento obtuvimos de 20 a 30 imágenes de secciones transversales de todo el volumen celular (series en Z) con un grosor de 0,2 µm cada una. Dichas imágenes se procesaron utilizando el programa asociado a este microscopio, denominado Leica Confocal Software (LCS), con el que se puede obtener la reconstrucción en 3 dimensiones de las mismas.

7. Recursos bioinformáticos

Los programas y recursos bioinformáticos empleados para la realización de esta Memoria se encuentran recogidos en la Tabla 5.

| Programas | Direcciones Electrónicas |
|---------------------------------------|---|
| Adobe® Illustrator CS2 | http://www.adobe.com/ |
| Adobe® InDesign CS2 | http://www.adobe.com/ |
| Adobe® Photoshop CS2 | http://www.adobe.com/ |
| Paint Shop Pro | http://www.corel.es/ |
| EndNote® IX | http://www.endnote.com/ |
| DNASTAR | http://www.dnastar.com/ |
| Base de datos de <i>S. cerevisiae</i> | http://www.yeastgenome.org/ |
| Base de datos de <i>S. pombe</i> | http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/ |
| GeneDB | http://www.genedb.org/ |
| BLAST | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi |
| SMART | http://smart.embl-heidelberg.de/ |
| Image J | http://rsb.info.nih.gov/ij/ |
| Expasy | http://www.expasy.org/ |
| ClustalW | http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ |
| CAZy | http://www.cazy.org/ |
| STRING 8.2 | http://string-db.org/ |
| MetaMorph® | http://www.moleculardevices.com/ |

Tabla 5.- Recursos bioinformáticos utilizados durante este trabajo.

Anexo I

| Estirpe | Genotipo | Procedencia |
|-----------------|---|-----------------------|
| S. pombe | | |
| OL023 | <i>h ura4.Δ18</i> | Stock del laboratorio |
| OL024 | <i>h ura4.Δ18 eng2::ura4</i> | Stock del laboratorio |
| OL176 | <i>h ade6 M210 leu1-32 ura4.Δ18</i> | Stock del laboratorio |
| OL177 | <i>h⁺ ade6 M210 leu1-32 ura4.Δ18</i> | Stock del laboratorio |
| OL283 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 eng2::ura4</i> | Stock del laboratorio |
| OL759 | <i>h⁺ ade6 M210 leu1-32 ura4.Δ18 eng2::KanMX4</i> | Stock del laboratorio |
| OL773 | <i>h⁺ ade6 M210 leu1-32 ura4.Δ18 eng2::KanMX4</i> | Stock del laboratorio |
| OL821 | <i>h leu1-32 cdc10-129</i> | Stock del laboratorio |
| OL831 | <i>h leu1-32 cdc10-129 eng2::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL867 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-Δ18 his3-Δ1 bgs4Δ::ura4+ Pbgs4+::GFP-bgs4+::leu1+</i> | J.C. Ribas |
| OL868 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 for3-3GFP:ura4</i> | P. Pérez |
| OL869 | <i>h⁺ ura4.Δ18 leu1-32 tea1-GFP:KanMX4</i> | P. Pérez |
| OL870 | <i>h⁺ ura4.Δ18 leu1-32 pom1-GFP:KanMX4</i> | P. Pérez |
| OL871 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-Δ18 his3-Δ1 bgs4Δ::ura4+ Pbgs4+::GFP-bgs4+::leu1+ eng2::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL872 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 for3-3GFP:ura4 eng2::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL873 | <i>h⁺ ura4.Δ18 leu1-32 tea1-GFP:KanMX4 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL875 | <i>h⁺ ura4.Δ18 leu1-32 pom1-GFP:KanMX4 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL889 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1 wsp1-YFP:KanMX4</i> | P. Pérez |
| OL890 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-CFP:KanMX4</i> | P. Pérez |
| OL891 | <i>h ura4.Δ18 leu1-32 his3-Δ1 myo52-GFP:KanMX4</i> | P. Pérez |
| OL896 | <i>h ura4.Δ18 eng2-8Ala-GFP:KanMX4 (eng2-GFP1)</i> | Este Trabajo |
| OL897 | <i>h ura4.Δ18 eng2-8Ala-GFP:KanMX4 (eng2-GFP2)</i> | Este Trabajo |
| OL903 | <i>h ura4.Δ18 arp5::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL904 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 eng2::ura4 arp5::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL905 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 eng2::ura4 arp5::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL906 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 eng2::ura4 arp5::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL907 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1 wsp1::leu1 eng2::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL909 | <i>h ura4.Δ18 leu1-32 his3-Δ1 myo52-GFP:KanMX4 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL911 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1 wsp1-YFP:KanMX4 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL913 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-CFP:KanMX4 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL916 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1 wsp1::leu1</i> | Este Trabajo |
| OL925 | <i>h⁺ ura4.Δ18 leu1-32 cut11-GFP:ura4</i> | P. Pérez |
| OL926 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 eng2-8Ala-GFP:KanMX4 cut11-GFP:ura4</i> | Este Trabajo |
| OL932 | <i>h⁺ 41nmt1-GFP-CHD(rng2):leu1 ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1</i> | T.D. Pollard |
| OL934 | <i>h ura4.Δ18 leu1-32 for3::KanMX4</i> | Y. Sánchez |
| OL960 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 kanMX6:nmt81:GFP-atb2 eng2-8Ala-GFP:KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL983 | <i>h ura4.Δ18 leu1-32 for3::KanMX4 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL984 | <i>h ura4.Δ18 3xnmt1-eng2:KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL986 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 lsb1::KanMX6</i> | Stock del laboratorio |
| OL987 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-GFP:kanMX6 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL988 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-CFP:kanMX6 wsp1-YFP:KanMX4</i> | Y. Sánchez |
| OL989 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-CFP:kanMX6 wsp1-YFP:KanMX4 eng2-mCherry:leu2 (pJED18)</i> | Este Trabajo |
| OL993 | <i>h ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-GFP:kanMX6 eng2-mCherry:leu2 (pJED18)</i> | Este Trabajo |

| | | |
|-----------------------|---|--------------|
| OL1003 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-CFP:kanMX6 crn1-YFP:KanMX6 eng2-mCherry:leu2 (pJED18)</i> | Este Trabajo |
| OL1005 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 rlc1-3GFP::kanMX6</i> | T.D. Pollard |
| OL1007 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 cdc12-3YFP:kanMX6 sad1-CFP:KanMX6</i> | T.D. Pollard |
| OL1037 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 lsb1-YFP:kanMX6</i> | Este Trabajo |
| OL1038 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 lsb1-YFP:kanMX6 eng2-mCherry:leu2 (pJED18)</i> | Este Trabajo |
| OL1052 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 myo52::ura4 eng2-8Ala-GFP:KanMX4</i> | Este Trabajo |
| OL1053 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M216 leu1-32 his3-Δ1 arpC5-CFP:kanMX6 wsp1-YFP:KanMX4 eng2::ura4</i> | Este Trabajo |
| OL1065 | <i>h⁺ ura4.Δ18 ade6 M210 leu1-32 his3-Δ1 41nmt1-GFP-CHD(rng2):leu1 eng2::KanMX4</i> | Este Trabajo |
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5α | <i>supE44 ΔlacU 169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA 1</i> | F. del Rey |

Tabla 3.- Estirpes de microorganismos utilizadas en este trabajo.

| | | |
|------|---|--|
| 1448 | TTACCCGAAGCAAATTCTCG | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1449 | CCCGTCATAATCCATCATGGT | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1450 | CATTAGCTCCCTTGCCATCAATTGCTTCCACCATTCCAAGG | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1451 | CCTTGGAATGGTGAAGCAATTGATGGCAAGGGAGCTAATG | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1452 | CTGGCTAAGCCTAAACCTGTCATTATGTCGTCTGACTATGA | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1453 | TCATAGTCAGACGACATAATGACAGGTTTAGGCTTAGCCAG | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1454 | AGAACTATATCCTGCCGTA CTGATGA | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1471 | GCTCAATTCATAGTCAGACGACATAATG ACAAACAAGTTTTATGGTAACTTGACA | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1472 | TGTACAAGTTACCATAAACTTGTTTGT CATTATGTCGTCTGACTATGAATTGAGC | Construcción truncamientos <i>eng2</i> ⁺ |
| 1489 | AACAAAAGTCAAGAGACATGCG | Comprobación cepas |
| 1492 | CTCGCAATCCGAGACTGGAAAATTGCCCAATTGGAGGATAAGCTGGCTA AATTAACAGAAGCAATTAAGAAAAATGTAATCGGATCCCCGGGTTAATTAA | Construcción <i>crn1</i> -YFP |
| 1493 | ATGGAGAAGGCATGATGTCCGGGCTTAGTG ATATGTTTAAAAAAGCATTCTGGACAAAATAAAAAATGCA CAAAAAACTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC | Construcción <i>crn1</i> -YFP |
| 1518 | AAGATTGGTAGTGGTTTGGGTTCTGCATTTGATTTCGG TGCTGGTGCAACTGCTGGCGCTGATCTCGTCAATTCCATTTTTGC AGCAGGGGCAGCAGGGGCAGCACGGATCCCCGGGTTAATTAA | Construcción <i>lsb1</i> -YFP |
| 1519 | AATTCATACATAAATGAGGTGTCTCAATCTATG AAGAAGCAGCTATGCCGCGGTGTTGCTTTATAAGCAT AAAGCATAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC | Construcción <i>lsb1</i> -YFP |

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Anexo II

1. Medios de *Schizosaccharomyces pombe*

1.1. Medios empleados durante el crecimiento vegetativo

Medio YES

| | |
|----------------------|-------|
| Glucosa | 3 % |
| Extracto de levadura | 0,5 % |

Medio Mínimo EMM (*Edinburgh Minimal Media*)

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Potasio hidrógeno ftalato | 3 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ | 2,2 g/l |
| NH ₄ Cl | 5 g/l |
| Glucosa | 2 % (p/v) |
| Sales | 20 ml/l |
| Vitaminas | 1 ml/l |
| Minerales | 0,1 ml/l |

Sales (50x):

| | |
|--------------------------------------|----------|
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 53,5 g/l |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0,74 g/l |
| KCl | 50 g/l |
| Na ₂ SO ₄ | 2 g/l |

Vitaminas (1000x):

| | |
|--------------------|---------|
| Pantotenato sódico | 1 g/l |
| Ácido nicotínico | 10 g/l |
| Inositol | 10 g/l |
| Biotina | 10 mg/l |

Minerales (10.000x):

| | |
|---|---------|
| H ₃ BO ₃ | 5 g/l |
| MnSO ₄ | 4 g/l |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 4 g/l |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 2 g/l |
| H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O | 0,4 g/l |
| KI | 1 g/l |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,4 g/l |
| Ácido cítrico | 10 g/l |

1.2. Medios empleados para inducir la esporulación

Medio MEA

| | |
|-------------------|-----|
| Extracto de Malta | 3 % |
| Agar | 2 % |
| Ajustar a pH 5,5 | |

Medio MM-N

Igual que el EMM, pero sin NH₄Cl

2. Medios de *Escherichia coli*

Medio LB (Luria Bertani medium)

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

Bibliografía

- Abd-el-Al, A.T., y H.J. Phaff. 1968. Exo- β -glucanases in yeast. *Biochem J.* 109:347-60.
- Abe, H., y C. Shimoda. 2000. Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor *mei4* and a genome-wide search for its target genes. *Genetics.* 154:1497-508.
- Adams, A.E., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat, y J.R. Pringle. 1990. *CDC42* and *CDC43*, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 111:131-42.
- Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology.* 150:2029-35.
- Alao, J.P., y P. Sunnerhagen. 2008. *rad3* and *sty1* function in *Schizosaccharomyces pombe*: an integrated response to DNA damage and environmental stress? *Mol Microbiol.* 68:246-54.
- Almeida, R., y M. Tyers. 2009. Cell size control: governed by a spatial gradient. *Dev Cell.* 17:3-4.
- Alonso-Núñez, M.L., H. An, A.B. Martín-Cuadrado, S. Mehta, C. Petit, M. Sipiczki, F. del Rey, K.L. Gould, y C.R. Vázquez de Aldana. 2005. *ace2p* controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 16:2003-17.
- Amann, K.J., y T.D. Pollard. 2001. The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol.* 3:306-10.
- Amoah-Buahin, E., N. Bone, y J. Armstrong. 2005. Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* 4:1287-97.
- Anders, A., P.C. Lourenco, y K.E. Sawin. 2006. Non-core components of the fission yeast γ -tubulin complex. *Mol Biol Cell.* 17:5075-93.
- Arai, R., y I. Mabuchi. 2002. F-actin ring formation and the role of F-actin cables in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 115:887-98.
- Arellano, M., H. Cartagena-Lirola, M.A. Nasser Hajibagheri, A. Durán, y M. H. Valdivieso. 2000. Proper ascospore maturation requires the *chs1⁺* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol.* 35:79-89.
- Arellano, M., T. Niccoli, y P. Nurse. 2002. *tea3p* is a cell end marker activating polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol.* 12:751-6.
- Attanapola, S.L., C.J. Alexander, y D.P. Mulvihill. 2009. *ste20*-kinase-dependent TEDS-site phosphorylation modulates the dynamic localisation and endocytic function of the fission yeast class I myosin, *myo1*. *J Cell Sci.* 122:3856-61.
- Bahler, J. 2005. A transcriptional pathway for cell separation in fission yeast. *Cell Cycle.* 4:39-41.
- Bahler, J., y P. Nurse. 2001. Fission yeast *pom1p* kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *EMBO J.* 20:1064-73.
- Bahler, J., y J.R. Pringle. 1998. *pom1p*, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* 12:1356-70.
- Bahler, J., A.B. Steever, S. Wheatley, Y. Wang, J.R. Pringle, K.L. Gould, y D. McCollum. 1998a. Role of polo kinase and *mid1p* in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol.* 143:1603-16.
- Bahler, J., J.Q. Wu, M.S. Longtine, N.G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A.B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, y J.R. Pringle. 1998b. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 14:943-51.
- Baladrón, V., S. Ufano, E. Dueñas, A.B. Martín-Cuadrado, F. del Rey, y C.R. Vázquez de Aldana. 2002. *Eng1p*, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 1:774-86.
- Behrens, R., y P. Nurse. 2002. Roles of fission yeast *tea1p* in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157:783-93.
- Bezanilla, M., J.M. Wilson, y T.D. Pollard. 2000. Fission yeast myosin-II isoforms assemble into contractile rings at distinct times during mitosis. *Curr Biol.* 10:397-400.
- Blanchoin, L., K.J. Amann, H.N. Higgs, J.B. Marchand, D.A. Kaiser, y T.D. Pollard. 2000. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature.* 404:1007-11.
- Blanchoin, L., T.D. Pollard, y S.E. Hitchcock-DeGregori. 2001. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol.* 11:1300-4.
- Bompard, G., y E. Caron. 2004. Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol.* 166:957-62.
- Bonangelino, C.J., E.M. Chavez, y J.S. Bonifacino. 2002. Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 13:2486-501.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Browning, H., J. Hayles, J. Mata, L. Aveline, P. Nurse, y J.R. McIntosh. 2000. *tea2p* is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *J Cell Biol.* 151:15-28.
- Brunner, D., y P. Nurse. 2000a. CLIP170-like *tip1p* spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell.* 102:695-704.

- Brunner, D., y P. Nurse. 2000b. New concepts in fission yeast morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355:873-7.
- Busch, K.E., y D. Brunner. 2004. The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol.* 14:548-59.
- Busch, K.E., J. Hayles, P. Nurse, y D. Brunner. 2004. tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev Cell.* 6:831-43.
- Carnahan, R.H., y K.L. Gould. 2003. The PCH family protein, cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol.* 162:851-62.
- Castagnetti, S., R. Behrens, y P. Nurse. 2005. end4/sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 118:1843-50.
- Cid, V.J., A. Durán, F. del Rey, M.P. Snyder, C. Nombela, y M. Sánchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 59:345-86.
- Clotet, J., y F. Posas. 2007. Control of cell cycle in response to osmotic stress: lessons from yeast. *Methods Enzymol.* 428:63-76.
- Codlin, S., R.L. Haines, y S.E. Mole. 2008. btn1 affects endocytosis, polarization of sterol-rich membrane domains and polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Traffic.* 9:936-50.
- Coffman, V.C., A.H. Nile, I.J. Lee, H. Liu, y J.Q. Wu. 2009. Roles of Formin Nodes and Myosin Motor Activity in mid1p-dependent Contractile-Ring Assembly during Fission Yeast Cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 20:5195-210
- Colman-Lerner, A., T.E. Chin, y R. Brent. 2001. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell.* 107:739-50.
- Coll, P.M., S.A. Rincón, R.A. Izquierdo, y P. Pérez. 2007. hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *EMBO J.* 26:1865-77.
- Coll, P.M., Y. Trillo, A. Ametzazurra, y P. Pérez. 2003. gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 14:313-23.
- Conaway, R.C., y J.W. Conaway. 2009. The INO80 chromatin remodeling complex in transcription, replication and repair. *Trends Biochem Sci.* 34:71-7.
- Cortés, J.C., E. Carnero, J. Ishiguro, Y. Sánchez, A. Durán, y J.C. Ribas. 2005. The novel fission yeast (1,3) β -D-glucan synthase catalytic subunit bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci.* 118:157-74.
- Cortés, J.C., M. Konomi, I.M. Martins, J. Muñoz, M.B. Moreno, M. Osumi, A. Durán, y J.C. Ribas. 2007. The (1,3) β -D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol.* 65:201-17.
- Costa, R., y K.R. Ayscough. 2005. Interactions between Sla1p, Lsb5p and Arf3p in yeast endocytosis. *Biochem Soc Trans.* 33:1273-5.
- Costa, R., D.T. Warren, y K.R. Ayscough. 2005. Lsb5p interacts with actin regulators Sla1p and Las17p, ubiquitin and Arf3p to couple actin dynamics to membrane trafficking processes. *Biochem J.* 387:649-58.
- Crouzet, M., M. Urdaci, L. Dulau, y M. Aigle. 1991. Yeast mutant affected for viability upon nutrient starvation: characterization and cloning of the *RVS161* gene. *Yeast.* 7:727-43.
- Chan, C., C.C. Beltzner, y T.D. Pollard. 2009. Cofilin dissociates arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol.* 19:537-45.
- Chang, E.C., M. Barr, Y. Wang, V. Jung, H.P. Xu, y M.H. Wigler. 1994. Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell.* 79:131-41.
- Chang, F. 1999. Movement of a cytokinesis factor cdc12p to the site of cell division. *Curr Biol.* 9:849-52.
- Chang, F. 2000. Microtubule and actin-dependent movement of the formin cdc12p in fission yeast. *Microsc Res Tech.* 49:161-7.
- Chang, F., D. Drubin, y P. Nurse. 1997. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol.* 137:169-82.
- Chang, F., y M. Peter. 2003. Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol.* 5:294-9.
- Chen, H., B.W. Bernstein, y J.R. Bamburg. 2000. Regulating actin-filament dynamics *in vivo*. *Trends Biochem Sci.* 25:19-23.
- Cho, S.K., y S.L. Hofmann. 2004. pdf1, a palmitoyl protein thioesterase 1 ortholog in *Schizosaccharomyces pombe*: a yeast model of infantile Batten disease. *Eukaryot Cell.* 3:302-10.
- D'Agostino, J.L., y B.L. Goode. 2005. Dissection of Arp2/3 complex actin nucleation mechanism and distinct roles for its nucleation-promoting factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 171:35-47.
- Daga, R.R., y F. Chang. 2005. Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8228-32.
- Daga, R.R., y P. Nurse. 2008. Interphase microtubule bundles use global cell shape to guide spindle alignment in fission yeast. *J Cell Sci.* 121:1973-80.
- Dalhaimer, P., T.D. Pollard, y B.J. Nolen. 2008. Nucleotide-mediated conformational changes of monomeric actin and Arp3 studied by molecular dyna-

- mic simulations. *J Mol Biol.* 376:166-83.
- Das, M., D.J. Wiley, X. Chen, K. Shah, y F. Verde. 2009. The conserved NDR kinase orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase cdc42. *Curr Biol.* 19:1314-9.
- Das, M., D.J. Wiley, S. Medina, H.A. Vincent, M. Larrera, A. Oriolo, y F. Verde. 2007. Regulation of cell diameter, for3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP rga4p. *Mol Biol Cell.* 18:2090-101.
- Daugherty, K.M., y B.L. Goode. 2008. Functional surfaces on the p35/ARPC2 subunit of Arp2/3 complex required for cell growth, actin nucleation, and endocytosis. *J Biol Chem.* 283:16950-9.
- Davey, J. 1998. Fusion of a fission yeast. *Yeast.* 14:1529-66.
- Dayel, M.J., E.A. Holleran, y R.D. Mullins. 2001. Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14871-6.
- Dayel, M.J., y R.D. Mullins. 2004. Activation of Arp2/3 complex: addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2. *PLoS Biol.* 2:E91.
- de Medina-Redondo, M., Y. Arnáiz-Pita, T. Fontaine, F. del Rey, J.P. Latgé, y C.R. Vázquez de Aldana. 2008. The β -1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol.* 68:1283-99.
- Dekker, N., D. Speijer, C.H. Grun, M. van den Berg, A. de Haan, y F. Hochstenbach. 2004. Role of the α -glucanase agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell.* 15:3903-14.
- Dekker, N., J. van Rijssel, B. Distel, y F. Hochstenbach. 2007. Role of the α -glucanase agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast.* 24:279-88.
- Dewar, H., D.T. Warren, F.C. Gardiner, C.G. Gourlay, N. Satish, M.R. Richardson, P.D. Andrews, y K.R. Ayscough. 2002. Novel proteins linking the actin cytoskeleton to the endocytic machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 13:3646-61.
- Ding, D.Q., Y. Chikashige, T. Haraguchi, y Y. Hiraoka. 1998. Oscillatory nuclear movement in fission yeast meiotic prophase is driven by astral microtubules, as revealed by continuous observation of chromosomes and microtubules in living cells. *J Cell Sci.* 111:701-12.
- Dodgson, J., H. Avula, K.L. Hoe, D.U. Kim, H.O. Park, J. Hayles, y J. Armstrong. 2009. Functional genomics of adhesion, invasion, and mycelial formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* 8:1298-306.
- Donnelly, S.F., M.J. Pocklington, D. Pallotta, y E. Orr. 1993. A proline-rich protein, verprolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 10:585-96.
- Doolin, M.T., A.L. Johnson, L.H. Johnston, y G. Butler. 2001. Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol.* 40:422-32.
- Drees, B.L., B. Sundin, E. Brazeau, J.P. Caviston, G.C. Chen, W. Guo, K.G. Kozminski, M.W. Lau, J.J. Moskow, A. Tong, L.R. Schenkman, A. McKenzie, 3rd, P. Brennwald, M. Longtine, E. Bi, C. Chan, P. Novick, C. Boone, J.R. Pringle, T.N. Davis, S. Fields, y D.G. Drubin. 2001. A protein interaction map for cell polarity development. *J Cell Biol.* 154:549-71.
- Duncan, M.C., M.J. Cope, B.L. Goode, B. Wendland, y D.G. Drubin. 2001. Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.* 3:687-90.
- Egel, R. 2000. Fission yeast on the brink of meiosis. *Bioessays.* 22:854-60.
- Egile, C., I. Rouiller, X.P. Xu, N. Volkmann, R. Li, y D. Hanein. 2005. Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions. *PLoS Biol.* 3:e383.
- Encinar del Dedo, J., E. Dueñas, Y. Arnáiz, F. del Rey, y C.R. Vázquez de Aldana. 2009. β -glucanase eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* 8:1278-86.
- Esteban, P.F., I. Ríos, R. García, E. Dueñas, J. Plá, M. Sánchez, C.R. Vázquez de Aldana, y F. del Rey. 2005. Characterization of the *CaENG1* gene encoding an endo-1,3- β -glucanase involved in cell separation in *Candida albicans*. *Curr Microbiol.* 51:385-92.
- Evangelista, M., B.M. Klebl, A.H. Tong, B.A. Webb, T. Leeuw, E. Leberer, M. Whiteway, D.Y. Thomas, y C. Boone. 2000. A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 148:353-62.
- Farkas, V., P. Biely, y S. Bauer. 1973. Extracellular β -glucanases of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 321:246-55.
- Fava, F., B. Raynaud-Messina, J. Leung-Tack, L. Mazzolini, M. Li, J.C. Guillemot, D. Cachot, Y. Tollon, P. Ferrara, y M. Wright. 1999. Human 76p: A new member of the γ -tubulin-associated protein family. *J Cell Biol.* 147:857-68.
- Feierbach, B., y F. Chang. 2001. Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol.* 11:1656-65.
- Feierbach, B., F. Verde, y F. Chang. 2004. Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol.* 165:697-707.
- Fliegmann, J., A. Mithofer, G. Wanner, y J. Ebel. 2004.

- An ancient enzyme domain hidden in the putative β -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J Biol Chem.* 279:1132-40.
- Fontaine, T., R.P. Hartland, A. Beauvais, M. Diaquin, y J.P. Latgé. 1997. Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Biochem.* 243:315-21.
- Foury, F., y M. Kucej. 2002. Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol.* 6:106-11.
- Friesen, H., C. Humphries, Y. Ho, O. Schub, K. Colwill, y B. Andrews. 2006. Characterization of the yeast amphiphysins Rvs161p and Rvs167p reveals roles for the Rvs heterodimer *in vivo*. *Mol Biol Cell.* 17:1306-21.
- Fujita, A., L. Vardy, M.A. Garcia, y T. Toda. 2002. A fourth component of the fission yeast γ -tubulin complex, alp16, is required for cytoplasmic microtubule integrity and becomes indispensable when γ -tubulin function is compromised. *Mol Biol Cell.* 13:2360-73.
- Fukui, Y., y M. Yamamoto. 1988. Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to ras1. *Mol Gen Genet.* 215:26-31.
- Gachet, Y., y J.S. Hyams. 2005. Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci.* 118:4231-42.
- Galletta, B.J., y J.A. Cooper. 2009. Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol.* 21:20-7.
- Gancedo, C., y C.L. Flores. 2008. Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72:197-210.
- Gandhi, M., V. Achard, L. Blanchoin, y B.L. Goode. 2009. Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol Cell.* 34:364-74.
- Gao, L., y A. Bretscher. 2008. Analysis of unregulated formin activity reveals how yeast can balance F-actin assembly between different microfilament-based organizations. *Mol Biol Cell.* 19:1474-84.
- Gao, L., y A. Bretscher. 2009. Polarized growth in budding yeast in the absence of a localized formin. *Mol Biol Cell.* 20:2540-8.
- García, I., D. Jiménez, V. Martín, A. Durán, y Y. Sánchez. 2005. The α -glucanase agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell.* 97:569-76.
- García, I., V. Tajadura, V. Martín, T. Toda, y Y. Sánchez. 2006. Synthesis of α -glucans in fission yeast spores is carried out by three α -glucan synthase paralogues, mok12p, mok13p and mok14p. *Mol Microbiol.* 59:836-53.
- García, P., I. García, F. Marcos, G.R. de Garibay, y Y. Sánchez. 2009. Fission yeast rfg2p is a rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of rfg1p. *Genetics.* 181:1321-34.
- Germann, M., E. Swain, L. Bergman, y J.T. Nickels, Jr. 2005. Characterizing the sphingolipid signaling pathway that remediates defects associated with loss of the yeast amphiphysin-like orthologs, Rvs161p and Rvs167p. *J Biol Chem.* 280:4270-8.
- Girao, H., M.I. Geli, y F.Z. Idrissi. 2008. Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 582:2112-9.
- Glynn, J.M., R.J. Lustig, A. Berlin, y F. Chang. 2001. Role of bud6p and tea1p in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast. *Curr Biol.* 11:836-45.
- Golub, E.I. 1988. 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 16:1641.
- Goode, B.L., y M.J. Eck. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem.* 76:593-627.
- Goode, B.L., A.A. Rodal, G. Barnes, y D.G. Drubin. 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol.* 153:627-34.
- Gournier, H., E.D. Goley, H. Niederstrasser, T. Trinh, y M.D. Welch. 2001. Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Mol Cell.* 8:1041-52.
- Guertin, D.A., S. Trautmann, y D. McCollum. 2002. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:155-78.
- Gunawardane, R.N., S.B. Lizarraga, C. Wiese, A. Wilde, y Y. Zheng. 2000. γ -Tubulin complexes and their role in microtubule nucleation. *Curr Top Dev Biol.* 49:55-73.
- Hagan, I.M. 1998. The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci.* 111:1603-12.
- Hagan, I.M., y J.S. Hyams. 1988. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 89 :343-57.
- Hagan, I.M., y J. Petersen. 2000. The microtubule organizing centers of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Top Dev Biol.* 49:133-59.
- Hartwell, L.H. 2004. Yeast and cancer. *Biosci Rep.* 24:523-44.
- Hartwell, L.H., J. Culotti, y B. Reid. 1970. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 66:352-9.
- Hartwell, L.H., R.K. Mortimer, J. Culotti, y M. Culotti.

1973. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of Cdc Mutants. *Genetics*. 74:267-286.
- Hayles, J., y P. Nurse. 2001. A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:647-56.
- Heckman, D.S., D.M. Geiser, B.R. Eidell, R.L. Stauffer, N.L. Kardos, y S.B. Hedges. 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*. 293:1129-33.
- Hedges, S.B. 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet*. 3:838-49.
- Henrissat, B., y A. Bairoch. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*. 316:695-6.
- Henrissat, B., y G. Davies. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*. 7:637-44.
- Higgs, H.N., y T.D. Pollard. 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*. 70:649-76.
- Hill, J., K.A. Donald, y D.E. Griffiths. 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res*. 19:5791.
- Hirota, K., K. Tanaka, K. Ohta, y M. Yamamoto. 2003. *gef1p* and *scd1p*, the two GDP-GTP exchange factors for *cdc42p*, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. 14:3617-27.
- Ho, H.Y., R. Rohatgi, A.M. Lebensohn, M. Le, J. Li, S.P. Gygi, y M.W. Kirschner. 2004. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell*. 118:203-16.
- Horie, S., Y. Watanabe, K. Tanaka, S. Nishiwaki, H. Fujioka, H. Abe, M. Yamamoto, y C. Shimoda. 1998. The *Schizosaccharomyces pombe mei4+* gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol*. 18:2118-29.
- Horio, T., S. Uzawa, M.K. Jung, B.R. Oakley, K. Tanaka, y M. Yanagida. 1991. The fission yeast γ -tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J Cell Sci*. 99:693-700.
- Huang, T.Y., M. Renaud-Young, y D. Young. 2005. *nak1* interacts with *hob1* and *wsp1* to regulate cell growth and polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*. 118:199-210.
- Huang, Y., T.G. Chew, W. Ge, y M.K. Balasubramanian. 2007. Polarity determinants *tea1p*, *tea4p*, and *pom1p* inhibit division-septum assembly at cell ends in fission yeast. *Dev Cell*. 12:987-96.
- Huang, Y., H. Yan, y M.K. Balasubramanian. 2008. Assembly of normal actomyosin rings in the absence of *mid1p* and cortical nodes in fission yeast. *J Cell Biol*. 183:979-88.
- Humbel, B.M., M. Konomi, T. Takagi, N. Kamasawa, S.A. Ishijima, y M. Osumi. 2001. *In situ* localization of β -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 18:433-44.
- Idrissi, F.Z., H. Grotsch, I.M. Fernández-Golbano, C. Presciatto-Baschong, H. Riezman, y M.I. Geli. 2008. Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. *J Cell Biol*. 180:1219-32.
- Imai, Y., y M. Yamamoto. 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.
- Iwaki, T., N. Tanaka, H. Takagi, Y. Giga-Hama, y K. Takegawa. 2004. Characterization of *end4+*, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 21:867-81.
- Jeffery, C.J. 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci*. 24:8-11.
- Jeffery, C.J. 2005. Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. *Mass Spectrom Rev*. 24:772-82.
- Jeffery, C.J. 2009. Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst*. 5:345-50.
- Jin, H., y D.C. Amberg. 2000. The secretory pathway mediates localization of the cell polarity regulator *Aip3p/Bud6p*. *Mol Biol Cell*. 11:647-61.
- Johnson, D.I. 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63:54-105.
- Johnson, D.I., y J.R. Pringle. 1990. Molecular characterization of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*. 111:143-52.
- Jonsdottir, G.A., y R. Li. 2004. Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Curr Biol*. 14:1604-9.
- Kaksonen, M. 2008. Taking apart the endocytic machinery. *J Cell Biol*. 180:1059-60.
- Kaksonen, M., Y. Sun, y D.G. Drubin. 2003. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*. 115:475-87.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, y D.G. Drubin. 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*. 123:305-20.
- Kamasaki, T., R. Arai, M. Osumi, y I. Mabuchi. 2005. Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol*. 7:916-7.
- Kamasaki, T., M. Osumi, y I. Mabuchi. 2007. Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol*. 178:765-71.
- Kelly, A.E., H. Kranitz, V. Dotsch, y R.D. Mullins. 2006. Actin binding to the central domain of WASP/Scar proteins plays a critical role in the activation of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem*. 281:10589-97.

- Kelly, M., J. Burke, M. Smith, A. Klar, y D. Beach. 1988. Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J.* 7:1537-47.
- Kim, K., B.J. Galletta, K.O. Schmidt, F.S. Chang, K.J. Blumer, y J.A. Cooper. 2006. Actin-based motility during endocytosis in budding yeast. *Mol Biol Cell.* 17:1354-63.
- Kovar, D.R. 2006. Cell polarity: formin on the move. *Curr Biol.* 16:R535-8.
- Kovar, D.R., E.S. Harris, R. Mahaffy, H.N. Higgs, y T.D. Pollard. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell.* 124:423-35.
- Kovar, D.R., J.R. Kuhn, A.L. Tichy, y T.D. Pollard. 2003. The fission yeast cytokinesis formin cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol.* 161:875-87.
- Krawchuk, M.D., y W.P. Wahls. 1999. High-efficiency gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* using a modular, PCR-based approach with long tracts of flanking homology. *Yeast.* 15:1419-27.
- Krogan, N.J., G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A.P. Tikuisis, T. Punna, J.M. Peregrin-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M.D. Robinson, A. Paccanaro, J.E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D.P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M.M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S.R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J.J. Rilstone, K. Gandi, N.J. Thompson, G. Musso, P. St Onge, S. Ghanny, M.H. Lam, G. Butland, A.M. Altaf-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O'Shea, J.S. Weissman, C.J. Ingles, T.R. Hughes, J. Parkinson, M. Gerstein, S.J. Wodak, A. Emili, y J.F. Greenblatt. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 440:637-43.
- Kuranda, M.J., y P.W. Robbins. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 266:19758-67.
- Kushner, S.R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. *En Genetic Engineering. H. W. Boyer y S. Nicosia (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 17-24.*
- La Carbona, S., y X. Le Goff. 2006. Spatial regulation of cytokinesis by the kin1 and pom1 kinases in fission yeast. *Curr Genet.* 50:377-91.
- Lappalainen, P., y D.G. Drubin. 1997. Cofilin promotes rapid actin filament turnover *in vivo*. *Nature.* 388:78-82.
- Le Clainche, C., D. Didry, M.F. Carlier, y D. Pantaloni. 2001. Activation of Arp2/3 complex by Wiskott-Aldrich Syndrome protein is linked to enhanced binding of ATP to Arp2. *J Biol Chem.* 276:46689-92.
- Le Clainche, C., D. Pantaloni, y M.F. Carlier. 2003. ATP hydrolysis on actin-related protein 2/3 complex causes debranching of dendritic actin arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6337-42.
- Lechler, T., y R. Li. 1997. *In vitro* reconstitution of cortical actin assembly sites in budding yeast. *J Cell Biol.* 138:95-103.
- Lechler, T., A. Shevchenko, y R. Li. 2000. Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization. *J Cell Biol.* 148:363-73.
- Lee, W.L., M. Bezanilla, y T.D. Pollard. 2000. Fission yeast myosin-I, myo1p, stimulates actin assembly by arp2/3 complex and shares functions with WASp. *J Cell Biol.* 151:789-800.
- Li, F., y H.N. Higgs. 2003. The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by auto-inhibition. *Curr Biol.* 13:1335-40.
- Li, R. 1997. Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 136:649-58.
- Liu, J., Y. Sun, D.G. Drubin, y G.F. Oster. 2009. The mechanochemistry of endocytosis. *PLoS Biol.* 7:e1000204.
- Liu, J., X. Tang, H. Wang, y M. Balasubramanian. 2000. bgs2p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 478:105-8.
- Lombardi, R., y H. Riezman. 2001. Rvs161p and Rvs167p, the two yeast amphiphysin homologs, function together *in vivo*. *J Biol Chem.* 276:6016-22.
- Madania, A., P. Dumoulin, S. Grava, H. Kitamoto, C. Scharer-Brodbeck, A. Soulard, V. Moreau, y B. Winsor. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell.* 10:3521-38.
- Mahaffy, R.E., y T.D. Pollard. 2006. Kinetics of the formation and dissociation of actin filament branches mediated by Arp2/3 complex. *Biophys J.* 91:3519-28.
- Marks, J., I.M. Hagan, y J.S. Hyams. 1986. Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl.* 5:229-41.
- Marks, J., y J.S. Hyams. 1985. Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol.* 39:27-32.
- Martín-Cuadrado, A.B., E. Dueñas, M. Sipiczki, C.R. Vázquez de Aldana, y F. del Rey. 2003. The endo- β -1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 116:1689-98.
- Martín-Cuadrado, A.B., J. Encinar del Dedo, M. de Medina-Redondo, T. Fontaine, F. del Rey, J.P. Latgé, y C.R. Vázquez de Aldana. 2008a. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -glucanase

- eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol Microbiol.* 69:188-200.
- Martín-Cuadrado, A.B., T. Fontaine, P.F. Esteban, J. Encinar del Dedo, M. de Medina-Redondo, F. del Rey, J.P. Latgé, y C.R. Vázquez de Aldana. 2008b. Characterization of the endo- β -1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family. *Fungal Genet Biol.* 45:542-53.
- Martín-Cuadrado, A.B., J.L. Morrell, M. Konomi, H. An, C. Petit, M. Osumi, M. Balasubramanian, K.L. Gould, F. del Rey, y C.R. Vázquez de Aldana. 2005. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell.* 16:4867-81.
- Martín-García, R., y D.P. Mulvihill. 2009. Myosin V spatially regulates microtubule dynamics and promotes the ubiquitin-dependent degradation of the fission yeast CLIP-170 homologue, tip1. *J Cell Sci.* 122:3862-72.
- Martin, K., B.M. McDougall, S. McIlroy, J. Chen, y R.J. Seviour. 2007a. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol Rev.* 31:168-92.
- Martin, S.G. 2009. Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends Cell Biol.* 19:447-54.
- Martin, S.G., y M. Berthelot-Grosjean. 2009. Polar gradients of the DYRK-family kinase pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature.* 459:852-6.
- Martin, S.G., y F. Chang. 2005. New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle.* 4:1046-9.
- Martin, S.G., y F. Chang. 2006. Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol.* 16:1161-70.
- Martin, S.G., W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, y F. Chang. 2005. tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell.* 8:479-91.
- Martin, S.G., S.A. Rincón, R. Basu, P. Pérez, y F. Chang. 2007b. Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell.* 18:4155-67.
- Martín, V., J.C. Ribas, E. Carnero, A. Durán, y Y. Sánchez. 2000. *bgs2⁺*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol.* 38:308-21.
- Mata, J., y J. Bahler. 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., R. Lyne, G. Burns, y J. Bahler. 2002. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet.* 32:143-7.
- Mata, J., y P. Nurse. 1997. tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell.* 89:939-49.
- Mata, J., y P. Nurse. 1998. Discovering the poles in yeast. *Trends Cell Biol.* 8:163-7.
- Mata, J., A. Wilbrey, y J. Bahler. 2007. Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol.* 8:R217.
- Matsuo, Y., K. Tanaka, H. Matsuda, y M. Kawamukai. 2005. *cda1⁺*, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 579:2737-43.
- Matsuyama, A., R. Arai, Y. Yashiroda, A. Shirai, A. Kamata, S. Sekido, Y. Kobayashi, A. Hashimoto, M. Hamamoto, Y. Hiraoka, S. Horinouchi, y M. Yoshida. 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol.* 24:841-7.
- Matsuyama, A., A. Shirai, y M. Yoshida. 2008. A novel series of vectors for chromosomal integration in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 374:315-9.
- Mayer, B.J. 2001. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci.* 114:1253-63.
- McGrath, C.E., T.V. Vuong, y D.B. Wilson. 2009. Site-directed mutagenesis to probe catalysis by a *Thermobifida fusca* β -1,3-glucanase (Lam81A). *Protein Eng Des Sel.* 22:375-82.
- McGrath, C.E., y D.B. Wilson. 2006. Characterization of a *Thermobifida fusca* β -1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation. *Biochemistry.* 45:14094-100.
- Mendenhall, M.D., y A.E. Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1191-243.
- Merla, A., y D.I. Johnson. 2000. The cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol.* 79:469-77.
- Miller, P.J., y D.I. Johnson. 1994. cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 14:1075-83.
- Minc, N., S.V. Bratman, R. Basu, y F. Chang. 2009. Establishing new sites of polarization by microtubules. *Curr Biol.* 19:83-94.
- Mitchison, J.M., y J. Creanor. 1971. Induction synchrony in the fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res.* 67:368-74.
- Mitchison, J.M., y P. Nurse. 1985. Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 75:357-76.
- Moreau, V., J.M. Galan, G. Devilliers, R. Haguenaer-Tsapis, y B. Winsor. 1997. The yeast actin-related

- protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol Biol Cell*. 8:1361-75.
- Moreau, V., A. Madania, R.P. Martin, y B. Winson. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 134:117-32.
- Moreno, S., A. Klar, y P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*. 194:795-823.
- Moseley, J.B., y B.L. Goode. 2005. Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem*. 280:28023-33.
- Moseley, J.B., y B.L. Goode. 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70:605-45.
- Moseley, J.B., A. Mayeux, A. Paoletti, y P. Nurse. 2009. A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature*. 459:857-60.
- Moseley, J.B., I. Sagot, A.L. Manning, Y. Xu, M.J. Eck, D. Pellman, y B.L. Goode. 2004. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*. 15:896-907.
- Motegi, F., M. Mishra, M.K. Balasubramanian, y I. Mabuchi. 2004. Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by mid1 in fission yeast. *J Cell Biol*. 165:685-95.
- Motegi, F., K. Nakano, y I. Mabuchi. 2000. Molecular mechanism of myosin-II assembly at the division site in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*. 113:1813-25.
- Mouyna, I., J. Sarfati, P. Recco, T. Fontaine, B. Hennisatz, y J.P. Latgé. 2002. Molecular characterization of a cell wall-associated $\beta(1-3)$ endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*. 40:455-64.
- Mulvihill, D.P., S.R. Edwards, y J.S. Hyams. 2006. A critical role for the type V myosin, myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 63:149-61.
- Mulvihill, D.P., P.J. Pollard, T.Z. Win, y J.S. Hyams. 2001. Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast. *Curr Biol*. 11:1124-7.
- Munn, A.L., B.J. Stevenson, M.I. Geli, y H. Riezman. 1995. *END5*, *END6*, and *END7*: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 6:1721-42.
- Murray, J.M., y D.I. Johnson. 2001. The cdc42p GTPase and its regulators nrf1p and scd1p are involved in endocytic trafficking in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 276:3004-9.
- Nakano, K., y I. Mabuchi. 2006a. Actin-capping protein is involved in controlling organization of actin cytoskeleton together with ADF/cofilin, profilin and F-actin crosslinking proteins in fission yeast. *Genes Cells*. 11:893-905.
- Nakano, K., y I. Mabuchi. 2006b. Actin-depolymerizing protein adf1 is required for formation and maintenance of the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 17:1933-45.
- Navarro, P., P. Durrens, y M. Aigle. 1997. Protein-protein interaction between the *RVS161* and *RVS167* gene products of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1343:187-92.
- Nelson, B., C. Kurischko, J. Horecka, M. Mody, P. Nair, L. Pratt, A. Zougman, L.D. McBroom, T.R. Hughes, C. Boone, y F.C. Luca. 2003. RAM: a conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 14:3782-803.
- Newman, J.R., y A.E. Keating. 2003. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science*. 300:2097-101.
- Niccoli, T., y P. Nurse. 2002. Different mechanisms of cell polarisation in vegetative and shmooing growth in fission yeast. *J Cell Sci*. 115:1651-62.
- Nolen, B.J., y T.D. Pollard. 2008. Structure and biochemical properties of fission yeast Arp2/3 complex lacking the Arp2 subunit. *J Biol Chem*. 283:26490-8.
- Nombela, C., M. Molina, R. Cenamor, y M. Sánchez. 1988. Yeast β -glucanases: a complex system of secreted enzymes. *Microbiol Sci*. 5:328-32.
- Nurse, P. 1996. The central role of a CDK in controlling the fission yeast cell cycle. *Harvey Lect*. 92:55-64.
- Nurse, P. 2000. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*. 100:71-8.
- Nurse, P., y P. Thuriaux. 1980. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 96:627-37.
- Nurse, P., P. Thuriaux, y K. Nasmyth. 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. 146:167-78.
- Oakley, B.R. 2000. γ -Tubulin. *Curr Top Dev Biol*. 49:27-54.
- Oegema, K., C. Wiese, O.C. Martin, R.A. Milligan, A. Iwamatsu, T.J. Mitchison, y Y. Zheng. 1999. Characterization of two related Drosophila γ -tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol*. 144:721-33.
- Ohtaka, A., D. Okuzaki, T.T. Saito, y H. Nojima. 2007. mcp4, a meiotic coiled-coil protein, plays a role in F-actin positioning during *Schizosaccharomyces pombe* meiosis. *Eukaryot Cell*. 6:971-83.
- Pan, F., C. Egile, T. Lipkin, y R. Li. 2004. ARPC1/Arc40 mediates the interaction of the actin-related protein 2 and 3 complex with Wiskott-Aldrich syndrome protein family activators. *J Biol Chem*.

- 279:54629-36.
- Panchal, S.C., D.A. Kaiser, E. Torres, T.D. Pollard, y M.K. Rosen. 2003. A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nat Struct Biol.* 10:591-8.
- Paoletti, A., y F. Chang. 2000. Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 11:2757-73.
- Pardo, M., y P. Nurse. 2003. Equatorial retention of the contractile actin ring by microtubules during cytokinesis. *Science.* 300:1569-74.
- Petersen, J., M.J. Heitz, y I.M. Hagan. 1998a. Conjugation in *S. pombe*: identification of a microtubule-organising centre, a requirement for microtubules and a role for mad2. *Curr Biol.* 8:963-6.
- Petersen, J., O. Nielsen, R. Egel, y I.M. Hagan. 1998b. F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 111:867-76.
- Petersen, J., O. Nielsen, R. Egel, y I.M. Hagan. 1998c. FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin fus1 to the projection tip during conjugation. *J Cell Biol.* 141:1217-28.
- Petersen, J., D. Weilguny, R. Egel, y O. Nielsen. 1995. Characterization of fus1 of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol Cell Biol.* 15:3697-707.
- Petit, C.S., S. Mehta, R.H. Roberts, y K.L. Gould. 2005. ace2p contributes to fission yeast septin ring assembly by regulating mid2⁺ expression. *J Cell Sci.* 118:5731-42.
- Phillips, S.N., N. Muzaffar, S. Codlin, C.A. Korey, P.E. Taschner, G. de Voer, S.E. Mole, y D.A. Pearce. 2006. Characterizing pathogenic processes in Batten disease: use of small eukaryotic model systems. *Biochim Biophys Acta.* 1762:906-19.
- Piel, M., y P.T. Tran. 2009. Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr Biol.* 19:R823-7.
- Pollard, T.D. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 36:451-77.
- Pollard, T.D., y C.C. Beltzner. 2002. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol.* 12:768-74.
- Pruyne, D., y A. Bretscher. 2000. Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci.* 113:571-85.
- Rajmohan, R., L. Meng, S. Yu, y T. Thanabalu. 2006. WASP suppresses the growth defect of *Saccharomyces cerevisiae* Las17Δ strain in the presence of WIP. *Biochem Biophys Res Commun.* 342:529-36.
- Ribar, B., A. Grallert, E. Olah, y Z. Szallasi. 1999. Deletion of the sep1(+) forkhead transcription factor homologue is not lethal but causes hyphal growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun.* 263:465-74.
- Rincón, S.A., Y. Ye, M.A. Villar-Tajadura, B. Santos, S.G. Martin, y P. Pérez. 2009. pob1 Participates in the cdc42 Regulation of Fission Yeast Actin Cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 20:4390-9.
- Robertson, A.S., E.G. Allwood, A.P. Smith, F.C. Gardiner, R. Costa, S.J. Winder, y K.R. Ayscough. 2009a. The WASP homologue Las17 activates the novel actin-regulatory activity of Ysc84 to promote endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell.* 20:1618-28.
- Robertson, A.S., E. Smythe, y K.R. Ayscough. 2009b. Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 66:2049-65.
- Robinson, R.C., K. Turbedsky, D.A. Kaiser, J.B. Marchand, H.N. Higgs, S. Choe, y T.D. Pollard. 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 294:1679-84.
- Rodal, A.A., L. Kozubowski, B.L. Goode, D.G. Drubin, y J.H. Hartwig. 2005a. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. *Mol Biol Cell.* 16:372-84.
- Rodal, A.A., O. Sokolova, D.B. Robins, K.M. Daugherty, S. Hippenmeyer, H. Riezman, N. Grigorieff, y B.L. Goode. 2005b. Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat Struct Mol Biol.* 12:26-31.
- Rohatgi, R., H.Y. Ho, y M.W. Kirschner. 2000. Mechanism of N-WASP activation by Cdc42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol.* 150:1299-310.
- Rothstein, R. 1991. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* 194:281-301.
- Rouiller, I., X.P. Xu, K.J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T.D. Pollard, N. Volkman, y D. Hanein. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 180:887-95.
- Routhier, E.L., P.S. Donover, y G.C. Prendergast. 2003. hob1⁺, the fission yeast homolog of Bin1, is dispensable for endocytosis or actin organization, but required for the response to starvation or genotoxic stress. *Oncogene.* 22:637-48.
- Russell, P., y P. Nurse. 1987. Negative regulation of mitosis by wee1⁺, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell.* 49:559-67.
- Rustici, G., J. Mata, K. Kivinen, P. Lio, C.J. Penkett, G. Burns, J. Hayles, A. Brazma, P. Nurse, y J. Bahler. 2004. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet.* 36:809-17.
- Sambrook, J., y D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samejima, I., P.C. Lourenco, H.A. Snaithe, y K.E. Sawin. 2005. Fission yeast mto2p regulates microtubule nucleation by the centrosomin-related protein

- mto1p. *Mol Biol Cell*. 16:3040-51.
- Samejima, I., V.J. Miller, L.M. Grocock, y K.E. Sawin. 2008. Two distinct regions of mto1 are required for normal microtubule nucleation and efficient association with the γ -tubulin complex *in vivo*. *J Cell Sci*. 121:3971-80.
- Sandblad, L., K.E. Busch, P. Tittmann, H. Gross, D. Brunner, y A. Hoenger. 2006. The *Schizosaccharomyces pombe* EB1 homolog mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell*. 127:1415-24.
- Santos, B., A.B. Martín-Cuadrado, C.R. Vázquez de Alana, F. del Rey, y P. Pérez. 2005. rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell*. 4:1639-45.
- Sawin, K.E. 1999. GFP fusion proteins as probes for cytology in fission yeast. *Methods Cell Biol*. 58:123-38.
- Sawin, K.E. 2009. Cell cycle: Cell division brought down to size. *Nature*. 459:782-3.
- Sawin, K.E., P.C. Lourenco, y H.A. Snaith. 2004. Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p. *Curr Biol*. 14:763-75.
- Sawin, K.E., y H.A. Snaith. 2004. Role of microtubules and tea1p in establishment and maintenance of fission yeast cell polarity. *J Cell Sci*. 117:689-700.
- Sawin, K.E., y P.T. Tran. 2006. Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast*. 23:1001-14.
- Schaerer-Brodbeck, C., y H. Riezman. 2000. Functional interactions between the p35 subunit of the Arp2/3 complex and calmodulin in yeast. *Mol Biol Cell*. 11:1113-27.
- Schwob, E., y R.P. Martin. 1992. New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. *Nature*. 355:179-82.
- Sheu, Y.J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan, y M. Snyder. 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol*. 18:4053-69.
- Shimoda, C. 2004. Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J Cell Sci*. 117:389-96.
- Sipiczki, M. 2000. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol*. 1:reviews1011.
- Sirotkin, V., C.C. Beltzner, J.B. Marchand, y T.D. Pollard. 2005. Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J Cell Biol*. 170:637-48.
- Sivadon, P., F. Bauer, M. Aigle, y M. Crouzet. 1995. Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast *RVS161* mutant: the Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol Gen Genet*. 246:485-95.
- Skau, C.T., E.M. Neidt, y D.R. Kovar. 2009. Role of tropomyosin in formin-mediated contractile ring assembly in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 20:2160-73.
- Skoumpla, K., A.T. Coulton, W. Lehman, M.A. Geeves, y D.P. Mulvihill. 2007. Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*. 120:1635-45.
- Snaith, H.A., I. Samejima, y K.E. Sawin. 2005. Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J*. 24:3690-9.
- Snaith, H.A., y K.E. Sawin. 2003. Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature*. 423:647-51.
- Soulard, A., T. Lechler, V. Spiridonov, A. Shevchenko, A. Shevchenko, R. Li, y B. Winsor. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery *in vitro*. *Mol Cell Biol*. 22:7889-906.
- Stearns, T., L. Evans, y M. Kirschner. 1991. γ -tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell*. 65:825-36.
- Steinmetz, L.M., C. Scharfe, A.M. Deutschbauer, D. Mokranjac, Z.S. Herman, T. Jones, A.M. Chu, G. Giaever, H. Prokisch, P.J. Oefner, y R.W. Davis. 2002. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*. 31:400-4.
- Streiblova, E., J. Hasek, y E. Jelke. 1984. Septum pattern in ts mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in genes *cdc3*, *cdc4*, *cdc8* and *cdc12*. *J Cell Sci*. 69:47-65.
- Sun, Y., A.C. Martin, y D.G. Drubin. 2006. Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev Cell*. 11:33-46.
- Takeda, T., y F. Chang. 2005. Role of fission yeast myosin I in organization of sterol-rich membrane domains. *Curr Biol*. 15:1331-6.
- Tarassov, K., V. Messier, C.R. Landry, S. Radinovic, M.M. Serna Molina, I. Shames, Y. Malitskaya, J. Vogel, H. Bussey, y S.W. Michnick. 2008. An *in vivo* map of the yeast protein interactome. *Science*. 320:1465-70.
- Tasto, J.J., J.L. Morrell, y K.L. Gould. 2003. An anillin homologue, mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol*. 160:1093-103.
- Tatebe, H., K. Nakano, R. Maximo, y K. Shiozaki. 2008. pom1 DYRK regulates localization of the rga4 GAP to ensure bipolar activation of *cdc42* in fission yeast. *Curr Biol*. 18:322-30.
- Tatebe, H., K. Shimada, S. Uzawa, S. Morigasaki, y K. Shiozaki. 2005. *wsh3/tea4* is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of *tea1* and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr Biol*. 15:1006-15.

- Terenna, C.R., T. Makushok, G. Velve-Casquillas, D. Baigl, Y. Chen, M. Bornens, A. Paoletti, M. Piel, y P.T. Tran. 2008. Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Curr Biol.* 18:1748-53.
- Tolic-Norrelykke, I.M., L. Sacconi, G. Thon, y F.S. Pavone. 2004. Positioning and elongation of the fission yeast spindle by microtubule-based pushing. *Curr Biol.* 14:1181-6.
- Tong, A.H., B. Drees, G. Nardelli, G.D. Bader, B. Brannetti, L. Castagnoli, M. Evangelista, S. Ferracuti, B. Nelson, S. Paoluzi, M. Quondam, A. Zucconi, C.W. Hogue, S. Fields, C. Boone, y G. Cesareni. 2002. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science.* 295:321-4.
- Tonikian, R., X. Xin, C.P. Toret, D. Gfeller, C. Landgraf, S. Panni, S. Paoluzi, L. Castagnoli, B. Currell, S. Seshagiri, H. Yu, B. Winsor, M. Vidal, M.B. Gerstein, G.D. Bader, R. Volkmer, G. Cesareni, D.G. Drubin, P.M. Kim, S.S. Sidhu, y C. Boone. 2009. Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS Biol.* 7:e1000218.
- Toret, C.P., L. Lee, M. Sekiya-Kawasaki, y D.G. Drubin. 2008. Multiple pathways regulate endocytic coat disassembly in *Saccharomyces cerevisiae* for optimal downstream trafficking. *Traffic.* 9:848-59.
- Vaduva, G., N.C. Martin, y A.K. Hopper. 1997. Actin-binding verprolin is a polarity development protein required for the morphogenesis and function of the yeast actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 139:1821-33.
- Van Driessche, B., L. Tafforeau, P. Hentges, A.M. Carr, y J. Vandenhoute. 2005. Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast.* 22:1061-8.
- Vardy, L., y T. Toda. 2000. The fission yeast γ -tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J.* 19:6098-111.
- Vavylonis, D., J.Q. Wu, S. Hao, B. O'Shaughnessy, y T.D. Pollard. 2008. Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science.* 319:97-100.
- Venkatram, S., J.L. Jennings, A. Link, y K.L. Gould. 2005. mto2p, a novel fission yeast protein required for cytoplasmic microtubule organization and anchoring of the cytokinetic actin ring. *Mol Biol Cell.* 16:3052-63.
- Venkatram, S., J.J. Tasto, A. Feoktistova, J.L. Jennings, A.J. Link, y K.L. Gould. 2004. Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast γ -tubulin complex function. *Mol Biol Cell.* 15:2287-301.
- Verde, F. 1998. On growth and form: control of cell morphogenesis in fission yeast. *Curr Opin Microbiol.* 1:712-8.
- Verde, F., D.J. Wiley, y P. Nurse. 1998. Fission yeast orb6, a ser/thr protein kinase related to mammalian rho kinase and myotonic dystrophy kinase, is required for maintenance of cell polarity and coordinates cell morphogenesis with the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7526-31.
- Vida, T.A., y S.D. Emr. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol.* 128:779-92.
- Wach, A. 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast.* 12:259-65.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann, y P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 10:1793-808.
- Wachtler, V., y M.K. Balasubramanian. 2006. Yeast lipid rafts?--an emerging view. *Trends Cell Biol.* 16:1-4.
- Wachtler, V., S. Rajagopalan, y M.K. Balasubramanian. 2003. Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 116:867-74.
- Wang, H., X. Tang, J. Liu, S. Trautmann, D. Balasundaram, D. McCollum, y M.K. Balasubramanian. 2002. The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 13:515-29.
- Wang, H., y D. Vavylonis. 2008. Model of for3p-mediated actin cable assembly in fission yeast. *PLoS One.* 3:e4078.
- Weiss, E.L., C. Kurischko, C. Zhang, K. Shokat, D.G. Drubin, y F.C. Luca. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J Cell Biol.* 158:885-900.
- Welch, M.D., y R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:247-88.
- Weltmeier, F., A. Ehlert, C.S. Mayer, K. Dietrich, X. Wang, K. Schutze, R. Alonso, K. Harter, J. Vicente-Carbajosa, y W. Droge-Laser. 2006. Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J.* 25:3133-43.
- West, R.R., E.V. Vaisberg, R. Ding, P. Nurse, y J.R. McIntosh. 1998. *cut11(+)*: A gene required for cell cycle-dependent spindle pole body anchoring in the nuclear envelope and bipolar spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 9:2839-55.
- Win, T.Z., Y. Gachet, D.P. Mulvihill, K.M. May, y J.S. Hyams. 2001. Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, myo51 is a

- component of the cytokinetic actin ring. *J Cell Sci.* 114:69-79.
- Winter, D., T. Lechler, y R. Li. 1999a. Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol.* 9:501-4.
- Winter, D., A.V. Podtelejnikov, M. Mann, y R. Li. 1997. The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol.* 7:519-29.
- Winter, D.C., E.Y. Choe, y R. Li. 1999b. Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the *in vivo* and structural roles of individual subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7288-93.
- Wixon, J. 2002. Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, The Fission Yeast. *Comp Funct Genomics.* 3:194-204.
- Wixon, J., y V. Wood. 2006. Tools and resources for *S. pombe*: a report from the 2006 European Fission Yeast Meeting. *Yeast.* 23:901-3.
- Wong, K.C., M. D'Souza V, N.I. Naqvi, F. Motegi, I. Mabuuchi, y M.K. Balasubramanian. 2002. Importance of a myosin II-containing progenitor for actomyosin ring assembly in fission yeast. *Curr Biol.* 12:724-9.
- Wood, V., R. Gwilliam, M.A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles, S. Baker, D. Basham, S. Bowman, K. Brooks, D. Brown, S. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, M. Collins, R. Connor, A. Cronin, P. Davis, T. Feltwell, A. Fraser, S. Gentles, A. Goble, N. Hamlin, D. Harris, J. Hidalgo, G. Hodgson, S. Holroyd, T. Hornsby, S. Howarth, E.J. Huckle, S. Hunt, K. Jagels, K. James, L. Jones, M. Jones, S. Leather, S. McDonald, J. McLean, P. Mooney, S. Moule, K. Mungall, L. Murphy, D. Niblett, C. Odell, K. Oliver, S. O'Neil, D. Pearson, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, S. Rutter, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, J. Skelton, M. Simmonds, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, R.G. Taylor, A. Tivey, S. Walsh, T. Warren, S. Whitehead, J. Woodward, G. Volckaert, R. Aert, J. Robben, B. Grymonprez, I. Weltjens, E. Vanstreels, M. Rieger, M. Schafer, S. Muller-Auer, C. Gabel, M. Fuchs, A. Dusterhoff, C. Fritzc, E. Holzer, D. Moestl, H. Hilbert, K. Borzym, I. Langer, A. Beck, H. Lehrach, R. Reinhardt, T.M. Pohl, P. Eger, W. Zimmermann, H. Wedler, R. Wambutt, B. Purnelle, A. Goffeau, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 415:871-80.
- Wu, J.Q., J.R. Kuhn, D.R. Kovar, y T.D. Pollard. 2003. Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell.* 5:723-34.
- Wu, J.Q., y T.D. Pollard. 2005. Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science.* 310:310-4.
- Wu, J.Q., V. Sirotkin, D.R. Kovar, M. Lord, C.C. Beltzner, J.R. Kuhn, y T.D. Pollard. 2006. Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol.* 174:391-402.
- Wu, Y., F.L. Yeh, F. Mao, y E.R. Chapman. 2009. Biophysical characterization of styryl dye-membrane interactions. *Biophys J.* 97:101-9.
- Xu, Y., J.B. Moseley, I. Sagot, F. Poy, D. Pellman, B.L. Goode, y M.J. Eck. 2004. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell.* 116:711-23.
- Yamamoto, A., C. Tsutsumi, H. Kojima, K. Oiwa, y Y. Hiraoka. 2001. Dynamic behavior of microtubules during dynein-dependent nuclear migrations of meiotic prophase in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 12:3933-46.
- Yamamoto, T., J. Mochida, J. Kadota, M. Takeda, E. Bi, y K. Tanaka. 2010. Initial Polarized Bud Growth by Endocytic Recycling in the Absence of Actin Cable-dependent Vesicle Transport in Yeast. *Mol Biol Cell.* 21:1237-52.
- Yanagida, M. 2002. The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* 3:comment2003.
- Yonetani, A., R.J. Lustig, J.B. Moseley, T. Takeda, B.L. Goode, y F. Chang. 2008. Regulation and targeting of the fission yeast formin cdc12p in cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 19:2208-19.