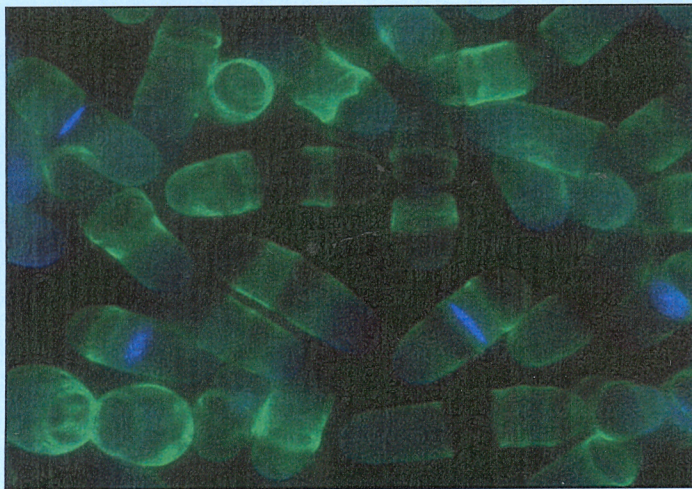


VNiVERSiDAD
DE
SALAMANCA



Caracterización de las β -1,3-glucanosil-transferasas de la familia GH72 implicadas en la remodelación de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*



María de Medina Redondo
Salamanca, 2008



VNiVERSiDAD DE SALAMANCA
iNSTiTVT0 DE MiCR0BiOLOGíA~Bi0QVíMiCA

Caracterización de las β -1,3-glucanosil-transferasas de la familia GH72 implicadas en la remodelación de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*

**María de Medina Redondo
2008**



imb



CARLOS RODRÍGUEZ VÁZQUEZ DE ALDANA, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CSIC

FRANCISCO J. DEL REY IGLESIAS, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la licenciada **Dña. María de Medina Redondo** ha realizado bajo su dirección y en el Centro Mixto IMB, Instituto de Microbiología-Bioquímica, CSIC/Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, el trabajo titulado “**CARACTERIZACIÓN DE LAS β -1,3-GLUCANOSIL-TRANSFERASAS DE LA FAMILIA GH72 IMPLICADAS EN LA REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR DE *Schizosaccharomyces pombe***” para optar al grado de **Doctor en Farmacia**.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, y como directores del trabajo, expiden el siguiente certificado en Salamanca, a 11 de junio de 2008.

Dr. Carlos Rodríguez Vázquez de Aldana

Prof. Dr. Francisco J. del Rey Iglesias



D. ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA: Que la memoria titulada “**CARACTERIZACIÓN DE LAS β -1,3-GLUCANOSIL-TRANSFERASAS DE LA FAMILIA GH72 IMPLICADAS EN LA REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR DE *Schizosaccharomyces pombe***” presentada por la licenciada **Dña. María de Medina Redondo** para optar al grado de **Doctor en Farmacia**, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. Carlos Rodríguez Vázquez de Aldana y Francisco J. del Rey Iglesias en el Centro Mixto IMB, Instituto de Microbiología-Bioquímica, CSIC/Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el siguiente certificado en Salamanca, a 11 de junio de 2008.

Fdo: Prof. Dr. Ángel Domínguez Olavarri

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Francisco J. del Rey Iglesias y Carlos Rodríguez-Vázquez de Aldana, por haberme permitido formar parte de su grupo, enseñarme y guiarme a lo largo este proyecto. Por no rechistar durante la corrección de esta Memoria, a pesar de las prisas y los plazos.

Al CSIC, al MEC y a la USAL, por las becas de “Introducción a la Investigación para Alumnos de Penúltimo y Último Curso” del primero, la beca de “Formación del Profesorado Universitario” del segundo, y la plaza de Ayudante de la tercera, que me han permitido asomarme a este mundo para descubrir que, a pesar de todo, es apasionante.

A los Dres. P. Nurse y J. Hayles, quienes me acogieron en su *Cell Cycle Laboratory* de Londres y me enseñaron a ver “más adentro” de la pared celular. Un agradecimiento muy especial al Dr. Rafael Carazo-Salas, quien me guió durante mi estancia londinense tanto dentro como fuera del laboratorio.

A todos los miembros de la *Unité des Aspergillus* del Instituto Pasteur de París. JP, gracias por soportar con estoicidad la invasión salmantina. Fonfon (“mon petit chaperon rouge”), Jacqueline (la copine), Amandine, Isabelle, JPDBP, Anne, Christine y los chicos de la “cuisine”, gracias por tan buenos momentos y por prestarme el Dionex.

De vuelta a Salamanca, a cada uno los miembros del IMB que nos facilitan el trabajo del día a día: Alegría, Paco Soriano, Miguel, Manolo, Paco Alonso, Carlos Belinchón, las chicas de cocina, Carmen Castro (gracias por lo de Canarias). A Elvira, por su dulzura y las células competentes. Al Director del IMB, Dr. Ángel Durán, por intentar que todo funcionara lo mejor posible. No me puedo olvidar de Laura Montejo (USAL) por todos la ayuda con los trámites de esta tesis.

A la Dra. Pilar Pérez, por su ayuda con los fraccionamientos de pared celular.

A los compañeros del Departamento con los que me crucé en el pasillo y compartí las horas de trabajo y alguna que otra cena.

Una Matrícula de Honor (y un abrazo muy cariñoso) es la que se merecen los compañeros de laboratorio (las Reinas). Encarna (la Reina Madre, por enseñarme todo y tu “hoy no me puedo levantar”), Eva y Yoli (la vuelta a casa, los Pitufos, Regumiel, el cine, los experimentos alternativos, la ciencia subversiva), Jacob y su “autoconjugación”, Ana (el apoyo desde Valencia), JaviFRI (falda lápiz), Marisa (*Northern school*), Raquel, M^a Luz y Belén (no hay *mini* ni transformación que se os resista), Javi-Pelirrojo, Leti y Alberto (nuestros tres adorables vecinos adoptados). Ya fuera del 237, otros compañeros excepcionales han sido Sergio, Pedro Miguel, Toñi, Mario, Cris, Talía, Inma, Laura “DMZ” y José Ángel. A los exvecinos del 1º y, sobre todo, a Teresa. Muchísimas gracias por vuestro apoyo, risas y consejos.

¿Qué habría sido de este trabajo sin el enorme apoyo de mis amigos? María LDL y Carmen (¿no es aquí donde vivimos?), Silvia y Sebas (con esa camisa, me estás volviendo loco) y Laura dD (ojo con las inspecciones). Y desde el Sur, Mer y Gema (la chuleta de matemáticas con “letras” es ya todo un mito).

Por último, pero más importante, a mi familia. A mis padres, por animarme a estudiar y por apoyarme “siempre, siempre”, a Luisete (*tesis*, se llama *tesis*), Marisina, por ayudarme con la redacción, Carlos (¿cuándo publicas? ¿y la estadística?) y la abuelita. Muy especialmente a Javi, porque es quien mejor comprende “esta movida”. Sabeos artífices de este (pequeño) éxito.

ABREVIATURAS

- aa:** Aminoácido
- ADN:** Ácido desoxiribonucleico
- AMPc:** Adenosin mono-fosfato cíclico
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- ARNr:** Ácido ribonucleico mensajero ribosomal
- ASL-CWP:** Proteína de pared celular unida por un enlace sensible a álcali (*Alkali Sensitive Linkage-Cell Wall Protein*)
- ATP:** Adenosin tri-fosfato
- βGS:** β-glucán-sintasa
- BSA:** Seroalbúmina bovina (*Bovine Seric Albumin*)
- CAR:** Anillo contractil de actomiosina (*Contractil Actin Ring*)
- CBM:** Dominio de unión a carbohidratos (*Carbohydrate Binding Domain*)
- Ci:** Curio
- CDK:** Kinasas dependientes de ciclinas (*Cyclin-Dependent Kinase*)
- Cys-rich:** Región rica en cisteínas
- CWP:** Proteína de pared celular (*Cell Wall Protein*)
- DAPI:** 4',6-DiAmidino-2-fenilindol (*4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole*)
- DIC:** Constraste interferencial
- DMSO:** Dimetil-sulfóxido
- DO:** Densidad óptica
- Dol-P-Man:** Dolicol-fosfato-manosa
- Dol-PP:** Dolicol pirofosfato
- EDTA:** Ácido etilén-diamino-tetra-acético
- FE:** Fase estacionaria
- Fig.:** Figura
- FM:** Fase móvil
- GAP:** Proteína activadora de actividad GTPásica (*GTPase Activating Protein*)
- GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
- G_{nr}:** β-1,3-glucanos reducidos de n monómeros
- GH:** Glicosil-hidrolasas
- GluTD:** Dominio de transferencia de glucanosilos (*Glucanosyl Transfer Domain*)
- GPI:** Glicosil-fosfatidil-inositol
- GPI-CWP:** Proteína de pared celular con un grupo GPI
- GPI-PMP:** Proteína de membrana plasmática con un grupo GPI
- GDP:** Guanosin di-fosfato
- GSH:** Glutati6n reducido
- GS-SG:** Glutati6n oxidado
- GTP:** Guanosin tri-fosfato
- h:** Horas
- HPAEC:** Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (*High Performance Anionic Exchange Chromatography*)
- IUBMB:** Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)
- Kan^R:** Resistente a Kanamicina
- Kan^S:** Sensible a Kanamicina
- Kb:** Kilobase
- kDa:** KiloDalton
- MEN:** Cascada de salida de mitosis (*Mitotic Exit Network*)
- mg:** miligramo
- min:** minutos
- mL:** mililitro
- MTOCs:** Centro organizador de microtúbulos (*Microtubule Organizing Centres*)
- NETO:** Inicio de crecimiento por el polo nuevo (*New End Take Off*)
- O/N:** Toda la noche (*Over Night*)
- OETO:** Inicio de crecimiento por el polo viejo (*Old End Take Off*)
- PAA:** Distribución de microtúbulos tras anafase (*Post-Anaphase Array*)
- PAHBA:** Ácido p-amino-hidroxi-benzoico
- pb:** Pares de bases
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- PEG:** Polietilén-glicol
- pl:** Punto isoeléctrico
- PKA:** Proteína quinasa dependiente de AMPc
- PIR-CWP:** Proteína de pared celular con repeticiones internas (*Protein with Internal Repeats-Cell Wall Protein*)
- Pm:** Peso molecular
- PMSF:** Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
- PMT:** Proteína manosil-trasferasa.
- PP:** Pirofosfato
- RE:** Retículo endoplásmico

SDS: Dodecil-sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

Ser-rich: Región rica en serinas

SIN: Cascada de inicio de la septación (*Septation Initiation Network*)

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors*

SORB: Sorbitol

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

TEM: Microscopio electrónico de transmisión (*Transmission Electron Microscope*)

UFC: Unidades formadoras de colonias

YFP: Proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*)

μL: microlitro

μg: microgramo

UFC: Unidades formadoras de colonias

UTR: Región no traducida (*Untranslated Region*)

wt: silvestre (*Wild Type*)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	V
ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE	IX
RESUMEN	XVII
(I)- INTRODUCCIÓN	1
(I)- 1. La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
(I)- 1.1 Breve reseña histórica y filogenética	1
(I)- 1.2. <i>S. pombe</i> como organismo modelo	2
(I)- 2. Ciclo biológico de <i>S. pombe</i>	3
(I)- 2.1. El ciclo vegetativo o ciclo mitótico	3
(I)- 2.2. Ciclo sexual	4
(I)- 3. Morfogénesis durante el crecimiento vegetativo	5
(I)- 3.1. Citoesqueleto de actina	5
(I)- 3.2. Citoesqueleto de microtúbulos	6
(I)- 3.3. Otros factores relacionados con morfogénesis	7
(I)- 4. Citoquinesis y separación celular en <i>S. pombe</i>	9
(I)- 4.1. Elección del sitio de división y ensamblaje del anillo de actomiosina	9
(I)- 4.2. Contracción del anillo de actomiosina y síntesis del septo de división	10
(I)- 4.3. Degradación del septo primario y separación celular	12
(I)- 5. Diferenciación sexual en <i>S. pombe</i>	12
(I)- 5.1. Regulación nutricional del ciclo sexual	13
(I)- 5.2. Regulación del ciclo sexual por la acción de feromonas	14
(I)- 5.3. Cambios en el citoesqueleto celular inducidos por feromonas	15
(I)- 5.4. Meiosis	16
(I)- 5.5. Relación entre meiosis II y esporogénesis	17
(I)- 5.6. Los componentes del SIN son necesarios para la formación de las esporas	19
(I)- 5.7. Construcción de la pared de la espóra	19
(I)- 6. La pared celular de <i>S. pombe</i>	20
(I)- 6.1. Composición de la pared celular	21
(I)- 6.1.1. β -glucano	22
(I)- 6.1.2. α -1,3-glucano	23
(I)- 6.1.3. α -galactomanano y manoproteínas	23
(I)- 6.1.4. Quitina	25

(I)- 6.2. Arquitectura de la pared celular de <i>S. pombe</i>	25
(I)- 6.3. Biogénesis de la pared celular	27
(I)- 6.3.1. Biosíntesis del β -1,3-glucano	28
(I)- 6.3.2. Biosíntesis del β -1,6-glucano	29
(I)- 6.3.3. Biosíntesis de α -glucano	30
(I)- 6.3.4. Biosíntesis de α -galactomanoproteínas	31
(I)- 6.3.5. Biosíntesis de quitina	32
(I)- 6.4. Remodelación de la pared celular	32
(I)- 6.4.1. Mecanismo de acción de las O-glicosidasas	33
(I)- 6.4.2. Clasificación de O-glicosidasas	34
(I)- 6.4.3. Estructura modular de las O-glicosil-hidrolasas	34
(I)- 6.5. Proteínas GPI	35
(I)- 6.6. Glicosil-hidrolasas de la familia 72 (GH72)	36
OBJETIVOS	39
(III)- RESULTADOS: Identificación de genes homólogos a ScGAS1 en <i>S. pombe</i>	41
(III)- 1. Las proteínas <i>gas1p</i>, <i>gas2p</i>, <i>gas4p</i> y <i>gas5p</i> pertenecen a la familia 72 de las glicosil-hidrolasas (GH72)	41
(III)- 1.1. Estructura modular de las proteínas de <i>S. pombe</i> pertenecientes a la familia GH72	41
(III)- 1.2. La proteína <i>gas2p</i> es diferente de otros miembros de la familia GH72	43
(III)- 2. Expresión de los genes <i>gas</i>⁺ en distintos momentos del ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	46
(III)- 2.1. Los genes <i>gas1</i> ⁺ , <i>gas2</i> ⁺ y <i>gas5</i> ⁺ se expresan periódicamente durante el ciclo mitótico	46
(III)- 2.2. La expresión de <i>gas4</i> ⁺ alcanza su máximo durante el proceso de esporulación	47
(IV)- RESULTADOS: Caracterización funcional de los genes <i>gas</i>⁺ durante crecimiento vegetativo	51
(IV)- 1. La proteína <i>gas1p</i> es indispensable durante el crecimiento vegetativo, no así <i>gas2p</i>, <i>gas4p</i> y <i>gas5p</i>	51
(IV)- 1.1. Estrategia 1: Deleción de la región codificante de cada gen	51
(IV)- 1.2. Estrategia 2: Represión de <i>gas1</i> ⁺ mediante un promotor regulable	55
(IV)- 1.3. Estrategia 3: Generación de mutantes termosensibles de <i>gas1</i> ⁺	56
(IV)- 1.4. Estrategia 4: Interrupción de la región codificante de <i>gas1</i> ⁺	56
(IV)- 2. Crecimiento vegetativo de los mutantes de deleción generados	59
(IV)- 3. Morfología de los mutantes de deleción durante el ciclo mitótico	60
(IV)- 4. La proteína <i>gas1p</i> es necesaria para una correcta morfogénesis	65
(IV)- 5. Composición de la pared celular de los distintos mutantes <i>gas</i>Δ durante el crecimiento vegetativo	67
(IV)- 6. Las proteínas GH72 se localizan en la periferia celular durante el crecimiento vegetativo	68

(V)- RESULTADOS: Caracterización funcional de los genes <i>gas</i>⁺ durante esporulación	71
<i>(V)- 1. La expresión de <i>gas4</i>⁺ alcanza su máximo durante el proceso de esporulación.</i>	<i>71</i>
<i>(V)- 2. La proteína <i>gas4p</i> está implicada en la maduración de las ascosporas de <i>S. pombe</i></i>	<i>72</i>
<i>(V)- 3. Las esporas <i>gas4Δ</i> son inviables</i>	<i>74</i>
<i>(V)- 4. La proteína <i>gas4p</i> es indispensable para la correcta formación de la pared de la espora</i>	<i>75</i>
<i>(V)- 5. La composición cuantitativa de la pared de las esporas <i>gas4Δ</i> es similar a la de las ascosporas silvestres</i>	<i>75</i>
<i>(V)- 6. Los probables residuos catalíticos de <i>gas4p</i> son importantes para su función biológica</i>	<i>76</i>
<i>(V)- 7. La proteína <i>gas4p</i> se localiza en la periferia de las ascosporas.</i>	<i>77</i>
<i>(V)- 8. El motivo de anclaje GPI es importante para la localización de <i>gas4p</i> y su funcionalidad in vivo</i>	<i>78</i>
<i>(V)- 9. La proteína <i>gas4p</i> complementa el defecto de esporulación del mutante <i>gas2 gas4</i> de <i>S. cerevisiae</i></i>	<i>80</i>
(VI)- RESULTADOS: Caracterización de la actividad catalítica de las proteínas GH72 de <i>S. pombe</i>	85
<i>(VI)- 1. Elección del sistema de expresión proteica</i>	<i>85</i>
(VI)- 1.1. <i>P. pastoris</i> es una levadura metilotrófica	86
(VI)- 1.2. Dos proteínas con actividad alcohol oxidasa	86
(VI)- 1.3. Expresión del gen <i>AOX1</i>	86
(VI)- 1.4. Expresión de proteínas intracelulares y secretadas	86
(VI)- 1.5. Modificaciones post-traduccionales	87
<i>(VI)- 2. Clonación de los genes <i>gas1</i>⁺, <i>gas2</i>⁺, <i>gas4</i>⁺ y <i>gas5</i>⁺ en el vector <i>pPICZα</i></i>	<i>87</i>
<i>(VI)- 3. Selección de los clones de <i>P. pastoris</i> productores de las proteínas recombinantes <i>gasp</i> de <i>S. pombe</i></i>	<i>90</i>
<i>(VI)- 4. Purificación de <i>r-gas1p</i>, <i>r-gas4p</i> y <i>r-gas5p</i></i>	<i>91</i>
<i>(VI)- 5. Obtención de un clon productor de <i>r-gas2p</i></i>	<i>92</i>
(VI)- 5.1. Diseño de una nueva construcción para <i>r-gas2p</i>	93
<i>(VI)- 6. Purificación de la proteína <i>r-gas2p</i>'</i>	<i>94</i>
(VI)- 6.1. Renaturalización de <i>r-gas2p</i> '	95
(VI)- 6.2. Comprobación de la actividad enzimática de <i>r-gas2p</i> '	96
<i>(VI)- 7. Diseño de dos nuevas formas recombinantes de <i>gas2p</i></i>	<i>96</i>
(VI)- 7.1. Construcciones <i>r-6xHis-gas2p</i> y <i>r-gas2p-ES-6xHisp</i>	97
(VI)- 7.2. Selección de clones productores de <i>r-6xHis-gas2p</i> y <i>r-gas2-ES-6xHisp</i>	98
(VI)- 7.3. Purificación de <i>r-6xHis-gas2p</i>	98
<i>(VI)- 8. Las proteínas <i>gas1p</i>, <i>gas2p</i>, <i>gas4p</i> y <i>gas5p</i> son β-1,3-glucanosil-transferasas.</i>	<i>99</i>

(VII)- DISCUSIÓN	105
(VII)- 1. Los genes <i>gas1</i>⁺, <i>gas2</i>⁺, <i>gas4</i>⁺ y <i>gas5</i>⁺ codifican proteínas homólogas a <i>ScGas1p</i> en <i>S. pombe</i>	106
(VII)- 2. La proteína <i>gas2p</i> es un miembro inusual de la familia <i>GH72</i>	107
(VII)- 3. Las proteínas <i>gasp</i> son β-1,3-glucanosil-transferasas	110
(VII)- 4. Las proteínas <i>gasp</i> se localizan en las zonas de crecimiento	112
(VII)- 5. El motivo <i>GPI</i> es necesario para la función biológica.	114
(VII)- 6. Las proteínas <i>GH72</i> participan en la síntesis y/o remodelación de la pared celular	115
(VII)- 7. Una estructura común, diferentes funciones in vivo	117
(VIII)- CONCLUSIONES	119
(IX)- MATERIALES Y MÉTODOS	121
(IX)- 1. Microorganismos utilizados.	121
(IX)- 2. Medios y condiciones de cultivo	123
(IX)- 2.1. Crecimiento de <i>S. pombe</i>	123
(IX)- 2.1.1. Crecimiento vegetativo de <i>S. pombe</i>	123
(IX)- 2.1.2. Sincronización de los cultivos celulares de <i>S. pombe</i> durante el crecimiento vegetativo	123
(IX)- 2.1.3. Conjugación y esporulación de <i>S. pombe</i>	124
(IX)- 2.1.4. Aislamiento de estirpes diploides	124
(IX)- 2.1.5. Sincronización del proceso de meiosis-esporulación de <i>S. pombe</i>	124
(IX)- 2.2. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	125
(IX)- 2.2.1. Inducción de la esporulación en <i>S. cerevisiae</i>	125
(IX)- 2.3. Crecimiento de <i>P. pastoris</i>	125
(IX)- 2.4. Crecimiento de <i>E. coli</i>	125
(IX)- 3. Procedimientos generales de clonación molecular	125
(IX)- 3.1. Vectores utilizados	125
(IX)- 3.1.1. Vectores de <i>E. coli</i>	126
(IX)- 3.1.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	126
(IX)- 3.1.3. Vectores de <i>S. cerevisiae</i>	126
(IX)- 3.1.4. Vectores de <i>P. pastoris</i>	126
(IX)- 3.2. Obtención de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	128
(IX)- 3.3. Manipulación del ADN	130
(IX)- 3.3.1. Plásmidos derivados de <i>gas1</i> ⁺	130
(IX)- 3.3.2. Plásmidos derivados de <i>gas2</i> ⁺	132
(IX)- 3.3.3. Plásmidos derivados de <i>gas4</i> ⁺	132
(IX)- 3.3.4. Plásmidos derivados de <i>gas5</i> ⁺	133
(IX)- 3.4. Transformación de bacterias y levaduras	134
(IX)- 3.4.1. Transformación de <i>E. coli</i>	134
(IX)- 3.4.2. Transformación de levaduras	134
(IX)- 4. Métodos genéticos	134
(IX)- 4.1. Reemplazamientos génicos	134
(IX)- 4.2. Obtención de ARN total de <i>S. pombe</i>	134

(IX)- 5. Hibridación de ácidos nucleicos134
(IX)- 5.1. Preparación de sondas marcadas radiactivamente	135
(IX)- 5.2. Detección de secuencias específicas de ADN (<i>Southern-blot</i>)	135
(IX)- 5.3. Detección de ARN mensajero (<i>Northern-blot</i>)	135
(IX)- 6. Purificación de proteínas135
(IX)- 7. Detección y análisis de proteínas136
(IX)- 7.1. Obtención de los extractos proteicos y valoración de la concentración de proteínas	136
(IX)- 7.2. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas (<i>Western-blot</i>)	136
(IX)- 7.3. Obtención de anticuerpos policlonales anti-gas4p	136
(IX)- 8. Obtención y modificaciones de polisacáridos137
(IX)- 9. Ensayos enzimáticos137
(IX)- 9.1. Actividad β -1,3-glucanosil-transferasa	137
(IX)- 9.2. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular	137
(IX)- 9.2.1. Tratamiento con Zimoliasa	138
(IX)- 9.2.2. Tratamiento con Quantazime®	138
(IX)- 9.2.3. Filtrado de las muestras	138
(IX)- 9.3. Ensayos de sensibilidad a Zimoliasa	138
(IX)- 10. Técnicas microscópicas138
(IX)- 10.1. Microscopía óptica. Tinción con azul de metileno	138
(IX)- 10.2. Microscopía de fluorescencia	139
(IX)- 10.3. Preparación de muestras paramicroscopía a lo largo del tiempo (time-lapse)	139
(IX)- 10.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	139
(IX)- 11. Recursos bioinformáticos140
(X)- ANEXO A: Medios de cultivo _____	141
(X)- 1. Medios de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>141
(X)- 1.1. Medios empleados durante el crecimiento vegetativo	141
(X)- 1.2. Medios empleados para inducir la esporulación	141
(X)- 2. Medios de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>142
(X)- 2.1. Medios empleados durante el crecimiento vegetativo	142
(X)- 2.2. Medios empleados para inducir la esporulación	142
(X)- 3. Medios de <i>Pichia pastoris</i>142
(X)- 4. Medios de <i>Escherichia coli</i>142
(XI)- ANEXO B: HPAEC para el análisis de actividad β-glucanosil-transferasa _____	143
(XI)-1. Introducción a las técnicas cromatográficas143
(XI)- 2. Análisis de los cromatogramas obtenidos144

English version

ABSTRACT _____	147
(XII)- OBJECTIVES _____	149
(XIII)- RESULTS: Identification of genes homologues to ScGAS1 in <i>S. pombe</i> _____	151
<i>(XIII)- 1. gas1p, gas2p, gas4p and gas5p belong to the glycoside-hydrolase family 72 (GH72)</i>	151
(XIII)- 1.1. Modular architecture of the <i>S. pombe</i> proteins belonging to the GH72 family	151
(XIII)- 1.2. gas2p differs from other GH72 family members	153
<i>(XIII)- 2. Expression of gas⁺ genes during the S. pombe life cycle</i>	155
(XIII)- 2.1. gas1 ⁺ , gas2 ⁺ y gas5 ⁺ are periodically expressed during mitotic growth	155
<i>(XIII)- 2.2. gas4⁺ expresión peaks during the sporulation process</i>	156
(XIV)- RESULTS: Functional characterization of the vegetative gas⁺ genes _	159
<i>(XIV)- 1. gas1p is indispensable during vegetative growth, but the other proteins are not</i> .159	159
(XIV)- 1.1. Strategy 1: Deletion of the coding region	159
(XIV)- 1.1. Strategy 2: gas1 ⁺ silencing using a regulatable promoter	162
(XIV)- 1.3. Strategy 3. gas1 ⁺ thermosensitive mutants	162
(XIV)- 1.4. Strategy 4: gas1 ⁺ interruption	163
<i>(XIV)- 2. Mitotic growth of GH72 null mutants</i>	165
<i>(XIV)- 3. Morphology of GH72 mutants during mitotic growth.</i>	166
<i>(XIV)- 4. gas1p is required for proper morphogenesis</i>	169
<i>(XIV)- 5. Cell wall composition of the gasΔ mutant strains during vegetative growth.</i>	172
<i>(XIV)- 6. GH72 proteins localize to the cell periphery during vegetative growth.</i>	172
(XV)- RESULTS: Characterization of S. pombe GH72 genes during sporulation _____	175
<i>(XV)- 1. gas4p synthesis peaks during the sporulation process</i>	175
<i>(XV)- 2. gas4p is involved in ascospore maturation in S. pombe</i>	176
<i>(XV)- 3. gas4Δ spores are unviable</i>	177

(XV)- 4. <i>gas4p</i> is necessary for correct formation of the spore wall	177
(XV)- 5. Spore wall composition is similar in wild-type and <i>gas4Δ</i> ascospores.	178
(XV)- 6. Putative catalytic residues of <i>gas4p</i> are important for its biological function . . .	178
(XV)- 7. <i>gas4p</i> localizes to the ascospore periphery	179
(XV)- 8. The GPI anchor is important for <i>gas4p</i> localization and function in vivo	180
(XV)- 9. The <i>gas4⁺</i> gene complements the sporulation defect of <i>S. cerevisiae gas2Δ gas4Δ</i>	181
(XVI)- RESULTS: Characterization of the catalytic activity of <i>S. pombe</i> GH72 proteins	185
(XVI)- 1. Election of the protein expression system	185
(XVI)- 1.1. <i>P. pastoris</i> as a methylotrophic yeast	185
(XVI)- 1.2. Two alcohol oxidase proteins	186
(XVI)- 1.3. AOX1 expression	186
(XVI)- 1.4. Intracellular and secretory protein expression	186
(XVI)- 1.5. Post-translational modifications	186
(XVI)- 2. Selection of vector, cloning and transformation	187
(XVI)- 3. Selection of <i>P. pastoris</i> clones expressing the fission yeast GH72 proteins . . .	188
(XVI)- 4. Purification of <i>r-gas1p</i> , <i>r-gas4p</i> and <i>r-gas5p</i>	190
(XVI)- 5. Construction of a <i>P. pastoris</i> clone producing <i>r-gas2p</i>	190
(XVI)- 5.1. <i>r-gas2p'</i> , a new construct for <i>gas2p</i>	191
(XVI)- 6. Purification of <i>r-gas2p'</i>	191
(XVI)- 7. Two new recombinant forms of <i>gas2p</i>	192
(XVI)- 7.1. <i>r-6xHis-gas2p</i> and <i>r-gas2p-ES-6xHisp</i> constructs	192
(XVI)- 7.2. Selection of clones expressing <i>r-6xHis-gas2p</i> and <i>r-gas2-ES-6xHisp</i>	193
(XVI)- 7.3. <i>r-6xHis-gas2p</i> purification	193
(XVI)- 8. <i>S. pombe gas</i> proteins are β -1,3-glucanosyl-transferases.	194
DISCUSSION	199
(XIV)- 1. <i>gas1⁺</i> , <i>gas2⁺</i> , <i>gas4⁺</i> and <i>gas5⁺</i> code for proteins homologues to <i>ScGas1p</i> in <i>S. pombe</i>	199
(XIV)- 2. <i>gas2p</i> is an unusual member of the GH72 family	200
(XIV)- 3. <i>gas</i> proteins are β -1,3-glucanosyl-transferases	203
(XIV)- 4. <i>gas</i> proteins localize to active growth sites.	204
(XIV)- 5. The GPI moiety is required for the biological function.	206
(XIV)- 6. GH72 proteins participate in synthesis or remodelling of the cell wall	207
(XIV)- 7. From a common structure to different functions in vivo.	209

(XVIII)- CONCLUSIONS _____	211
(XIX)- APÉNDICE: The β -1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> _____	213
(XX)- BIBLIOGRAFÍA _____	231

RESUMEN

RESUMEN

La formación de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe* requiere la actividad coordinada de enzimas involucradas en la biosíntesis y modificación de sus componentes, entre los que destacan por su abundancia los glucanos. El complejo enzimático β -glucán-sintasa sintetiza β -1,3-glucanos lineales, que permanecen desorganizados y solubles en álcali hasta que se establecen enlaces covalentes entre los β -1,3-glucanos y otros componentes de la pared celular. Las transferasas de la pared celular cuyos sustratos son los β -1,3-glucanos podrían estar desempeñando importantes funciones en el ensamblaje y reordenamiento de esta envoltura, ya que el β -1,3-glucano es el principal componente de las paredes celulares vegetativas y uno de los polímeros mayoritarios de las paredes de las ascosporas. Diversas proteínas pertenecientes a la familia 72 de las glicosil-hidrolasas (GH72) con actividad β -1,3-glucanosil-transferasa durante el crecimiento vegetativo y esporogénesis han sido caracterizadas en otros organismos (Gas1p, Gas2p y Gas4p de *Saccharomyces cerevisiae*, o Gel1p de *Aspergillus fumigatus*). La secuenciación del genoma de *S. pombe* ha permitido identificar cuatro genes (*gas1⁺*, *gas2⁺*, *gas4⁺* y *gas5⁺*) que codifican cuatro proteínas pertenecientes a la familia GH72. En esta Memoria se recoge el trabajo experimental llevado a cabo para la caracterización de la función de las proteínas gas1p, gas2p, gas4p y gas5p en las distintas etapas del ciclo de vida de esta levadura y de su actividad catalítica.

Desde el punto de vista funcional, gas1p es esencial para la viabilidad celular durante el crecimiento vegetativo, ya que los mutantes carentes de este gen sólo son capaces de crecer en medios estabilizados osmóticamente. Por su parte, gas4p desempeña un papel básico en la construcción de la pared celular de las esporas, siendo necesaria para la germinación de las mismas. Finalmente, las proteínas gas2p y gas5p deben ejercer un papel minoritario en la síntesis de la pared celular vegetativa, ya que mutantes carentes de estos genes (o el doble mutante) no presentan defectos morfológicos significativos.

Desde el punto de vista bioquímico, todas ellas poseen actividad β -1,3-glucanosil-transferasa, aunque se diferencian por la especificidad de longitud de sustrato, el punto de corte y los productos generados. Todo ello, junto con las diferencias de expresión a lo largo del ciclo biológico, sugiere que las distintas proteínas de la familia GH72 presentes en *S. pombe* podrían estar realizando funciones complementarias, no solapantes, en la levadura de fisión.

(I)- INTRODUCCIÓN

(I)- INTRODUCCIÓN

(I)- 1. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

(I)- 1.1 Breve reseña histórica y filogenética

Las levaduras se definen generalmente como hongos unicelulares (ocasionalmente, dimórficos) sin cuerpos fructíferos, que se propagan ya sea mediante gemación (como *Saccharomyces*) o por fisión (como *Schizosaccharomyces*). Esta definición abarca una amplia variedad de organismos (más de 500 especies), de origen muy heterogéneo desde el punto de vista filogenético.

La especie *Schizosaccharomyces pombe* fue la primera en ser descubierta y sobre la que se fundó el género *Schizosaccharomyces*. La mayoría de los sistemas taxonómicos aceptan como levaduras de fisión un total de tres especies: una especie capaz de generar cuatro esporas (*S. pombe*) y dos especies que forman ocho esporas (*S. japonicus* y *S. octosporus*) (Fig. 1). La levadura *S. pombe* fue descrita por Lindner en 1893, quien la encontró en la cerveza que se fabricaba en el Este de África (Fig. 2). De hecho, la palabra *pombe* en swahili significa cerveza. Así, el nombre taxonómico fue introducido por Lindner y expresa que el

Kingdom	<i>Mycota</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Archiascomycotina</i> (<i>Taphrinomycotina</i>)
Class	<i>Schizosaccharomycetes</i>
Order	<i>Schizosaccharomycetales</i>
Family	<i>Schizosaccharomycetaceae</i>
Genus	<i>Schizosaccharomyces</i>
Species	<i>S. pombe</i>
	<i>S. pombe</i> var. <i>pombe</i>
	<i>S. pombe</i> var. <i>malidevorans</i>
	<i>S. japonicus</i> (<i>Hasegawaea japonica</i>)
	<i>S. japonicus</i> var. <i>japonicus</i>
	<i>S. japonicus</i> var. <i>longobardus</i>
	<i>S. japonicus</i> var. <i>versatilis</i>
	<i>S. octosporus</i> (<i>Octosporomyces octosporus</i>)

Figura 1. Taxonomía de las levaduras de fisión (tomado de Sipiczki, 2000).

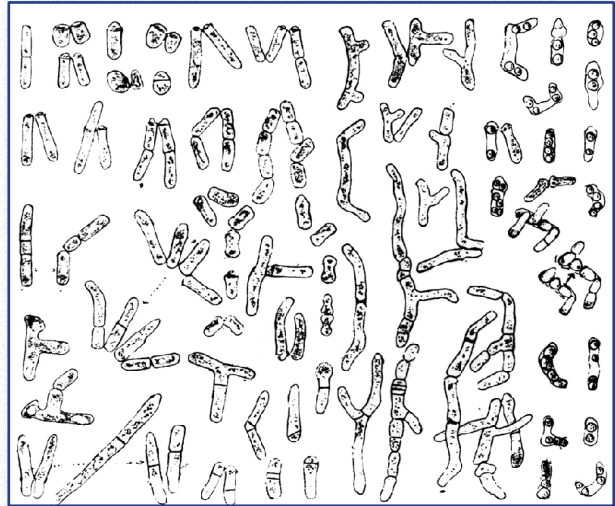


Figura 2. Dibujo descriptivo de la morfología de *S. pombe* realizado por Lindner. Tomado de <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/history/lindner2.html>.

organismo es una levadura (*-saccharomyces*) que se divide por fisión (*Schizo-*). Este género está clasificado por la mayoría de los sistemas taxonómicos modernos dentro de los *Ascomycota*, uno de los mayores *phylum* de hongos verdaderos.

La mayoría de las cepas y mutantes de esta levadura derivan de un aislado homotálico europeo de *S. pombe*, así como de derivados heterotálicos del mismo. Dicha cepa fue aislada en 1921 por A. Ostewalder a partir de un excedente de zumo de uva con elevadas cantidades de sulfuro, originario del sur de Francia. En un principio, este aislado fue denominado *S. liquefacies* y, posteriormente, renombrado como *S. pombe* var. *pombe*. En la década de los 40, Urs Leupold caracterizó esta cepa y adoptó este organismo para estudios genéticos. Este autor distinguió entre una cepa parental auto-fecundable ("homotálica") y sus derivados heterotálicos, y descubrió que el *locus* del tipo sexual era el responsable de estos dos tipos de levaduras (Leupold, 1950). Estas cepas fueron denominadas *h⁺* con células *P* (*Plus*), *h⁻* con células *M* (*Minus*) o *h⁹⁰* cuando las células podían ser de ambos tipos sexuales. De hecho, la denominación *h⁹⁰* hace referencia a que aproximadamente el 90% de las células de esta estirpe conjugan y producen esporas cuando son incubadas en ausencia de nitrógeno.

Años más tarde, en la década de los 50, Murdoch Mitchison descubrió el inmenso potencial de esta levadura para el estudio del crecimiento y

división celular. Ambas líneas de investigación se fusionaron en el análisis sistemático de los mutantes condicionales del ciclo de división celular (mutantes *cdc*), llevado a cabo por Paul Nurse (Egel, 2000). Esta exitosa integración le valió el Premio Nobel en el año 2001 (Nurse, 2002).

S. pombe es el sexto organismo modelo eucariota cuyo genoma ha sido secuenciado en su totalidad (Wood *et al.*, 2002), después del de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* (de la familia de las Brassicáceas) y *Homo sapiens* (Yanagida, 2002). Este eucariota posee un genoma de 13,8 Mb con tan sólo 4.824 genes, el menor número de los registrados para un eucariota y significativamente menor que los 5.570-5.651 genes predichos en la levadura de gemación (Wood *et al.*, 2002). Por tanto, un eucariota de vida libre necesita menos de 5.000 genes para sobrevivir, menos incluso que algunos procariontes. Una característica importante del genoma de la levadura de fisión es que el 43% de sus genes contiene intrones, muchos más de los encontrados en la levadura de gemación.

Mediante estudios de comparación de secuencia génica, se estima que las dos levaduras se separaron evolutivamente hace unos 330-420 mi-

llones de años (Fig. 3) (Sipiczki, 2000). Estudios más recientes sitúan esta separación hace aproximadamente 1.144 millones de años (Heckman *et al.*, 2001). En cualquier caso, la divergencia es tan grande que ciertos árboles filogenéticos agrupan a *S. pombe* con el grupo de los Metazoa, y no con las levaduras u otros hongos. Además, algunas proteínas de *S. pombe* han resultado ser más parecidas a sus homólogos en mamíferos que a sus equivalentes en *S. cerevisiae* (revisado por Sipiczki, 1995). De ahí que muchos biólogos moleculares creen que *S. pombe* podría estar más próximo a los eucariotas superiores que *S. cerevisiae*. Esto es especialmente cierto si nos referimos al modo de división celular, o al hecho de que la levadura de fisión, igual que los humanos, necesita mitocondrias para poder sobrevivir, orgánulos que son prescindibles en la levadura de gemación.

(I)- 1.2. *S. pombe* como organismo modelo

En los últimos años, la levadura de fisión se ha convertido en un organismo modelo muy popular y versátil en Ciencia Básica. La elección de un organismo como modelo de estudio obedece a varias razones: a) la facilidad para experimentar con un sistema particular (crecimiento rápido, simplicidad de las técnicas, etc.), b) la importancia

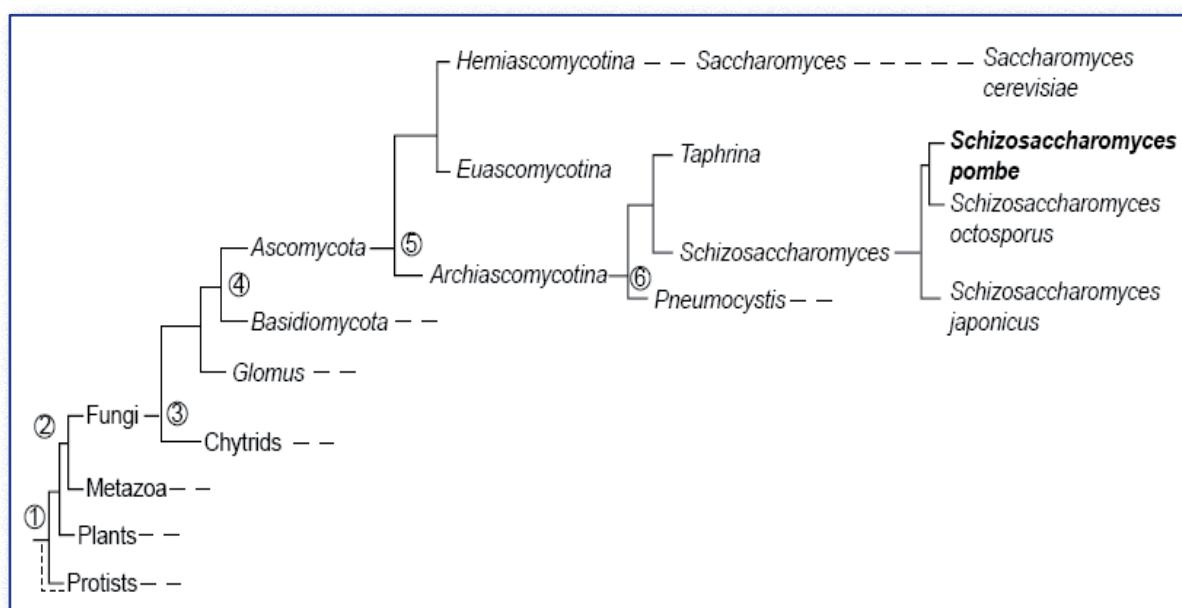


Figura 3. Árbol filogenético de las levaduras de fisión. Los tiempos de separación son (1) 1.200 millones de años (M.a.); (2) 1.100-1.000 M.a.; (3) 600-500 M.a.; (4) 400 M.a.; (5) 420-330 M.a.; y (6) 250 M.a. (tomado de Sipiczki, 2000).

de las cuestiones biológicas que se pueden estudiar en dicho sistema, y c) la capacidad de generar conclusiones válidas en otros organismos más complejos y menos abordables desde el punto de vista científico-experimental. Así, la facilidad con la que este eucariota puede ser manipulado genéticamente -sólo superada por *S. cerevisiae*- y sus especiales características, lo convierten en un organismo modelo perfecto para estudios acerca del ciclo celular, mitosis, meiosis, reparación y recombinación del ADN y morfogénesis. Por todas estas razones, es de esperar que el interés científico de *S. pombe*, importante ya en la actualidad, siga en aumento durante los próximos años, a juzgar por el enorme número de estudios que se están realizando hoy en día y que determinaron la elección de esta levadura como organismo modelo para realizar el trabajo descrito en esta Memoria.

(I)- 2. Ciclo biológico de *S. pombe*

La levadura de fisión representa, en dos palabras, la vida eucariótica: lo suficientemente simple como para multiplicarse como células no móviles de vida independiente y, a la vez, capaces de diferenciarse hacia estados quiescentes y/o formas de reproducción sexual. La repetición de determinadas pautas o procesos constituye lo que se conoce como ciclo. La secuencia lineal de eventos de diferenciación celular que, desde células en estado vegetativo, pasando por la conjugación, conduce hasta la meiosis y formación de esporas, es parte de un patrón cíclico en el cual las esporas pueden germinar cuando son devueltas a un medio con los nutrientes adecuados para comenzar el ciclo biológico de nuevo. Entre la germinación y la conjugación puede desarrollarse otro nuevo patrón cíclico, conocido como ciclo celular vegetativo, con rondas sucesivas de división mitótica. De hecho, *S. pombe* como organismo modelo se ha colocado en un primer plano debido principalmente a la conservación de los principales componentes de los mecanismos de control del ciclo celular. Así, el ciclo vital de un organismo alterna entre la propagación vegetativa del mismo y la reproducción sexual, mientras que el ciclo celular alterna entre los procesos de crecimiento y división.

(I)- 2.1. El ciclo vegetativo o ciclo mitótico

Las células haploides de *S. pombe* tienen morfología cilíndrica, constante a lo largo de todo el ciclo celular, con unos 3-4 μm de diámetro y una longitud que varía desde 7-8 μm al nacer hasta 12-15 μm inmediatamente antes de dividirse. La división ocurre por fisión transversal, sintetizándose un septo perpendicular al eje mayor de la célula durante la citoquinesis, que posteriormente es degradado para generar dos células hijas de idéntico tamaño. Las posiciones de crecimiento y división están marcadas por la distribución de la actina a lo largo del ciclo celular de esta levadura.

Al igual que la mayoría de células eucariotas, cuando se encuentran en condiciones adecuadas, las células de *S. pombe* alternan entre períodos de crecimiento y de división celular. En condiciones normales de crecimiento, las células presentan un ciclo celular eucariota típico que comprende las fases G1, S, G2 y M, aunque la duración de la fase G1 es muy corta. De hecho, la fase S de replicación del ADN coincide temporalmente con la formación del septo de división y, generalmente, todas las células hijas recién separadas surgen como células en fase G2.

Tras la citoquinesis y durante un breve espacio de tiempo, la célula recién nacida inicia su crecimiento por el polo viejo (OETO, *Old End Take Off*), es decir, por el polo heredado de la célula madre, hasta alcanzar un tamaño determinado (crecimiento monopolar). Al poco de comenzar G2, cuando la célula ha alcanzado un tamaño crítico, tiene lugar una activación del segundo polo, por lo que el patrón de crecimiento pasa de monopolar a bipolar. Esta transición se denomina NETO (del inglés, *New End Take Off*), y va acompañada de cambios en el citoesqueleto de actina y de la síntesis de componentes de la pared celular. A partir de este momento, el crecimiento se produce por deposición de material en los dos extremos del eje mayor de la célula. Finalmente, cuando las células han alcanzado un tamaño adecuado (12-15 μm), se inicia la mitosis y se detiene el crecimiento polarizado mientras se forma el septo en el centro de la célula, seguido de la separación celular (Fig. 4) (Verde, 1998).

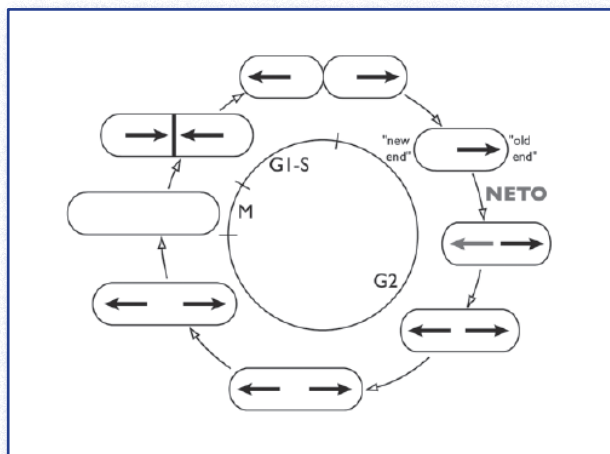


Figura 4. Ciclo vegetativo de la levadura de fisión *S. pombe*. Tras la división celular, las dos células hijas inician el crecimiento por el extremo o polo viejo de la célula, que corresponde con el extremo que existía ya antes de la citoquinesis. En la fase G2, tiene lugar el NETO (New End Take Off) y la célula comienza a crecer por el polo nuevo también. El crecimiento bipolar se mantiene hasta la fase M. Tras la mitosis, la maquinaria de crecimiento es dirigida hacia la región media de la célula para que se produzca la citoquinesis y la separación celular.

En determinadas condiciones, la separación celular se inhibe y las células hijas permanecen unidas. Así, en la Naturaleza, donde los nutrientes pueden escasear, *S. pombe* pierde su aspecto levaduriforme y puede formar pseudohifas e, incluso, hifas, en las que las células permanecen unidas unas a otras de manera que la búsqueda de nutrientes sea más eficaz. Para que se produzca la transición desde crecimiento unicelular y polarizado a la forma de pseudohifas e hifas, es necesaria la conjunción de tres factores: a) temperatura igual o superior a 30°C (los procesos de conjugación-esporulación se ven favorecidos a 25°C), b) medios pobres en nitrógeno, pero no totalmente carentes de este elemento, y c) presencia de una fuente de carbono (glucosa, glicerol...) (Amoah-Buahin *et al.*, 2005).

(I)- 2.2. Ciclo sexual

En medios pobres en nutrientes o carentes de nitrógeno, las células vegetativas se detienen en la fase G1 del ciclo mitótico. Si en el mismo medio se encuentran células de tipo sexual opuesto, comienzan a producir feromonas y receptores para estas feromonas (Kelly *et al.*, 1988). Las células h^- secretan factor-M y producen receptores para

el factor-P, mientras que las células h^+ secretan factor-P y producen receptores para el factor-M.

La unión de feromonas a sus receptores desencadena el proceso de conjugación. En primer lugar, las células forman proyecciones denominadas *shmoos* hacia la fuente de feromonas del tipo sexual complementario. A continuación, las células se aglutinan, uniéndose por parejas y, finalmente, se produce la fusión celular y la cariogamia (fusión de los núcleos celulares haploides) que termina en la formación de un cigoto diploide heterocigótico h^+/h^- . Este fenómeno se conoce como conjugación (Fig. 5).

Los diploides heterocigóticos son muy inestables. Si se mantienen las condiciones de escasez de nutrientes, inmediatamente tras la cariogamia sufren meiosis, generando cuatro núcleos haploides, alrededor de los cuales se sintetiza una pared celular altamente resistente. El resultado es la formación de cuatro células individuales, llamadas ascosporas, que quedan contenidas en un saco o asca cigótica (proviene directamente de un cigoto). El tipo sexual segrega de forma mendeliana, de modo que dos de las ascosporas son h^+ y las otras dos, h^- . Las esporas son formas de resistencia en las que la célula queda en un estado quiescente hasta que las condiciones del entorno vuelvan a ser favorables para germinar y generar células haploides que retoman el ciclo vegetativo de crecimiento.

El ciclo de conjugación-esporulación es el que generalmente ocurre en la Naturaleza, donde las condiciones nutricionales cambian con mayor facilidad. En cambio, si los cigotos diploides de *S. pombe* se transfieren rápidamente a un medio de crecimiento rico en nutrientes inmediatamente tras la conjugación y antes de la meiosis, son capaces de crecer vegetativamente como lo hacen las células haploides, aunque las dimensiones celulares son ligeramente mayores (11-14 μm cuando nacen y 20-25 μm justo antes de división). Las células diploides también son capaces de esporular en ausencia de nitrógeno, generando cuatro ascosporas haploides encerradas en un asca cigótica (no proveniente de un cigoto).

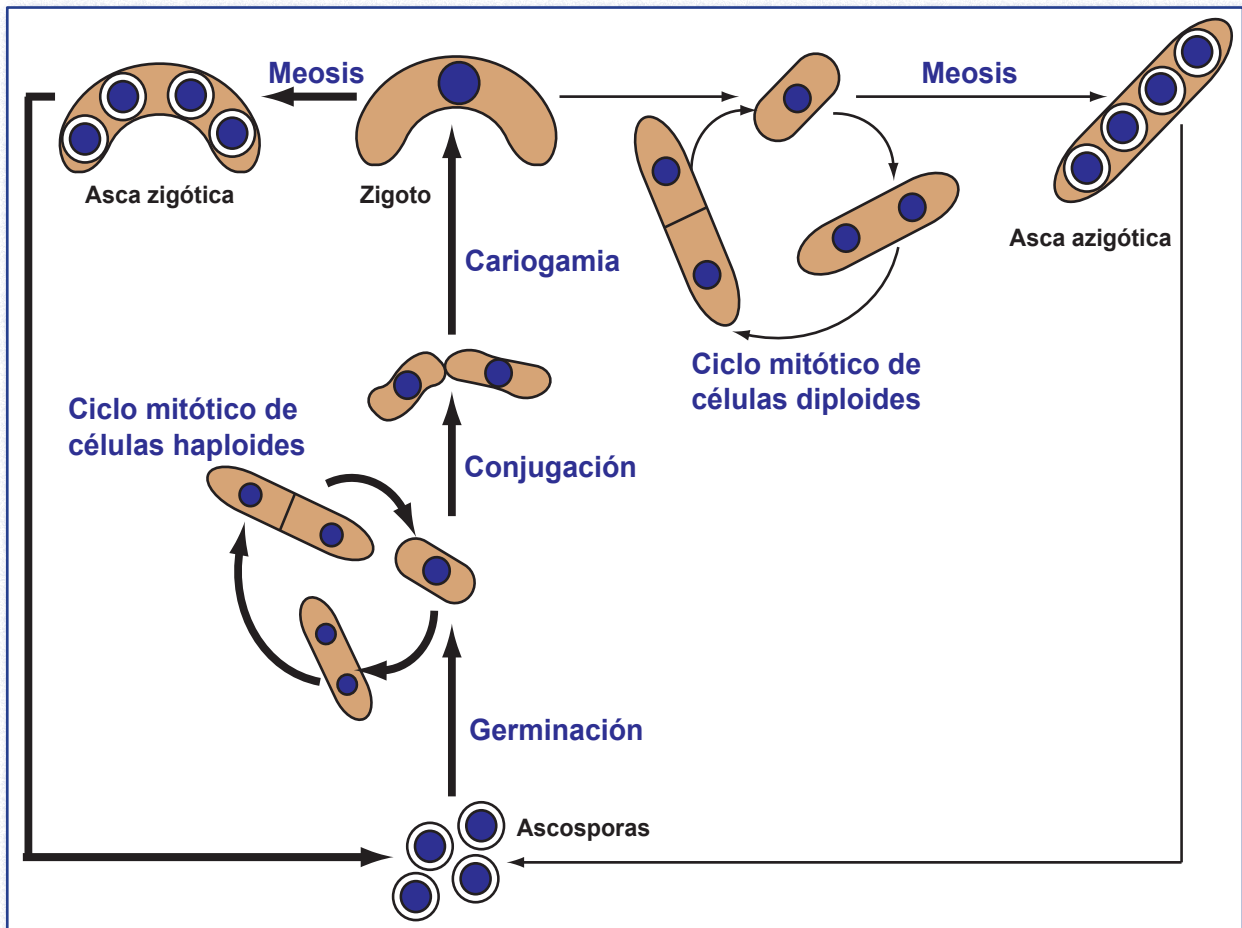


Figura 5. Representación esquemática del ciclo biológico de *S. pombe*. Se muestran tanto las fases haploides y diploides, como la generación de ascas zigóticas y azigóticas. Las flechas gruesas marcan el ciclo biológico más habitual de la levadura de fisión.

(I)- 3. Morfogénesis durante el crecimiento vegetativo

Las células de *S. pombe* mantienen su morfología cilíndrica no sólo gracias a la presencia de la pared celular, sino también a un crecimiento polarizado mediante elongación de sus polos. El crecimiento polarizado se consigue mediante la localización del citoesqueleto de actina y el transporte de los materiales necesarios para el crecimiento celular hacia puntos concretos de la superficie, bien los polos celulares o bien el centro durante la citoquinesis. Por ello, durante el ciclo celular tienen lugar cambios en el citoesqueleto de actina y microtúbulos que están correlacionados con los eventos más importantes del crecimiento polarizado de la célula. Los microtúbulos son necesarios para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular, pero no para el crecimiento polarizado. Por su parte, el citoesqueleto de actina es necesario para la activación y el mantenimiento

de las zonas de crecimiento (revisado en Hayles y Nurse, 2001; Martin y Chang, 2005; Moseley y Goode, 2006).

(I)- 3.1. Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina, responsable del crecimiento polarizado, está compuesto por tres elementos: acúmulos o parches de actina (*patches*), cables de actina y anillo contráctil de actina (anillo contráctil, anillo de acto-miosina o CAR, del inglés, *Contractil Actomyosin Ring*). Este citoesqueleto, al igual que el de microtúbulos, es una entidad dinámica y su reordenación estructural ocurre en tres momentos distintos del ciclo celular: en la transición del crecimiento monopolar a bipolar (NETO), en el inicio de la septación (formación y contracción del CAR) y en la reiniciación del crecimiento monopolar tras la citoquinesis.

El citoesqueleto de actina interfásico está compuesto principalmente por acúmulos de F-actina

que se localizan en los sitios de crecimiento de la célula, esto es, en el polo viejo antes de NETO y, después de este momento, en ambos polos celulares (Fig. 6). En muchos casos, estos parches de actina parecen estar conectados con cables de F-actina. Dado que los acúmulos de actina se localizan en los sitios de crecimiento activo de la célula y que en ocasiones aparecen ligados a filamentos de F-actina, podría pensarse que los parches son transportados por los cables de actina a zonas celulares determinadas para establecer dónde debe producirse el crecimiento polarizado. Sin embargo, Pelham y colaboradores (2001) constataron que los acúmulos de actina son transportados por los cables de actina en dirección centrípeta, no hacia los polos celulares. Esto indica que las zonas de crecimiento activo se definen por la nucleación de dichos parches en los sitios de crecimiento.

Cuando la célula entra en mitosis y se forma el huso mitótico, tiene lugar una reorganización drástica del citoesqueleto de actina. Los acúmulos de F-actina dejan de ser visibles en los polos celulares, al tiempo que se ensambla un anillo en el

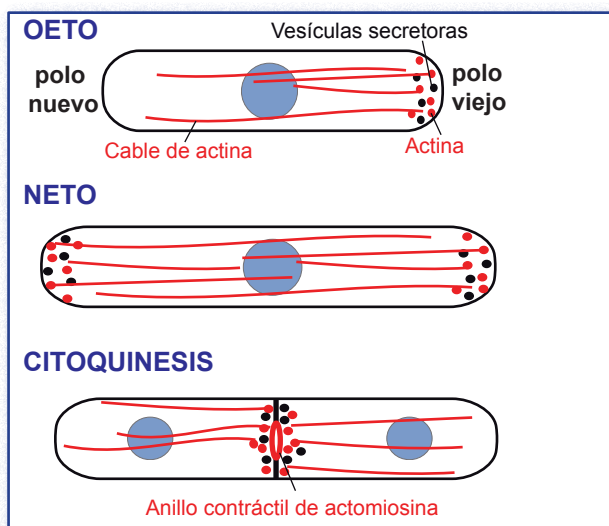


Figura 6. Distribución del citoesqueleto de actina a lo largo del ciclo celular. Las células hijas comienzan a crecer por el polo viejo, donde se observan acumulos de actina. Los cables de actina recorren la célula de polo a polo. Durante el NETO, se produce la nucleación de los parches de actina en el polo nuevo. Al alcanzar la célula el tamaño adecuado, ocurre la mitosis y la división celular. Esto supone la reorganización del citoesqueleto de actina, desapareciendo los acumulos de los polos celulares y concentrándose en forma de anillo en el centro de la célula. Este anillo se contrae y produce la invaginación de la membrana plasmática, conduciendo a la separación de los citoplasmas en un proceso conocido como citoquinesis. Durante la citoquinesis es posible observar nuevos parches de actina a ambos lados del tabique en formación.

centro de la célula. Este anillo se compone de F-actina, miosina y muchas otras proteínas (cdc12p, rng2p, cdc8p, cdc15p...). Cuando se aproxima el final de anafase, los parches de F-actina vuelven a visualizarse a ambos lados del anillo contráctil y parecen ser importantes para el correcto ensamblaje del septo de división celular. Una vez que desaparece el huso mitótico, el anillo de acto-miosina comienza a contraerse de modo concertado con la adición de nueva membrana citoplasmática. En *S. pombe*, la contracción del anillo va acompañada de la deposición centrípeta del septo de división, compuesto de α -1,3-glucano, β -1,3-glucano, β -1,6-glucano y α -galactomanano. El hecho de que los parches de actina estén situados en las zonas de crecimiento activo sugiere que estos acumulos podrían desempeñar algún papel en el crecimiento celular (revisado por Pelham y Chang, 2001; Rajagopalan *et al.*, 2003). Este cometido fue puesto de manifiesto en un estudio llevado a cabo sobre el mutante *cps8* por Ishijima y colaboradores (1999). En su trabajo, describen que una configuración molecular anómala de F-actina se traduce en despolarización del crecimiento y morfología aberrante, grosor variable de la pared celular, septos aberrantes y citoquinesis defectuosa. Asimismo, el empleo de citocalasina D (droga que causa la despolimerización de la actina de los acumulos y de los cables) reveló que el citoesqueleto de actina juega un papel importante en el inicio de la formación de la pared celular, la adecuada deposición de los materiales que la conforman y en el mantenimiento de la morfología normal de la pared celular en la regeneración de protoplastos (Kobori *et al.*, 1989). Por tanto, la presencia de un citoesqueleto de actina intacto es necesaria tanto para el establecimiento de los sitios de crecimiento como para un adecuado transporte de los materiales necesarios para dicho crecimiento.

(I)- 3.2. Citoesqueleto de microtúbulos

En la levadura de fisión, el citoesqueleto de microtúbulos desempeña un papel fundamental en la determinación de los sitios de crecimiento, en el establecimiento de la polaridad celular y en la posición del núcleo celular, que señalará el plano de división, a diferencia de lo que ocurre en la

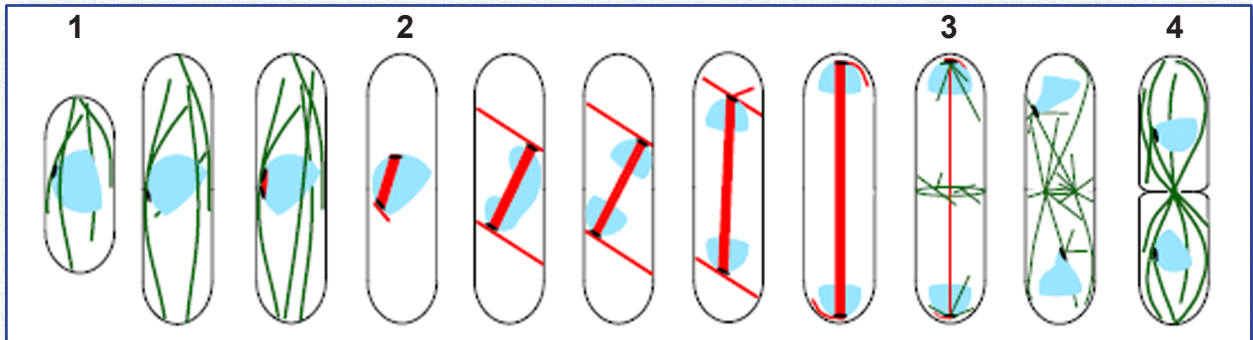


Figura 7. Representación de los cambios en la distribución de los microtúbulos a lo largo del ciclo vegetativo de *S. pombe*. Durante interfase (1), todos los microtúbulos son citoplasmáticos y se extienden de un polo a otro. Durante la mitosis (2), dichos microtúbulos se despolimerizan y la tubulina polimeriza para generar el huso mitótico. Una vez separados los núcleos hijos (3), en la zona media de la célula empiezan a nuclearse nuevos microtúbulos que forman el *post-anaphase array* (PAA). A partir del PAA y de los microtúbulos formados a partir de los SPBs, se llega a la distribución característica de los microtúbulos citoplasmáticos durante la interfase en las dos células recién generadas (4) (tomado de Hagan y Hyams, 1988).

levadura de gemación, en la que la selección del sitio de gemación no depende de los microtúbulos (Verde, 1998).

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas huecas en las cuales los heterodímeros de α/β -tubulina están empaquetados alrededor de un núcleo central. Son estructuras polarizadas, con un extremo + (de crecimiento rápido) y un extremo - (de crecimiento lento). Los microtúbulos se forman en unas estructuras llamadas centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, del inglés, *Microtubule Organizing Centres*). Estos MTOCs están en el centro de la célula, alrededor del núcleo, y están constituidos por una forma especial de tubulina (γ -tubulina), necesaria para la nucleación de nuevos microtúbulos. Los microtúbulos se orientan con sus extremos + hacia los extremos celulares y los extremos - quedan hacia el interior celular (revisado en Hayles y Nurse, 2001). Hasta la fecha, se han identificado cuatro genes que codifican tubulina: dos, α -tubulina (*nda2⁺*, *atb2⁺*), uno, β -tubulina (*nda3⁺*), y uno, γ -tubulina (*gtb1⁺/tug1⁺*).

Durante la interfase, existen tres o cuatro haces de microtúbulos en el citoplasma, orientados a lo largo del eje mayor de la célula, pudiendo llegar a extenderse desde un polo hasta el otro (Fig. 7). Cuando las células entran en mitosis, esta distribución de microtúbulos desaparece y se forma un huso mitótico intranuclear. En anafase, el huso intranuclear de microtúbulos empieza a desaparecer y comienzan a distinguirse microtúbulos citoplasmáticos en el centro de la célula, que crecen a partir del cuerpo polar del huso o SPB (*Spindle*

Pole Body) hacia los polos celulares. Al final de la mitosis vuelve a distinguirse la distribución típica de los microtúbulos interfásicos (Hagan, 1998).

Cuando existe algún defecto en los microtúbulos o en moléculas relacionadas con ellos (*tea1p*, *mal3p*, *cdc42p*...), es posible observar defectos morfogénicos, como la ramificación o la curvatura de las células de la levadura de fisión.

(I)- 3.3. Otros factores relacionados con morfogénesis

El mecanismo por el cual los microtúbulos se orientan dentro de la célula parece implicar la actividad de distintas proteínas (Fig. 8). En la levadura de fisión, a partir de mutantes con células curvadas o ramificadas se han identificado los genes *tea1⁺*, *tea2⁺*, *tip1⁺*, *mal3⁺* y *pom1⁺*, por citar algunos ejemplos. Se ha demostrado que la mutación de estos genes afecta, en mayor o menor medida, a la organización del citoesqueleto de tubulina. Así, *tea1p* (*tip elongation aberrant*) funciona como un marcador celular, permitiendo la identificación de los polos como tales. Es transportada hasta el córtex de ambos polos celulares por los extremos + de los microtúbulos. La proteína *tea1p* actúa como conexión entre el citoesqueleto de microtúbulos y la maquinaria de polaridad celular. La kinesina *tea2p* es necesaria para el transporte de *tea1p* a los extremos celulares, y podría actuar bien como un motor celular (*tea1p* sería la carga) o bien regulando la estabilidad de los microtúbulos interfásicos. La proteína *tip1p* (*tea inducing protein*) es un miembro de la familia CLIP170 que se sitúa en los

extremos + de los microtúbulos, estabilizándolos y evitando su despolimerización cuando chocan con las paredes laterales de la célula, por lo que parece formar parte de un mecanismo para la orientación de los microtúbulos a lo largo del eje mayor de la célula. La proteína mal3p es un regulador de la dinámica de los microtúbulos interfásicos y del huso mitótico, localizándose a lo largo de los microtúbulos. Los estudios llevados a cabo hasta el momento parecen sugerir que mal3p está implicada en la asociación de tea2p al microtúbulo. Por su parte, tip1p es requerida para anclar tea1p a los microtúbulos, siendo tea2p quien transporta el complejo tea1p-tip1p hacia su extremo +. La proteína tea4p (necesaria para el crecimiento bipolar) también viaja en el extremo + de los microtúbulos hasta los polos celulares, unida a tea1p. Algunas de estas proteínas se localizan en los extremos + de los microtúbulos, controlando la dinámica de los mismos y funcionando como sensores de las estructuras dianas de los microtúbulos. Otras proteínas residen en dichas estructuras dianas y podrían también influenciar la dinámica de los microtúbulos (polimerización, estabilidad, despolimerización) modificando la actividad de las proteínas residentes en las puntas de los microtúbulos (Brunner y Nurse, 2000; Busch *et al.*, 2004; Chang, 2001a; Hayles y Nurse, 2001; Martin y Chang, 2005).

Una cuestión importante es la aparente relación entre las proteínas residentes en los extremos + de los microtúbulos y las proteínas organizadoras del citoesqueleto de actina, que parece ser un aspecto general de la morfogénesis en todos los tipos celulares, desde levaduras hasta células epiteliales y neuronales. Cuando tea1p llega a los polos celulares, es retenida allí gracias a mod5p, que posiblemente se encuentra unida a la membrana plasmática en estas regiones ya que posee un sitio de prenilación. Junto con tea1p, queda retenida en los polos celulares tea4p, que media la interacción entre tea1p y una proteína llamada for3p. Esta última pertenece a la familia de las forminas, proteínas que participan en la nucleación de actina (revisado en Goode y Eck, 2007; Pollard, 2007) y que cuenta con tres representantes en *S. pombe*: for3p, cdc12p, y fus1p. La proteína for3p está

implicada en la nucleación de los acúmulos de actina y en el ensamblaje de los filamentos de actina en cables. Se ha demostrado que durante NETO, una condición necesaria y suficiente para el establecimiento de la polaridad celular y la nucleación de actina en el polo nuevo es la formación de un complejo multiproteico que incluye tea1p, tea4p y for3p, el denominado *polarisoma*. De este modo se pone de manifiesto que el establecimiento de la polaridad celular mediante el citoesqueleto de microtúbulos y el crecimiento polarizado regulado por el citoesqueleto de actina están interconectados (Fig. 8) (Basu y Chang, 2007; Chang y Peter, 2003; Feierbach y Chang, 2001; Feierbach *et al.*, 2004; La Carbona *et al.*, 2006; Martin y Chang, 2005; Martin *et al.*, 2005; Snaith y Sawin, 2003).

Otro mecanismo descrito recientemente en *S. pombe* que parece intervenir en el crecimiento polarizado es una distribución asimétrica de los lípidos de membrana, existiendo unos dominios enriquecidos en esfingolípidos y esteroides, llamados *lipid rafts*. Parecen estar implicados en multitud de funciones de las membranas biológicas. Los *lipid rafts* se localizan en los sitios de crecimiento activo, esto es, en los polos de células interfásicas y

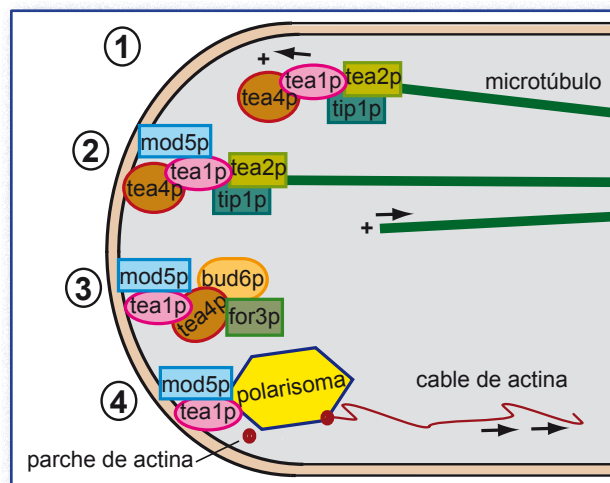


Figura 8. Modelo para la regulación de la polaridad celular por los microtúbulos en la levadura de fisión. (1): tea1p está unida a los extremos + de los microtúbulos mediante tip1p, tea2p y mal3p (tea4p viaja unida a tea1p). (2): el crecimiento de los microtúbulos permite la acumulación de tea1p y tea4p en los polos celulares. Cuando los microtúbulos se despolimerizan, tea1p permanece anclada en estas regiones gracias a mod5p. (3): tea1p interviene en la regulación de la polaridad celular reclutando el polarisoma, un complejo proteico que engloba a factores de polaridad celular, como tea4p, bud6p y for3p. (4): El polarisoma promueve el crecimiento polarizado, ya que for3p activa la nucleación de parches de actina y el ensamblaje de filamentos de actina para la formación de cables.

en la zona media de la célula en el momento de la citoquinesis (Wachtler *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2001). La distribución de estos dominios está regulada a lo largo del ciclo celular y su integridad es crucial para la localización de la maquinaria de crecimiento celular, para la formación y constricción del anillo de actomiosina durante la citoquinesis y para la estabilidad de proteínas integrales de membrana (revisado por Fischer *et al.*, 2008; Rajagopalan *et al.*, 2003). También parecen ser importantes para que las vesículas de secreción se dirijan al sitio de división durante la citoquinesis. Se ha especulado que proteínas del tipo GPI-CWP (proteínas de pared celular-*cell wall proteins*- con motivo glicosil-fosfatidil-inositol) serían transportadas desde la membrana plasmática a la pared celular a través de vesículas de pequeño tamaño que se formarían en estos dominios ricos en ergosterol, sirviendo así como delimitadores espaciales en la incorporación selectiva de proteínas, a la vez que se facilitarían la interacción entre las mismas al aumentar su concentración en estas áreas (Watanabe *et al.*, 2002).

(I)- 4. Citoquinesis y separación celular en *S. pombe*

La citoquinesis es el último evento del ciclo celular, por el cual una célula madre reparte los orgánulos y el citoplasma entre las dos células hijas. A pesar de la existencia de mecanismos conservados a lo largo de la evolución, también existen diferencias en la manera de llevarla a cabo por las distintas células. Así, las células animales se dividen mediante la invaginación de la membrana plasmática, originando un surco de división que constriñe progresivamente el citoplasma. Por su parte, las células vegetales, fúngicas y de levaduras se dividen gracias a la formación de una nueva pared celular. Sin embargo, tampoco entre ellas existe uniformidad, ya que las células vegetales sintetizan dicha pared desde el centro hacia la periferia, mientras que en los hongos y levaduras la nueva pared o septo de división crece de manera centrípeta. Otra diferencia importante reside en el hecho de que, en células animales, la orientación

del huso mitótico determina el plano de división, mientras que en células fúngicas, es el plano de división quien orienta el huso mitótico.

En la levadura de fisión, al inicio de la mitosis se forma una estructura llamada anillo medio en el centro de la célula, en la zona del córtex celular que rodea al núcleo. La posición de este anillo marca el sitio de septación. Está compuesto por varias proteínas cuya misión es la de contribuir a la formación del anillo contráctil de actomiosina. Al final de anafase, el huso mitótico se desensambla, se inicia la contracción del anillo de actomiosina y la biosíntesis del septo, de tal manera que el septo primario crece de manera centrípeta desde el córtex celular. El septo maduro posee una estructura de tres capas, compuesta por el septo primario e interno, flanqueado por los septos secundarios. Una vez que concluye la síntesis del septo, los parches de F-actina vuelven a situarse en el polo viejo (heredado de la célula madre), lugar donde comenzará el crecimiento (revisado en Barr y Gruneberg, 2007; Gould y Simanis, 1997; Hyams, 2005; Rajagopalan *et al.*, 2003). Por tanto, parece clara la existencia de tres pasos en la citoquinesis: 1) la elección del sitio de división celular y ensamblaje del anillo de actomiosina; 2) la contracción del anillo de actomiosina y la síntesis del septo de división; y 3) la degradación del septo primario y separación celular.

(I)- 4.1. Elección del sitio de división y ensamblaje del anillo de actomiosina

La elección del sitio de división se determina en G2 y refleja la posición del núcleo interfásico dentro de la célula (revisado por Burgess y Chang, 2005; Chang y Nurse, 1996; Wolfe y Gould, 2003). Existen numerosas proteínas necesarias para la formación del anillo de actomiosina, que se resumen en la Tabla 1. Análisis genéticos han permitido demostrar que mid1p, plo1p y pom1p juegan un papel importante correlacionando la posición del núcleo en interfase con el sitio de división celular. La proteína mid1p posee un dominio de homología a pleckstrina en su extremo carboxilo y una secuencia de localización nuclear. Consecuentemente, mid1p se localiza en el núcleo durante in-

Tabla 1. Proteínas implicadas en la formación del anillo contráctil.

<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Familia de proteína
Posición del anillo		
mid1p	Bni4p	Proteína PH
plo1p	Cdc5p	Polo kinasa
pom1p	¿?	kinasa
Componentes esenciales		
cdc3p	Pfy1p	Profilina
cdc4p	Mlc1p	Miosina II, cadena ligera
cdc8p	Tpm1p, Tpm2p	Tropomiosina
cdc12p	Bni1p/Bnr1p	Formina
cdc15p, imp2p	Hof1p/Cyk2p	Proteína PCH
rng2p	Iqg1p/Cyk1p	Proteína IQGAP
rng3p	¿?	Proteína UCS
myo2p/rng5p	Myo1p	Miosina II, cadena pesada
act1p/cps8p	Act1p	Actina
Componentes no esenciales		
rlc1p	Mlc2p	Miosina II, cadena ligera reguladora
myp2p/myo3p	Myo1p	Miosina II, cadena pesada
fim1p	Sac6p	Fimbrina
ain1p	¿?	α -actinina
crm1p	Crm1p	Coronina

terfase pero al final de G2 se distribuye en forma de una ancha banda en el córtex celular que rodea al núcleo en un proceso dependiente de la Polo-kinasa plo1p. En esta disposición, mid1p establece el plano de división celular y es necesaria para que el resto de los componentes del anillo contráctil se ensamblen (revisado en Chang y Nurse, 1996; Chang, 2001b; Wolfe y Gould, 2003).

En la transición G2/M, llegan a la banda formada por mid1p la miosina II (compuesta por la cadena pesada myo2p y las cadenas ligeras cdc4p y rlc1p) y rng2p, seguidas por cdc15p (homóloga a PCH) y la formina cdc12p (actúa como nucleador de actina durante la citoquinesis). No se conoce muy bien cómo se anclan todos estos componentes en esta zona concreta de la célula, aunque parece que rng2p podría unirse a la miosina II a través de cdc4p. Ya durante la mitosis, llegan a la zona ecuatorial del córtex los filamentos de actina y la tropomiosina cdc8p. A continuación, los componentes de esta banda se ensamblan en un anillo compacto que incluye la α -actinina ain1p. En este momento, cdc12p polimeriza la actina en forma de anillo contráctil y las interacciones entre los filamentos con la miosina II podrían generar

la fuerza suficiente para el ensamblaje de los distintos componentes. La proteína cdc15p también recluta el complejo arp2/3 y sus activadores al córtex ecuatorial durante la anafase. Este complejo estimula la nucleación de filamentos de actina y de nuevos parches, y parece intervenir en la maduración del anillo. Finalmente, el anillo termina de madurar gracias a la incorporación de myp2p (Balasubramanian *et al.*, 2004; Rajagopalan *et al.*, 2003; Vavylonis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006).

(I)- 4.2. Contracción del anillo de actomiosina y síntesis del septo de división

Para asegurarse de que cada célula hija recibe únicamente una copia de cada cromosoma, la citoquinesis no debe tener lugar hasta que se haya completado la segregación de cromosomas. Por tanto, es crucial que existan mecanismos que impidan la citoquinesis antes de que hayan terminado eventos anteriores. En la levadura de fisión, existe una cascada de señalización llamada SIN (de *Septation Initiation Network*) que asegura que la citoquinesis se inicie cuando ha terminado la mitosis y cuando se han inactivado los factores promotores de mitosis CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*). La cascada SIN activa la citoquinesis, promoviendo la contracción del anillo de acto-

Tabla 2. Componentes de las rutas MEN y SIN.

<i>S. pombe</i> (SIN)	<i>S. cerevisiae</i> (MEN)	Función
byr4p	Bfa1p	GAP
cdc7p	Cdc15p	Kinasa
cdc11p	Nud1p	Escafoldina
cdc14p	¿?	Subunidad reguladora
cdc16p	Bub2p	GAP
clp1p	Cdc14p	Fosfatasa
etd1p	¿?	¿?
mob1p	Mob1p	Subunidad reguladora
plo1p	Cdc5p	Polo kinasa
sid1p	¿?	Kinasa
sid2p	Dbf2p, Dbf20p	Kinasa
sid4p	¿?	Escafoldina
spg1p	Tem1p	GTPasa tipo Ras
¿?	Lte1p	GEF

miosina, de forma similar a la ruta MEN (*Mitotic Exit Network*) de la levadura de gemación (Tabla 2) (revisado por Bardin y Amon, 2001; Krapp *et al.*, 2004; Le Goff *et al.*, 1999; McCollum y Gould, 2001; Wolfe y Gould, 2003).

Los componentes del SIN se encuentran en el SPB y se activan en mitosis. Se trata de una cascada de proteínas quinasas que se anclan sobre una proteína andamio y a las que también se unen *plp1* y el complejo *cdc2p*-ciclina B (Fig. 9). Las proteínas *sid4p* y *cdc11p* funcionan anclando a los demás componentes del SIN al SPB. A su vez, *cdc11p* puede interactuar con el complejo formado por *spg1p*-*cdc16p*. La proteína *spg1p* pertenece a la familia de GTPasas Ras y controla el inicio de la septación. Esta proteína está anclada al SPB durante todo el ciclo celular, pero sólo se activa (en la forma unida a GTP) durante metafase, permitiendo la interacción con *cdc7p*, una quinasa cuya actividad permanece constante a lo largo del ciclo celular, pero que sólo interacciona adecuadamente con sus sustratos cuando se une al SPB. Durante anafase B, coincidente con la disminución de la actividad CDK, el complejo formado por *sid1p*-*cdc14p* llega al SPB. La localización de este complejo en el SPB es necesaria para la interacción con sus sustratos. Otros dos componentes del SIN son *sid2p*-*mob1p*, que se

encuentran en el SPB de manera constitutiva. Sin embargo, en el momento en que *sid1p*-*cdc14p* llega al SPB, el complejo *sid2p*-*mob1p* sale del SPB y se distribuye en el anillo medio. Allí, presumiblemente, fosforilan a *cdc15p* para desencadenar la contracción del anillo y la septación.

Por otro lado, la polo quinasa *plp1p* es un regulador positivo de la cascada SIN. Así, esta proteína es necesaria para marcar el sitio de división y para desencadenar la citoquinesis. Por su parte, diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de dos proteínas que, asociadas en un complejo, actuarían a modo de reguladores negativos de la cascada de inicio de septación. Se trata de *byr4p* y *cdc16p*, que tienen como GAP (*GTPase-Activating Protein*), devolviendo a *spg1p* a su conformación inactiva, unida a GDP.

Recientemente se ha descrito una nueva proteína, esencial en *S. pombe* y cuya secuencia no está conservada en otros eucariotas: *etd1p*. Durante interfase, se localiza en los polos celulares, pero en mitosis se traslada al córtex de la región ecuatorial y, coincidiendo con la citoquinesis, se ensambla en el anillo medio gracias a su asociación con *cdc15p*. Este cambio de posición está desencadenado por la ruta SIN y, de modo recíproco, la localización del complejo *sid2p*-*mob1p*

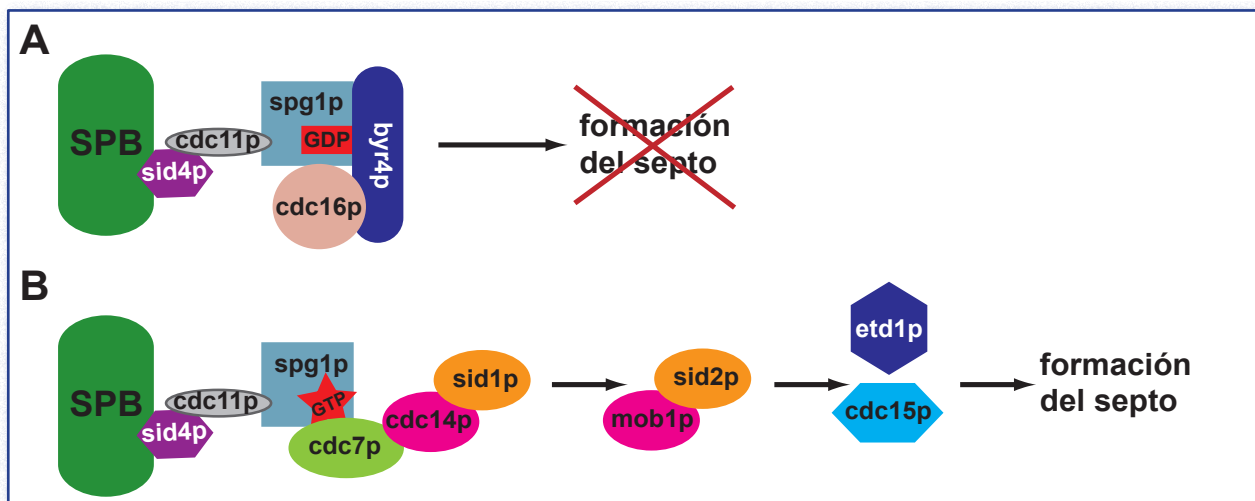


Figura 9. Modelo del funcionamiento de la cascada de inicio de septación (SIN) en *S. pombe*. Todos los componentes de esta cascada se localizan, al menos en algún momento del ciclo celular, en el SPB. Las proteínas *sid4p* y *cdc11p* sirven de andamiaje para los demás componentes. (A) Durante interfase, el complejo GAP formado por *cdc16p*-*byr4p* mantiene a *spg1p* en su conformación inactiva (unida a GDP). (B) Al inicio de la mitosis, mediante un mecanismo no muy bien conocido aún, *spg1p* pasa a su forma activa (unida a GTP), lo que le permite unir *cdc7p* al SPB. Tras el descenso de la actividad CDK, el complejo formado por *spg1p*-*cdc7p* recluta al complejo quinasa *sid1p*-*cdc14p*, que activa al complejo *sid2p*-*mob1p* presente en el SPB durante interfase. Este complejo se transloca al sitio de división para iniciar la citoquinesis, posiblemente fosforilando a *cdc15p* y permitiendo su unión con *etd1p* (adaptado de Krapp *et al.*, 2004; McCollum y Gould, 2001).

en el sitio de división depende de *etd1p*. Por tanto, esta proteína está implicada en la coordinación de la activación del SIN con el inicio de la contracción del anillo. La proteína *mid1p* abandona el anillo inmediatamente antes a la contracción. Parece que *rng3p* estimula la capacidad de la miosina tipo II de hacer deslizar los filamentos de actina, por lo que esta proteína estimularía la contracción del anillo. A la par que el anillo se contrae, se añade material de membrana en el sitio de división para permitir la expansión de la superficie celular. Durante la citoquinesis, en la región media de la célula se concentran dominios de membrana del tipo “*lipid rafts*”, proceso dependiente de *cdc15p* (Takeda *et al.*, 2004). Coordinado con la contracción del anillo y la adición de membrana se produce la síntesis del septo primario (compuesto fundamentalmente por β -1,3-glucano) y de los septos secundarios a ambos lados del anterior. La proteína *cps1/bgs1p* es la β -1,3-glucán-sintasa responsable de la síntesis del septo primario y para su correcta localización es necesaria la cascada SIN. Además, *cps1p/bgs1p* forma parte de un mecanismo de control de citoquinesis, de modo que si las células hijas no han llevado a cabo adecuadamente este paso, no progresan correctamente en el ciclo celular posterior y quedan detenidas en G2 (Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2007; Daga *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000b; Wolfe y Gould, 2003).

(I)- 4.3. Degradación del septo primario y separación celular

El septo de división es una estructura trilaminar compuesta de una capa central transparente a los electrones (septo primario, rico en β -1,3-glucano lineal) y dos capas laterales electrodensas (septos secundarios). La separación de las células hijas requiere dos procesos degradativos distintos: 1) la erosión del material de pared celular que rodea el septo de división, y 2) la disolución del septo primario (revisado en Sipiczki, 2007; Walther y Wendland, 2003).

El aislamiento de mutantes defectivos en separación ha permitido entender cómo se realiza la degradación del septo. En un principio ya se había postulado que las glucanasas deberían estar

implicadas, puesto que la pared y el septo contienen glucanos. De acuerdo con esta predicción, en nuestro laboratorio se demostró que la endo- β -1,3-glucanasa *eng1p*, que se localiza de manera transitoria en forma de un anillo en la región del septo, es necesaria para la disolución del septo primario (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Además, también se ha descrito la existencia de una endo- α -1,3-glucanasa, *agn1p*, que actúa de manera concertada con *eng1p* para llevar a cabo la separación celular eficientemente. Esta segunda enzima actúa hidrolizando el material de pared celular que rodea el septo primario (Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005). El complejo del exocisto también es necesario para la separación celular, y parece que está implicado en el transporte de las enzimas hidrolíticas *eng1p* y *agn1p*. Para la correcta localización de ambas glucanasas se requiere, además, la participación de la anillina *mid2p* y de las septinas (Martín-Cuadrado *et al.*, 2005). Por último, se ha descrito que la GTPasa *rho4p* también es necesaria para la localización de ambas glucanasas en situaciones de estrés (Santos *et al.*, 2005).

Otros mutantes con defectos de separación celular son aquellos que presentan mutaciones en los factores de transcripción *sep1p* o *ace2p* (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Ribar *et al.*, 1997; Ribar *et al.*, 1999; Rustici *et al.*, 2004). Se ha descrito la existencia de una cascada de transcripción desde *sep1p* hasta *ace2p*, que supone una ruta de regulación al final del ciclo celular y que está implicada en la separación celular. La proteína *ace2p* promueve la transcripción, entre otras, de las dos enzimas que suponen la mayor parte de la actividad catalítica requerida para la separación de las células hijas (*eng1p* y *agn1p*) (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Rustici *et al.*, 2004).

(I)- 5. Diferenciación sexual en *S. pombe*

Como ya se ha mencionado, bajo determinadas condiciones, dos células haploides pueden fusionarse para formar un diploide. La fusión ocurre entre células de tipo sexual opuesto y está controlada por el intercambio recíproco de feromonas.

Las células de cada tipo sexual liberan péptidos que inducen cambios morfológicos en las células del tipo sexual opuesto. El diploide resultante sufre meiosis y esporulación para generar esporas haploides. La información del tipo sexual en *S. pombe* viene determinada por el locus *mat1*. Las células P producen la proteína *mat1-Pc* y las células M, *mat1-Mc*, siendo ambas necesarias para la producción de feromonas y sus receptores.

La ausencia de nutrientes y los fenómenos de conjugación-esporulación suponen cambios drásticos en la expresión génica. Al menos 2.000 genes aumentan su expresión al doble durante estos procesos, mientras que unos 700 genes se inducen más de cinco veces. Por el contrario, cientos de genes ven reprimida su expresión. Así, estudiando el programa transcripcional de meiosis y esporulación, Mata y colaboradores dividieron los genes que se inducen en cuatro clases temporales coincidentes con los principales procesos biológicos de la diferenciación sexual: respuesta a cambios nutricionales (genes inducidos por limitación de nutrientes o feromonas), fase S premeiótica o recombinación (genes tempranos o *early group*), divisiones meióticas (genes medios o *middle group*) y formación de esporas (genes tardíos o *late group*) (Mata *et al.*, 2002).

(I)- 5.1. Regulación nutricional del ciclo sexual

En *S. pombe*, el desarrollo sexual se induce cuando el aporte de nutrientes (glucosa y, especialmente, nitrógeno) se vuelve limitante y la concentración citoplasmática de AMPc (AMP cíclico) juega un papel importante en el control de esta respuesta (Fig. 10). Tanto la glucosa como el nitrógeno activan la misma proteína G heterotrimérica

ca, provocando el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, que se disocia de las subunidades $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ está codificada por el gen *gpa2⁺*. La proteína *gpa2p* unida a GTP activa la adenilato ciclasa *cyr1p*, que cataliza el paso de ATP a AMPc. Por tanto, la presencia de glucosa y nitrógeno en el medio se corresponde con una alta concentración intracelular de AMPc.

La inhibición del desarrollo sexual mediada por AMPc se realiza a través de la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc, PKA, que tiene dos subunidades, una subunidad catalítica (*pka1p*) y una subunidad reguladora (*cgs1p*). Hay al menos dos rutas controladas por PKA: la ruta de gluconeogénesis y la ruta de desarrollo sexual,

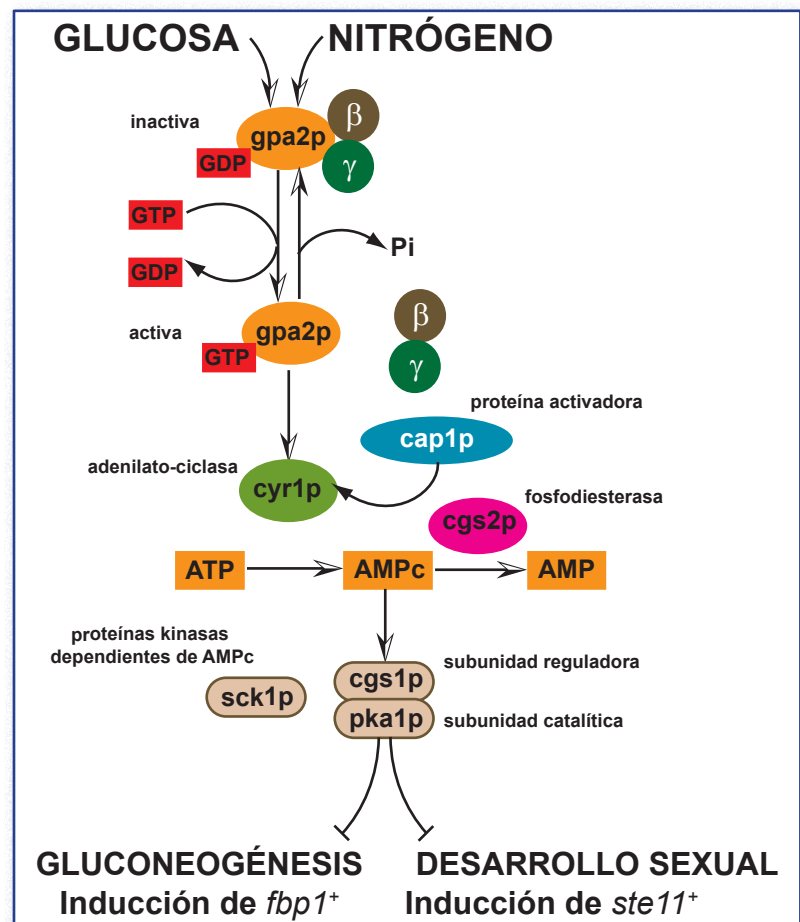
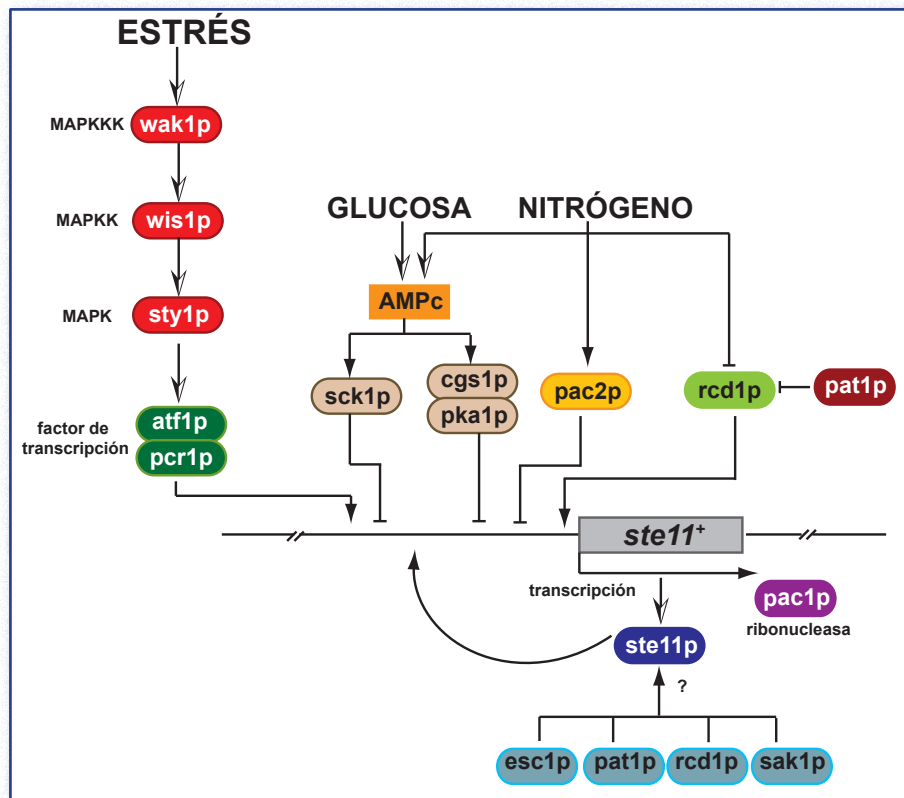


Figura 10. La ruta del AMPc de detección de nutrientes. La ausencia de nitrógeno o glucosa activa una proteína G heterotrimérica y conduce a la liberación de la subunidad $G\alpha$ -GTP (*gpa2p*), que estimula la adenilato ciclasa (*cyr1p*). La adenilato ciclasa, que también es estimulada por *cap1p*, convierte el ATP en AMP cíclico y, por tanto, activa las proteínas kinasas dependientes de AMPc *cgs1p-pka1p* y *sck1p*. *cgs1p-pka1p* es el principal regulador del desarrollo sexual. La conversión de AMPc en AMP por la fosfodiesterasa *cgs2p* ayuda a finalizar la respuesta. Las rutas por debajo de las proteínas kinasas son estimuladas en distinto grado por las distintas señales nutricionales. La ausencia de nitrógeno es más eficiente en la inducción del desarrollo sexual y la falta de glucosa promueve la gluconeogénesis (adaptado de Davey, 1998).

Figura 11. Regulación de *ste11p*. La expresión de *ste11⁺* está mediada por una cascada de MAP kinasas activadas por estrés y por varios sensores de nutrientes. El factor de transcripción *atf1p-pcr1p* es activado por *sty1p* y regula positivamente la expresión de *ste11⁺*, mientras que las PKAs (*pka1p* y *sck1p*) inhiben su expresión. La regulación de *ste11⁺* por nitrógeno depende del represor *pac2p* y del inductor *rcd1p* tras la inactivación de *pat1p*. Por otro lado, *ste11p* regula positivamente su propia expresión. La proteína *pac1p* es una ribonucleasa que degrada las moléculas de ARN. Las proteínas *esc1p*, *pat1p*, *rcd1p* y *sak1p* también están implicadas en la modulación de la actividad de *ste11p* (adaptado de Davey, 1998).



cuya activación es independiente y son inducidas en distinto grado dependiendo de la señal nutricional. De este modo, la ausencia de nitrógeno es más eficiente para inducir el desarrollo sexual que la ausencia de glucosa. Uno de los genes regulados por PKA es *ste11⁺*. Dicho de otro modo, la ausencia de nutrientes resulta en una activación transcripcional de *ste11⁺*, mediante la regulación negativa de la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc. El gen *ste11⁺* codifica una proteína de unión a ADN que se une a un motivo presente en el promotor de genes implicados en el desarrollo sexual. Estos genes ayudan a establecer la ruta de comunicación de feromonas que regula la diferenciación sexual (Fig. 11).

Uno de los principales reguladores de la expresión de *ste11⁺* es un factor de transcripción heterodimérico, formado por *atf1p-pcr1p*. La actividad de este factor podría estar controlada por PKA. El factor *atf1p* también es fosforilado por la ruta MAPK que se activa en ausencia de nitrógeno, compuesta por *wak1p* (MAPKKK), *wis1p* (MAPKK) y *sty1p* (MAPK), y su activación induce la expresión de *ste11⁺*. Además, parece que *ste11p* induce su propia expresión mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. Por el contrario,

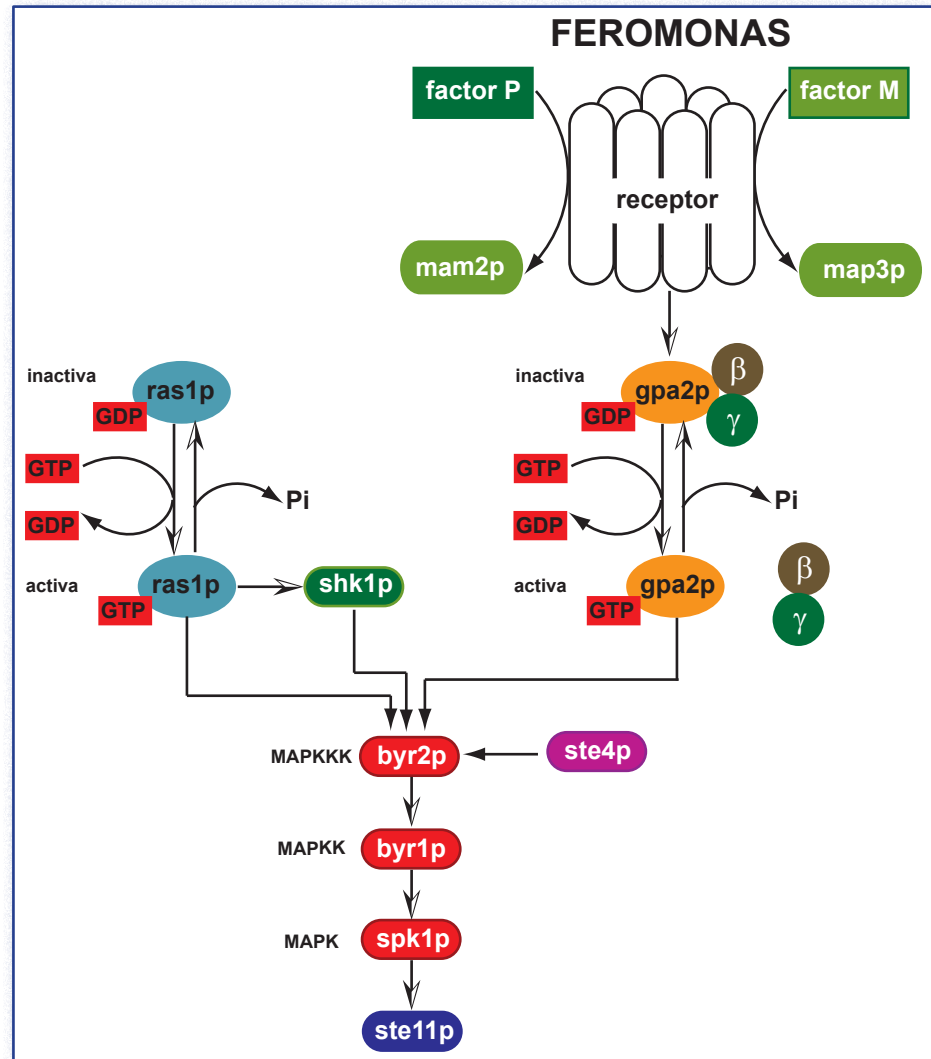
algunos reguladores negativos de la expresión de *ste11⁺* son *pac1p* y *pac2p*. Asimismo, existen factores que regulan la propia actividad de *ste11p*, como *esc1p*, *pat1p*, *rcd1p* y *sak1p*.

(I)- 5.2. Regulación del ciclo sexual por la acción de feromonas

El factor M es un nonapéptido con una cisteína en el extremo carboxilo que está metilada y farnesilada, mientras que el factor P es un péptido de 23 aminoácidos. La unión de las feromonas a sus receptores activa una cascada de MAPK y una proteína G heterotrimérica (Fig 12). Los receptores de feromonas interaccionan con una proteína heterotrimérica localizada en la cara citoplásmica de la membrana celular, activando el cambio de GDP por GTP y la disociación de las subunidades $G\alpha$ (*gpa2p*) y $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ activa una ruta de MAPK compuesta por *byr2p* (MAPKKK), *byr1p* (MAPKK) y *spk1p* (MAPK).

Por otro lado, existe una proteína G monomérica (*ras1p*) que parece modular la actividad de otros componentes que actúan como propagadores de la señal. El complejo *ras1p*-GTP es la forma activa que se une a *byr2p* para situar a esta MAPKKK en una localización donde pueda interac-

Figura 12. La ruta de respuesta a feromonas. La unión de las feromonas a sus receptores en la superficie celular activa la maquinaria intracelular que permite los cambios necesarios para la fusión. El factor P se une a mam2p, que está en la superficie de las células M, y el factor M se une a map3p en las células P. El receptor estimulado interacciona con una proteína G heterotrimérica y libera la subunidad $G\alpha$ -GTP, uno de los componentes requeridos para la activación de la cascada de MAP-quinasas de byr2p, byr1p y spk1p. La activación de byr2p también necesita de la GTPasa ras1p. La interconversión entre los estados activos e inactivos de ras1p está controlada por el factor de intercambio de nucleótidos ste6p y la proteína activadora de GTPasa gap1p. Las proteínas shk1p y ste4p también son necesarias para la activación de byr2p. Las dianas de spk1p no están bien definidas, pero la estimulación por feromonas resulta en la activación de ste11p (adaptado de Davey, 1998).



cionar con otros componentes de la maquinaria de señalización.

El último componente de esta ruta de MAPK es spk1p, esencial para propagar la señal de feromonas y presumiblemente encargado de fosforilar una o más proteínas diana, entre las que podría encontrarse algún factor de transcripción, como ste11p.

(I)- 5.3. Cambios en el citoesqueleto celular inducidos por feromonas

La estimulación mediante feromonas desencadena numerosos cambios celulares para preparar a las células para la conjugación. Se produce una parada del ciclo celular en G1, para asegurar que ambas células están en la fase adecuada del ciclo celular antes de la cariogamia. Las células en G1 continúan creciendo y aumentando su tamaño, pero se pierde el patrón de crecimiento polarizado

normal. En su lugar, la célula se alarga hacia la fuente de feromonas, lo que conduce a la formación del *shmoo*. La fusión de las células haploides ocurre en la punta del *shmoo*. Se ha descrito que la presencia de feromonas de tipo sexual opuesto origina que los acúmulos de F-actina que estaban localizados en el polo viejo pasen a situarse en ambos polos celulares (situación similar a G2, cuando la célula experimenta crecimiento bipolar) durante un corto tiempo antes de concentrarse en el polo que se encuentra más cercano a la fuente de feromonas (Fig. 13A). Durante la fusión celular, los acúmulos de F-actina se localizan en las zonas correspondientes a las puntas del *shmoo*. Posteriormente, hay una redistribución de la actina por todo el citoplasma del cigoto durante el movimiento en forma de cola de caballo que sufre el núcleo durante meiosis (ver más adelante). Al final de la meiosis II, los parches de F-actina se acumulan alrededor de los núcleos, en aquellas zonas don-

de se forma la membrana de la forespora y en las que se produce la deposición de material de pared para formar la envuelta de la espora. Finalmente, la actina queda acumulada en el interior de las ascosporas maduras (Petersen *et al.*, 1998b).

Los microtúbulos también parecen intervenir en la conjugación celular, ya que su integridad es necesaria para la formación de la proyección del *shmoo* y para la fusión celular. Los microtúbulos son necesarios para la correcta localización de la actina en la punta del *shmoo*. Se ha descrito además un centro organizador de microtúbulos (MTOC) que se sitúa en las puntas de las proyecciones celulares durante el contacto célula-célula (Fig. 13B). Este MTOC podría jugar un papel importante en la regulación de la fusión dirigiendo hacia la punta celular vesículas o moléculas necesarias para la fusión celular, como *fus1p* (Niccoli y Nurse, 2002; Petersen *et al.*, 1998a).

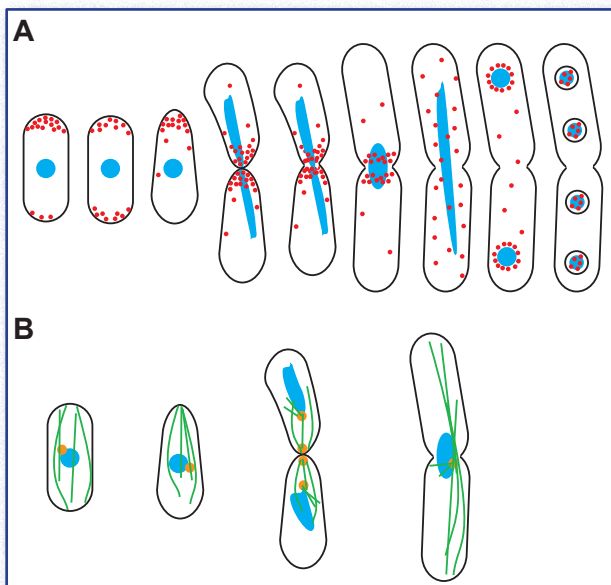


Figura 13. Localización del citoesqueleto durante la conjugación de *S. pombe*. (A) La ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo y la presencia de feromonas provoca la localización bipolar de F-actina, que vuelve a ser monopolar cuando se forma la proyección hacia la fuente de feromonas. Durante la conjugación y meiosis, la F-actina se localiza en torno al punto de fusión y permanece en esta región durante la cariogamia (fusión nuclear). Los parches de F-actina, a continuación, se distribuyen por todo el citoplasma hasta la metafase II, cuando se concentran alrededor de los núcleos. En las ascas maduras, la F-actina está concentrada dentro de las ascosporas. Los parches de actina se han representado en rojo y los núcleos en azul. (B) Cambios sufridos por el citoesqueleto de microtúbulos durante la conjugación celular. Se muestran los microtúbulos (trazos verdes), los núcleos (azul) y las regiones ricas en γ -tubulina (MTOCs) (naranja).

El crecimiento polarizado pone, finalmente, a las células en contacto y permite la aglutinación previa a la fusión celular. La aglutinación es seguida de un debilitamiento de la pared celular, que comienza en el centro y prosigue hacia los bordes de la fracción de pared que está en contacto. Se ha sugerido que una glucanasa específica de la conjugación estaría implicada en la degradación del β -1,3-glucano en la pared celular y permitiría la fusión de las membranas celulares. La degradación de dicha pared celular y la fusión de las membranas plasmáticas deben estar estrechamente coordinadas para evitar que las células se vuelvan sensibles osmóticamente. La fusión celular requiere la proteína *fus1p*, cuya expresión está inducida en presencia de feromonas y que se localiza en la punta de las proyecciones. Esta proteína pertenece a la familia de las forminas, implicadas en la nucleación de actina. Así, *fus1p* es necesaria para estabilizar la asociación de F-actina con la zona de fusión tras el contacto célula-célula (Petersen *et al.*, 1995; Petersen *et al.*, 1998c).

(I)- 5.4. Meiosis

Tras la fusión de los citoplasmas tiene lugar la fusión nuclear en el cuello del tubo de conjugación y parece que el primer evento es la puesta en contacto de los SPBs. De esta manera se genera un núcleo 2c. La síntesis de ADN premeiótica duplica el contenido de ADN del cigoto a 4c, mientras que el núcleo fusionado adopta la forma de cola de caballo ("*horse tail*") y empieza a moverse rápidamente de un extremo a otro de la célula. La agitación parece que ayuda al alineamiento y recombinación de los cromosomas homólogos. Dos divisiones meióticas consecutivas generan cuatro núcleos 1c, que son encapsulados para la formación de ascosporas haploides. Los mutantes que presentan defectos en meiosis I y meiosis II se designan, respectivamente, *mei* y *mes*. Por su parte, los mutantes con defectos de esporulación pero que son capaces de completar meiosis se denominan como *spo*.

La entrada en meiosis es regulada por la interacción entre *mei2p* y *pat1p* (Fig. 14). La proteína *mei2p* es inducida por *ste11p* cuando disminuyen los niveles de nitrógeno en el medio de cultivo, y

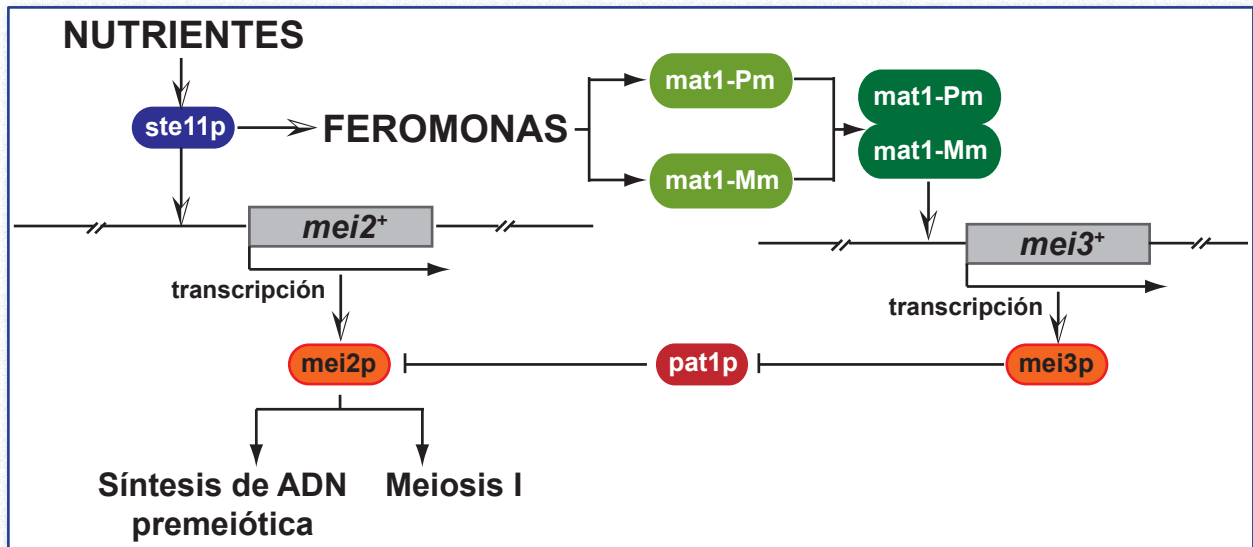


Figura 14. Inicio de meiosis. La falta de nutrientes conduce a la producción del factor de transcripción **ste11p** y la consiguiente inducción de **mei2+**. Las células únicamente sometidas a falta de nutrientes no sufren meiosis, porque **mei2p** está inhibida por **pat1p**. **ste11p** también interviene en el establecimiento del sistema de comunicación por feromonas y esto conduce a la producción de **mat1-Pm** (en las células P) y de **mat1-Mm** (en las células M). La fusión celular permite la interacción entre **mat1-Pm** y **mat1-Mm**, que activa la expresión de **mei3+**, un inhibidor de **pat1p**. La inhibición de **pat1p** permite que **mei2p** active la síntesis premeiótica de ADN y la meiosis I (adaptado de Davey, 1998).

ejerce su función en dos momentos de la meiosis: justo antes de la síntesis de ADN premeiótica y en los momentos previos de la primera división meiótica (meiosis I). Es una proteína de unión a ARN, formando un complejo con ARNs específicos para promover la meiosis I. Estas especies de ARN, llamadas **meiARN**, están poliadeniladas, pero no parecen codificar proteínas (Yamamoto, 1996). Las especies **meiARN** funcionan como un cofactor de **mei2p**, favoreciendo su importación al núcleo y permitiendo su localización intranuclear en una estructura en forma de punto.

Por su parte, **pat1p** es una proteína kinasa localizada en el núcleo celular que puede fosforilarse a sí misma, a **ste11p** y a **mei2p**. La actividad kinasa de **pat1p** impide la entrada en meiosis. La kinasa **pat1p** regula negativamente **mei2p** de dos maneras: mediante la ruta de ubiquitinación-proteólisis y mediante la ruta de **rad24p**, que reprime la expresión de **mei2+**. Por otra parte, la fosforilación de **ste11p** por **pat1p** la vuelve susceptible de ubiquitinación y proteólisis, así como permite la formación de un complejo entre **ste11p** fosforilada y **rad24p**, que impide la unión del factor de transcripción a la región 5' de **ste11+**. En cualquier caso, el punto limitante en el que **pat1p** ejerce su control sobre la progresión meiótica es la fosforilación de **mei2p** (Kitamura *et al.*, 2001; Watanabe

et al., 1997). La inhibición de **pat1p** evita la fosforilación de **mei2p**, lo que permite que la célula entre en meiosis (revisado por Davey, 1998). La proteína **mei3p** es un inhibidor de **pat1p**, ya que actúa como un pseudosustrato de dicha kinasa (Li y McLeod, 1996; Yamamoto, 2004).

(I)- 5.5. Relación entre meiosis II y esporogénesis

El proceso de formación de las esporas se inicia durante la segunda división meiótica con la síntesis de la denominada membrana de la forespora. La Figura 15 muestra de manera esquemática el proceso de la formación de las esporas. Durante la meiosis II, el SPB sufre una serie de modificaciones, convirtiéndose en una estructura compleja con varias capas citoplásmicas. Una de ellas es la placa meiótica externa. Dos componentes del SPB, **spo13p** y **spo15p**, parecen necesarios para que se lleven a cabo las modificaciones estructurales de este orgánulo. La proteína **spo15p** está asociada al SPB durante todo el ciclo biológico y es responsable de reclutar a **spo13p**, que desempeña un papel fundamental en la encapsulación de la espora, al núcleo.

En la levadura de fisión, la esporulación comienza con la formación de un compartimento membranoso conocido como membrana de la fo-

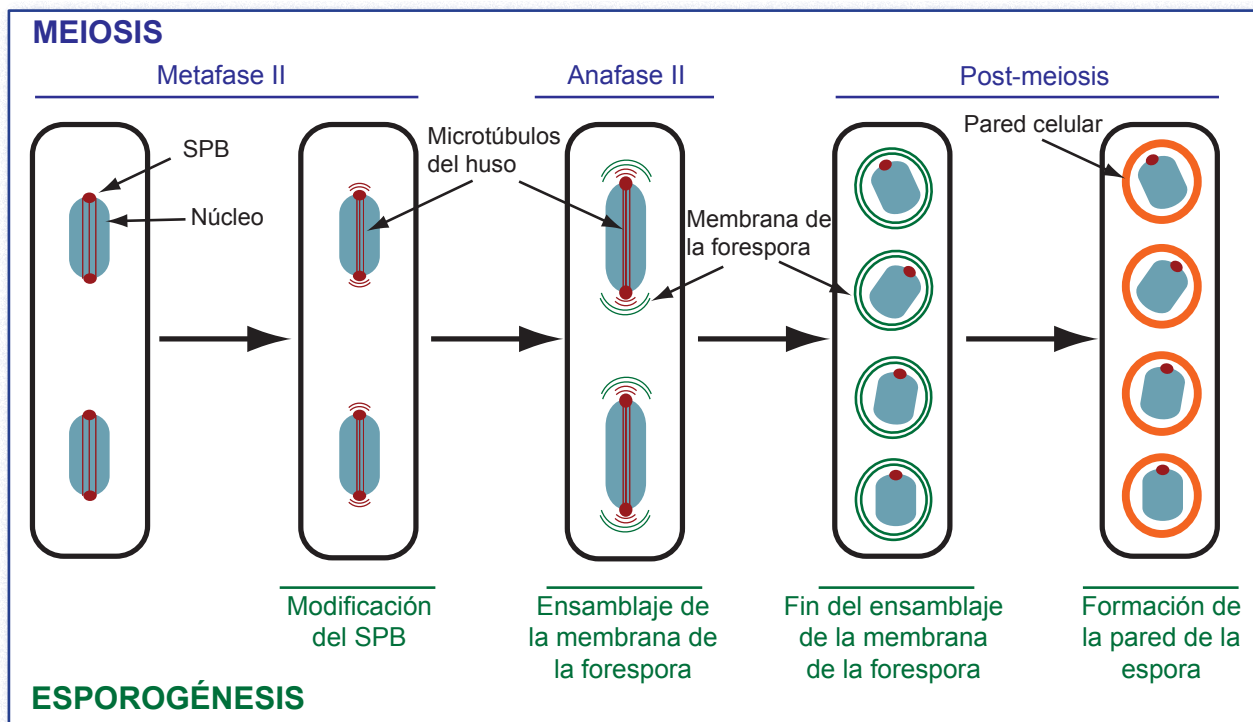


Figura 15. Representación esquemática de los procesos de meiosis II y esporogénesis (adaptado de Shimoda y Nakamura, 2004).

respora a partir del SPB modificado, que se convertirá posteriormente en la membrana plasmática de las esporas. Recientemente, Nakamura y colaboradores (2001) han descrito dos genes (*spo3⁺* y *psy1⁺*) cuyos productos se localizan en la membrana de la forespora. El gen *spo3⁺* se expresa únicamente durante la esporogénesis. Por su parte, *psy1⁺* se transcribe constitutivamente durante todo el ciclo biológico, pero su expresión aumenta de manera notable durante la meiosis I. La proteína *psy1p* es del tipo t-SNARE implicada en la interacción con proteínas v-SNARE (estas proteínas participan en la formación y fusión de vesículas). En las células vegetativas se localiza en la membrana plasmática, pero al finalizar la meiosis I se relocaliza en la membrana de la forespora, un paso clave para la formación de la membrana (Shimoda, 2004). El aparato secretor también está implicado en el ensamblaje de la membrana de la forespora. La proteína *spo14p* es responsable del tráfico de vesículas desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi mientras que *spo20p* se ha relacionado con el tráfico de vesículas desde el aparato de Golgi. Por último, *sec9p* es una proteína SNARE implicada tanto en la septación como en esporulación. Estos datos sugieren que

la formación de esporas es un proceso dinámico de fusión de membranas, que ocurre bajo el estricto control de proteínas tipo SNARE (d'Enfert *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 2005; Nakamura-Kubo *et al.*, 2003; Nakase *et al.*, 2001).

La membrana de la forespora comienza a formarse como un arco próximo al SPB modificado que crece formando una estructura que rodea cada núcleo. El crecimiento se produce por la fusión de vesículas provenientes del retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi. Finalmente, la apertura se va estrechando hasta cerrarse completamente. Así, cada una de estas estructuras membranosas a modo de sacos contiene un núcleo haploide y una pequeña cantidad de citoplasma y constituyen las pre-esporas o foresporas. La formación de la membrana de la forespora comienza generalmente durante metafase II o anafase II. Por tanto, la coordinación temporal entre la división nuclear meiótica y el ensamblaje de la membrana de la forespora es crítica. Se ha propuesto que el SPB podría ser el coordinador de ambos procesos, ya que es necesario tanto para el ensamblaje del huso meiótico como para la formación de la membrana de la forespora (revisado por Shimoda y Nakamura, 2004).

(I)- 5.6. Los componentes del SIN son necesarios para la formación de las esporas

Las proteínas del SIN, que durante el ciclo mitótico están localizadas en el SPB, también lo están durante la meiosis. Sin embargo, *sid1p* y *cdc7p* sólo llegan al SPB durante la meiosis II. Hasta dicho momento, coincidente con el inicio de la esporogénesis, el SIN permanece inactivo. Para la llegada de *sid1p* y *cdc7p* al SPB y la activación del SIN, es necesaria la disminución previa de la actividad CDK. A diferencia de lo que ocurre en mitosis, donde los SPBs que acompañan a cada núcleo hijo tienen una composición asimétrica, los SPBs de los núcleos meióticos contienen las mismas proteínas del SIN todos ellos. Los componentes de esta ruta presentes en el SPB no adquieren la forma de cuarto creciente típica de la placa meiótica externa, de modo que o bien no están asociados con esta estructura especializada del SPB, o bien lo están de manera muy limitada. Por último, la formación de esporas es defectuosa en ausencia de los componentes del SIN. Esta cascada podría ejercer su función, al menos en parte, controlando el tráfico de membranas y proteínas al sitio de división durante mitosis y/o meiosis (Krapp *et al.*, 2006).

(I)- 5.7. Construcción de la pared de la espora

Las foresporas se convierten en ascosporas maduras mediante la síntesis de la pared de la espora, proceso que ocurre por adición de materiales de pared celular en el espacio luminal de la membrana. Además, el citoplasma de las esporas se vuelve gradualmente denso a los electrones a medida que las esporas alcanzan la madurez, hasta que, finalmente, los orgánulos dejan de distinguirse (Tanaka y Hirata, 1982; Yoo *et al.*, 1973).

Existen pocos datos sobre la composición química de la pared de las esporas y su biosíntesis, aunque en los últimos tiempos se han producido avances importantes en este campo. Sin entrar en gran detalle, puesto que se tratará sobre los materiales que componen las paredes de las células vegetativas y de las esporas y su biosíntesis y

modificación en otros apartados de la Introducción de esta Memoria, se puede destacar que las esporas de *S. pombe* están compuestas por materiales electrodensos y electrotransparentes. Los compuestos transparentes a los electrones se organizan en una capa interna que contiene, principalmente, β -1,3-glucano. La capa externa es opaca a los electrones y contiene material de tipo amiloso (Fig. 16). Recientemente se ha demostrado que en las paredes de las ascosporas de *S. pombe*, los α -glucanos son más abundantes que los β -glucanos (46% y 38% de la composición total de la pared celular, aproximadamente), al contrario de lo que ocurre en las paredes de células vegetativas (García, I. *et al.*, 2006). Dentro de los α -glucanos, el más abundante es el α -1,3-glucano (sintetizado por *mok12p* y *mok13p*), pero también hay una pequeña proporción de α -1,4-glucano, sintetizado por *mok14p*. Estas tres enzimas son importantes para la formación de esporas maduras.

Adicionalmente, *bgs2⁺* codifica la subunidad catalítica de la β -glucán-sintasa durante la esporogénesis, responsable de la biosíntesis del β -1,3-glucano de la pared de la espora. El mutante *bgs2 Δ* , viable durante el ciclo vegetativo, forma cuatro compartimentos que recuerdan a esporas en el interior del asca, pero la capa interna es más delgada y oscura que en las esporas silvestres; además, las esporas mutantes no son viables (Liu *et al.*, 2000a; Martín *et al.*, 2000).

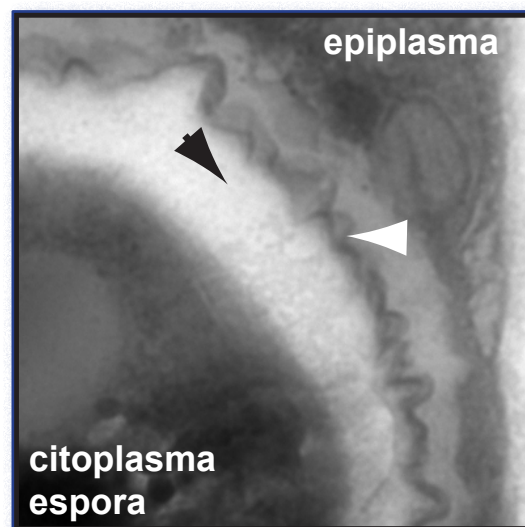


Figura 16. Pared de una ascospora silvestre de *S. pombe*. Se distingue una capa interna, transparente a los electrones (cabeza de flecha negra), y una capa externa, opaca a los electrones (cabeza de flecha blanca).

Finalmente, la pared de la espora contiene un pequeño porcentaje de quitina, quitosán u otro polímero del tipo de los glucosaminoglicanos que es esencial, bien por actuar a modo de matriz entre el resto de los componentes de la pared de la espora, o bien por formar enlaces con otros polímeros de la pared. Este polímero es sintetizado por la quitín sintasa codificada por el gen *chs1⁺*, cuya expresión aumenta durante la esporogénesis. El mutante *chs1Δ* no presenta defectos en las células vegetativas, pero sí durante la síntesis de la pared de la ascospora y la formación de las esporas está severamente afectada (Arellano *et al.*, 2000).

Además de las enzimas necesarias para la síntesis y modificación los polímeros de la pared de la espora, existen otras proteínas necesarias para su formación. Así, *meu10p* es un componente de la pared de la ascospora necesario para la localización adecuada del β -1,3-glucano y del quitosán. Su ausencia resulta en paredes amorfas, de grosor no uniforme y debilitadas (Tougan *et al.*, 2002). Por último, los mutantes *mde10Δ* son capaces de completar la meiosis y la esporulación e, incluso, de germinar. Sin embargo, un estudio detallado reveló una disposición anómala (más delgada y lisa) de la capa externa de la pared (Nakamura *et al.*, 2004).

(I)- 6. La pared celular de *S. pombe*

Como en todos los hongos, las células de *S. pombe* se encuentran rodeadas por la pared celular, una estructura compleja externa a la membrana plasmática y formada por un entramado de polisacáridos y glicoproteínas (Fig. 17). La pared celular fúngica constituye cerca del 15-25 % del peso seco de la célula y protege a la célula del estrés ambiental, como aumento o disminución de la presión osmótica. De hecho, si se elimina la pared celular mediante un tratamiento enzimático, las células se convierten en protoplastos, unas estructuras esféricas y frágiles, que pierden inmediatamente la viabilidad, salvo que se protejan en un medio estabilizado osmóticamente. El cambio de forma de las células (cilíndricas) a protoplastos (esféricos) indica que la pared celular desempe-

ña un importante papel en el mantenimiento de la morfología de las células.

En el pasado, la pared celular fue considerada como un exoesqueleto rígido e inerte que rodeaba la membrana plasmática y el citoplasma. Sin embargo, esta consideración ha cambiado conforme se han ido conociendo los mecanismos implicados en su síntesis y remodelación a lo largo del ciclo de vida, proporcionando a la célula una morfología específica durante el crecimiento vegetativo y durante procesos de diferenciación (conjugación y esporulación). Los cambios morfológicos implican una remodelación de la pared y, por tanto, incrementan el riesgo de una lisis celular. Para no comprometer la integridad celular, la célula debe de ser capaz de conjugar los procesos biosintéticos y degradativos, de modo que se alcance el equilibrio. Por tanto, la regulación espacio-temporal de la maquinaria biosintética de la pared celular debe ser muy precisa.

Por otro lado, la pared celular también se comporta como un elemento funcional, participando de forma pasiva en otros procesos celulares, como actuar de barrera que confiere impermeabilidad a determinados iones y moléculas nocivas. Adicionalmente, la pared celular también sirve de anclaje a un conjunto de proteínas extracelulares implicadas en múltiples procesos, de modo que posee una gran variedad de actividades enzimáticas que son necesarias para la toma de nutrientes, la secreción y la adhesión célula-célula (revisado en Ishiguro, 1998; Klis *et al.*, 2002; Latgé, 2007; Stratford, 1994).

Finalmente, cabe destacar que la pared celular fúngica es una estructura esencial para los hongos pero que está ausente en las células eucariotas superiores, lo que la convierte en una atractiva diana para nuevos antifúngicos. En las tres últimas décadas, la frecuencia y tipo de infecciones fúngicas ha aumentado de manera drástica por el incremento en el número de pacientes inmunocomprometidos, debido a quimioterapia, tratamientos con inmunosupresores tras un trasplante de órganos o a técnicas médicas más invasivas (revisado por Georgopapadakou y Walsh, 1996). Por tanto, un mejor conocimiento acerca

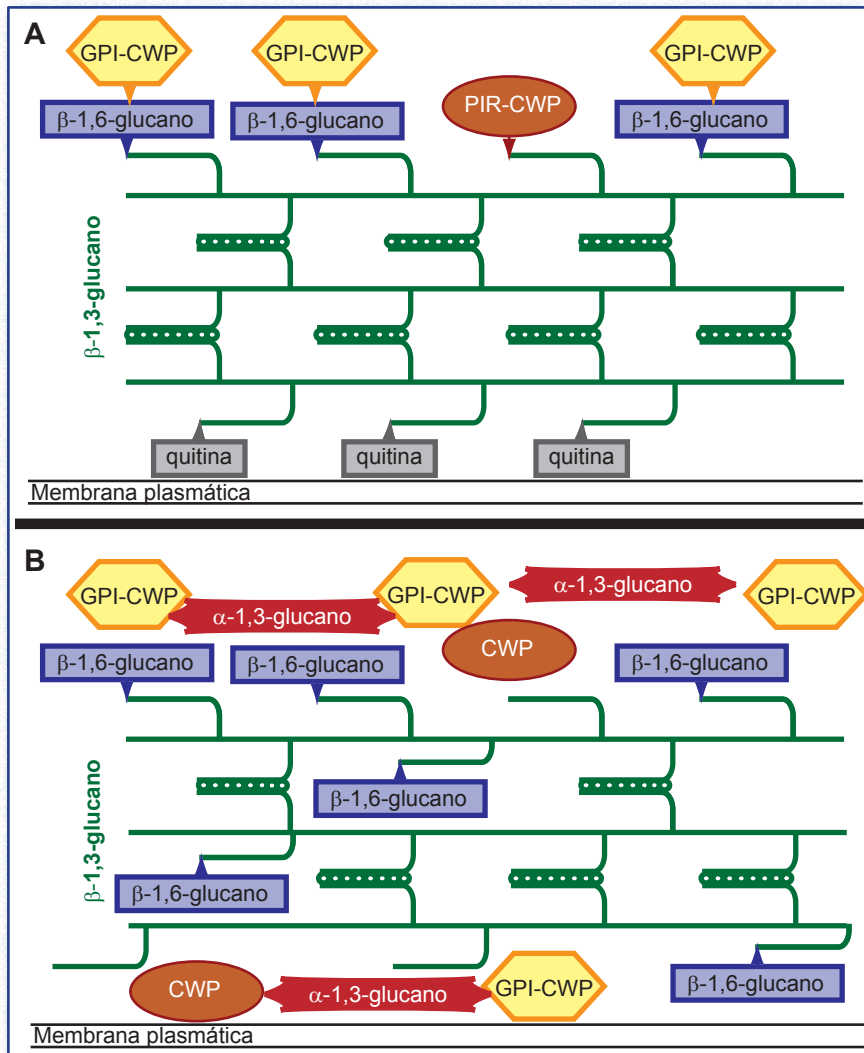


Figura 17. Modelo de la arquitectura molecular de la pared de levaduras. (A) Pared celular de *S. cerevisiae*. El esqueleto interno consiste en moléculas de β -1,3-glucano (verde) que forman una red tridimensional que rodea completamente la célula. Esta red está reforzada mediante múltiples puentes de hidrógeno entre las moléculas de β -1,3-glucano adyacentes. En el exterior, las proteínas de pared se unen a los extremos no reductores de las moléculas de β -1,3-glucano, ya sea directamente como en el caso de las PIR-CWPs (*proteins with internal repeats-cell wall proteins*, en rojo) o indirectamente a través de una molécula de β -1,6-glucano (azul) y un resto de anclaje de GPI (GPI-CWPs, en amarillo). Algunas proteínas GPI, como Cwp1p pueden unirse de ambas maneras a la pared celular. Tras la citocinesis, la capa que sirve de armazón queda reforzada por la unión de quitina (gris) a los extremos no reductores de las cadenas de β -1,3-glucano (adaptado de Smits *et al.*, 2001). (B) Modelo molecular de la pared celular de *S. pombe*. La pared celular consta de tres capas. La más interna, responsable de su rigidez, está formada por α y β -glucanos. Las capas externas contienen galactomanoproteínas, que determinan la mayoría de las propiedades de la superficie celular.

de la composición de la pared celular de hongos y levaduras, así como de su síntesis, regulación y remodelación proporcionarían nuevas dianas terapéuticas para la obtención de fármacos más eficaces y con menor número de efectos secundarios. Un ejemplo son los lipopéptidos, grupo que engloba a equinocandinas (como micafungina y anidulafungina) y pneumocandinas (caspofungina), que inhiben el complejo glucán-sintasa, por lo que son más selectivos y desarrollan menos efectos secundarios que los antimicóticos clásicos (azoles, polienos) que afectan a la integridad de la membrana plasmática (Denning, 2003; Georgopapadakou y Tkacz, 1995; Georgopapadakou y Walsh, 1996; Georgopapadakou, 1998; Liu y Balasubramanian, 2001; Odds *et al.*, 2003).

La pared celular ha sido estudiada con gran detalle en *S. cerevisiae* y su bioquímica, fisiología y genética molecular han sido ampliamente revisadas (Cid *et al.*, 1995; Fleet, 1991; Inoue *et al.*,

1996; Klis, 1994; Klis *et al.*, 2006; Latgé, 2007; Lesage y Bussey, 2006; Levin, 2005; Orlean, 1997). El conocimiento sobre de la pared celular de *S. pombe* es menos completo.

(I)- 6.1. Composición de la pared celular

Aunque existen diferencias entre las distintas especies, la pared celular fúngica representa el 15-25% del peso seco de la célula y está compuesta básicamente por polisacáridos y pequeñas cantidades de proteínas. Se han realizado numerosos ensayos empleando métodos químicos, técnicas inmunocitoquímicas o resonancia magnética nuclear (RMN) que han permitido determinar la existencia de cuatro tipos de glucanos en la pared celular de *S. pombe*: α -1,3-glucano, β -1,3-glucano lineal, β -1,3-glucano ligeramente ramificado y β -1,6-glucano altamente ramificado. Además, la pared celular contiene α -galactomanoproteínas (Fig. 17B) (Humbel *et al.*, 2001; Magnelli *et al.*, 2005;

Manners y Meyer, 1977; Sugawara *et al.*, 2003). Por su parte, la pared celular de *S. cerevisiae* está compuesta por β -1,3-glucano ramificado, β -1,6-glucano ramificado, quitina y manoproteínas (Fig. 17A) (Klis *et al.*, 2006; Lesage y Bussey, 2006; Smits *et al.*, 2001). Sin embargo, esta diferencia en la composición bioquímica de las paredes celulares de las levaduras de fisión y gemación no se corresponde con diferencias en su aspecto cuando se observan al microscopio electrónico de transmisión. De hecho, micrografías de las paredes celulares de *S. cerevisiae* y de *S. pombe* muestran que ambas mantienen una estructura trilaminar similar, con dos capas electrodensas dispuestas a los lados de una capa central transparente a los electrones. A continuación se describen los componentes de la pared celular de *S. pombe*.

(I)- 6.1.1. β -glucano

El término β -glucano engloba los polisacáridos constituidos por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β -1,3 o β -1,6, siendo el principal componente de la pared celular y responsable de

la fuerza mecánica y del mantenimiento de la forma celular (revisado por Ishiguro, 1998). Aunque tradicionalmente los β -glucanos de la pared se subdividieron en dos clases según su solubilidad en álcali (β -glucano álcali-soluble y β -glucano álcali-insoluble), la ausencia de quitina en la pared celular de *S. pombe* hace que tratamientos prolongados y exhaustivos con álcali caliente solubilicen todo el β -glucano, de modo que esta clasificación ha quedado obsoleta (Pérez y Ribas, 2004). Actualmente, los β -glucanos de *S. pombe* se clasifican en función de los enlaces establecidos entre los monómeros de glucosa, distinguiéndose tres tipos: a) β -1,3-glucano lineal, b) β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6 (46-54%), y c) β -1,6-glucano altamente ramificado (2%) (Horisberger y Rouvet-Vauthey, 1985; Humbel *et al.*, 2001).

a) β -1,3-glucano lineal: Está formado por moléculas lineales de β -1,3-D-glucano. Estudios de microscopía electrónica y de difracción de rayos X han mostrado que las cadenas lineales de glucano se disponen en forma de triple hélice, las cuales se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno (Gawronski *et al.*, 1999).

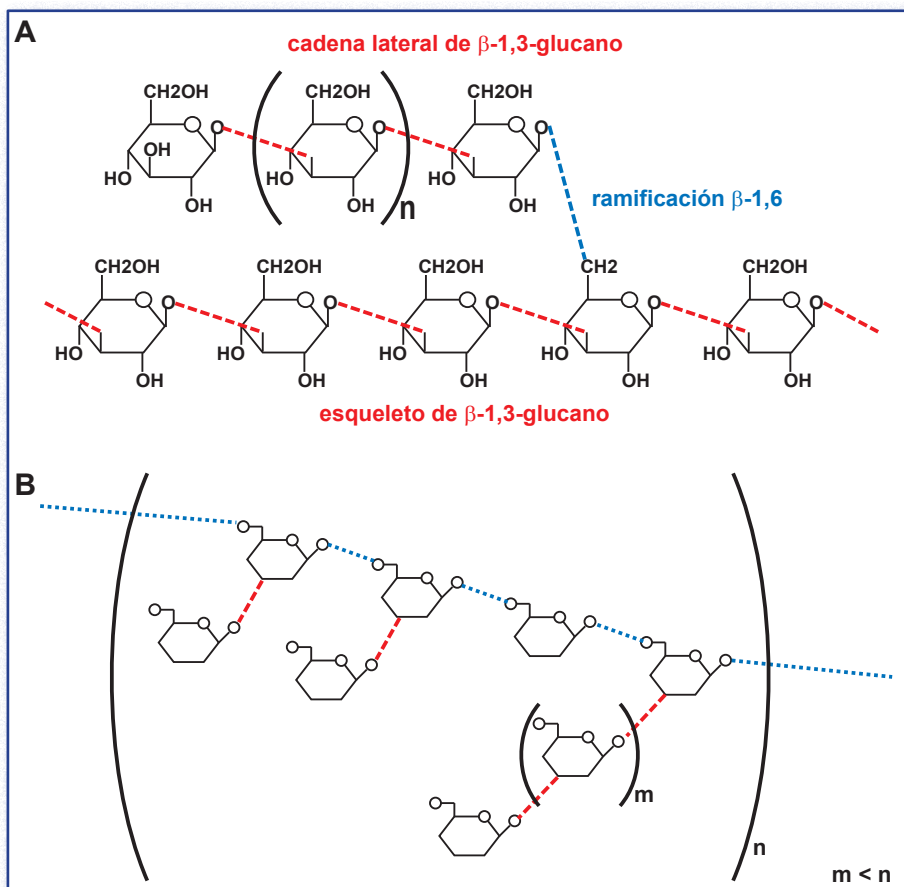


Figura 18. Representación esquemática de los β -glucanos presentes en la pared celular de *S. pombe*. (A) Estructura general del β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6. Es un homopolímero de glucosa en el cual algunas de las unidades presentan sustituciones β -1,6 que permiten la unión de una cadena lateral de β -1,3-glucano (adaptado de Gawronski *et al.*, 1999). (B) Estructura del diglucano. Se representa el "bloque básico" de construcción del diglucano o β -1,6-glucano altamente ramificado. Su repetición originaría las cadenas de este compuesto presente en las paredes *S. pombe* (adaptado de Magnelli *et al.*, 2005). En azul se señalan los enlaces β -1,6, mientras que los trazos rojos representan los enlaces β -1,3.

b) β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6 (45%-54%): Se trata de cadenas lineales en las que los residuos de glucosa (generalmente, unos 1500 monómeros) unidos por enlaces β -1,3 contienen ramificaciones laterales mediante enlaces β -1,6 (Fig. 18A). Es el más abundante y se corresponde con los glucanos álcali-solubles de la antigua clasificación. Se ha sugerido que las ramificaciones contribuyen a la resistencia a enzimas hidrolíticas. La observación de la regeneración de la pared celular en protoplastos ha demostrado que este polímero se sintetiza en primer lugar, en forma de fibrillas que se unen lateralmente formando estructuras similares a láminas de hasta 10-30 nm de anchura, las cuales, mediante las ramificaciones laterales, forman una densa red tridimensional (Osumi *et al.*, 1998). En este andamiaje se depositará más tarde la matriz formada por el α -glucano y el α -galactomanano.

c) β -1,6-glucano altamente ramificado (2%): Está constituido por unos 350 monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,6 que contienen frecuentes ramificaciones en posición 3 (hasta el 43% de los monómeros se hallaría disustituido) (Manners y Meyer, 1977). Recientemente, Sugawara y colaboradores (2004) describieron que este compuesto podría ser más abundante de lo inicialmente señalado, pudiendo constituir el 6-10% de la pared celular, y que podría tener ramificaciones β -1,3 casi en cada glucosa de la cadena principal, lo que le proporcionaría una estructura a modo de peine. Un estudio posterior, empleando enzimas hidrolíticas en lugar de tratamientos químicos, ha permitido determinar que el β -1,6-glucano altamente ramificado es más abundante de lo inicialmente estimado, y en el que el 75% de las glucosas está ramificado en la posición 3 (Fig. 18B). A este compuesto se le ha denominado *diglucano*, término que hace referencia a la presencia de dos tipos de enlaces, β -1,3 y β -1,6, ya que el nombre de β -1,6-glucano ramificado puede conducir a interpretaciones erróneas al sugerir un parecido con el β -1,6-glucano de *S. cerevisiae* o *C. albicans*. Este trabajo ha supuesto también una revisión de las cantidades relativas de cada compuesto en la pared celular; la cual contendría un 13% de α -1,3-galactomanano, 28% de α -glucano,

39% de β -1,3-glucano ramificado y 15% de diglucano.

(I)- 6.1.2. α -1,3-glucano

Aunque no existe en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, este polímero está presente en la pared celular de gran cantidad de hongos. En *S. pombe*, es un homopolímero de unas 260 unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,3 (90%) y α -1,4 (10%). La forma madura se alcanza por la repetición de cadenas lineales interconectadas, cada una de las cuales está formada por aproximadamente 120 monómeros unidos por enlaces α -1,3 y algunos residuos (en torno a 12), unidos por enlaces α -1,4 en su extremo reductor (7-9% del total) (Grün *et al.*, 2005; Manners y Meyer, 1977). El α -glucano maduro, de 260 monómeros, estaría formado por la unión de las cadenas de 120 unidades de glucosa, entre el extremo reductor que contiene enlaces α -1,4 de una cadena y el extremo no reductor de la otra cadena. Junto con el β -glucano, es responsable del mantenimiento de la morfología celular, puesto que mutantes con menor contenido de α -glucano se vuelven redondeados (Grün *et al.*, 2005). Además, el tratamiento de las células con α -glucanasas las convierte en protoplastos redondeados, hecho que no ocurre cuando se emplean β -glucanasas (Alfa *et al.*, 1993).

(I)- 6.1.3. α -galactomanano y manoproteínas

Representan el 9-12% del total de los azúcares de la pared celular de la levadura de fisión, siendo el principal polisacárido antigénico. Se trata de complejos de galactomanano asociados covalentemente con proteínas de la pared mediante N- y O-glicosilación, las cuales son liberadas en el espacio periplásmico y posteriormente atrapadas en la matriz de glucanos de la pared celular (revisado por Gemmill y Trimble, 2004; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). En el caso de las proteínas O-glicosiladas, existe una primera manosa unida a Ser/Thr, a la cual se le pueden unir hasta tres manosas mediante enlaces α -1,2. Estas estructuras de α -1,2-manosa son recubiertas en sus extremos por galactosas mediante uniones α -1,2 y ocasionalmente también por enlace α -1,3 (Fig. 19A). Las proteínas N-glicosiladas poseen un núcleo central

ñal para la unión de un anclaje GPI consta de un sitio de unión (sitio ω), un dominio espaciador de aproximadamente 8-12 aminoácidos y un dominio hidrofóbico terminal de 10-15 residuos. El sitio ω es un aminoácido de pequeño tamaño (asparagina o glicina) y normalmente se encuentra seguido por un par de aminoácidos también pequeños. La adición del motivo GPI tiene lugar en el retículo endoplásmico y las proteínas-GPI son transportadas a la superficie celular, donde algunas permanecerán unidas a la membrana plasmática mientras que otras serán procesadas para finalmente ser incorporadas en la pared celular de la levadura. En este caso, las proteínas se unen indirectamente al β -1,3-glucano a través del β -1,6-glucano. En *S. cerevisiae* se han descrito unas 60-70 proteínas con un residuo GPI, de las que 40 están destinadas a la membrana plasmática y el resto a la pared celular, mientras que el genoma de *S. pombe* contiene 33 posibles proteínas GPI (de Groot *et al.*, 2003).

(I)- 6.1.4. Quitina

La quitina es un polímero de residuos de N-acetil-glucosamina unidos por enlaces β -1,4, esencial para el mantenimiento de la pared fúngica y presente en la mayoría de los hongos. En *S. cerevisiae* representa el 3% del total de la pared celular y se localiza principalmente en el septo primario y en las cicatrices de gemación (Klis *et al.*, 2002; Valdivieso *et al.*, 2004). La quitina de la pared celular está unida covalentemente al β -1,6-glucano, mientras que la de las cicatrices está unida al β -1,3-glucano y la del septo primario parece estar libre (Cabib y Durán, 2005).

La presencia de quitina en la pared celular de *S. pombe* es un hecho controvertido (Bush *et al.*, 1974; Horisberger *et al.*, 1978; Manners y Meyer, 1977; Poole y Lloyd, 1973). Algunos autores descartan que esté presente ya que no ha podido ser detectada mediante estudios de difracción de rayos-X ni por tinción con la aglutinina de germen de trigo (WGA) unida a fluoresceína (Horisberger *et al.*, 1978). Sin embargo, se han encontrado pequeñas cantidades de glucosamina en la pared celular (Poole y Lloyd, 1973; Sietsma y Wessels, 1990). Además, se han identificado dos genes, *chs1+* y *chs2+*, que presentan identidad con las

quitín-sintasas (Arellano *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2004b). De estar presente en células vegetativas, aún se desconoce qué papel podría estar desempeñando, puesto que: a) los mutantes dobles *chs1 Δ chs2 Δ* no presentan ningún defecto durante el crecimiento mitótico (Matsuo *et al.*, 2004b), b) tampoco se observa ningún defecto en las células vegetativas del mutante cuádruple de cuatro posibles factores reguladores de la quitina (*chr1⁺-chr4⁺*) (Matsuo *et al.*, 2004a), y c) la delección del gen *chi1⁺* (SPAPB1E7.04c) que podría estar codificando una posible quitinasa en *S. pombe* no genera ningún fenotipo claro en el crecimiento y separación celular (Matsuo y colaboradores, resultados no publicados). El papel de la quitina como un componente de la pared celular de *S. pombe* es seguramente minoritario, pero el hecho de que la expresión de una quitinasa exógena en *S. pombe* induzca la elongación de las células impide excluir el papel de la quitina en la morfología celular (Shimono *et al.*, 2002). El único momento en el que la quitina parece estar presente es en las ascosporas y podría corresponder a quitosán, su forma desacetilada (Arellano *et al.*, 2000). Un estudio más reciente ha demostrado que la quitín-desacetilasa *cda1⁺* es necesaria para una correcta formación de esporas, igual que lo es la quitín-desacetilasa presente en *S. cerevisiae* (Matsuo *et al.*, 2005).

(I)- 6.2. Arquitectura de la pared celular de *S. pombe*

En micrografías electrónicas, se observa la pared celular de *S. pombe* como una estructura trilaminar, con una capa electrodensa exterior formada por galactomanoproteínas, una capa intermedia más transparente a los electrones y otra capa densa próxima a la membrana plasmática (Osumi *et al.*, 1998) (Fig. 20). Ya en 1995, la microscopía electrónica de transmisión demostró que las paredes de *S. pombe* contenían un componente fibrilar y un componente amorfo, ambos de tipo glucano (Kopecká *et al.*, 1995). La distribución de ambos no es exactamente igual, ya que el glucano fibrilar ocupa posiciones más cercanas a la membrana plasmática mientras que el glucano amorfo está por toda la pared. Estos autores postularon que el

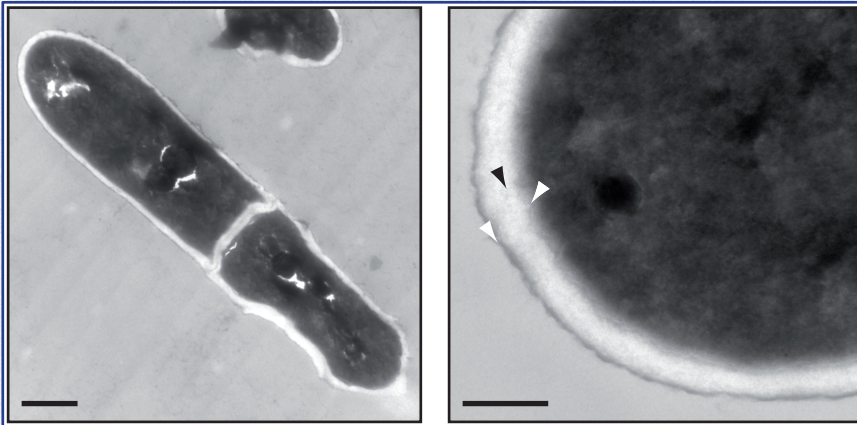


Figura 20. Ultraestructura de la pared celular de levaduras. (A) Imagen obtenida con el microscopio electrónico de transmisión de la pared celular de una célula silvestre de *S. pombe* durante el crecimiento vegetativo. Barra de escala, 250 nm. (B) Detalle, correspondiente a uno de los polos celulares. Barra de escala, 1000 nm. Se aprecian dos capas electrodensas (señaladas con cabezas de flechas blancas) y una interna transparente a los electrones (cabeza de flecha negra).

glucano amorfo probablemente estaría compuesto por β -1,3-glucano y β -1,6-glucano, y que actuaría como enlace entre el α -galactomanano de la zona más externa de la pared celular y el glucano fibrilar, el cual estaría compuesto tanto por β -1,3-glucano como α -1,3-glucano. Un estudio más reciente llevado a cabo por Humbel y colaboradores (2001) confirmó gran parte de los resultados del anterior trabajo, poniendo de manifiesto que la capa menos densa a los electrones no es completamente homogénea, sino que muestra unas delgadas estructuras filamentosas y ramificadas, a modo de radios que emanan desde la membrana plasmática hacia la capa externa electrodensa, constituida por galactomananos.

Estudios de microscopía electrónica empleando técnicas inmunocitoquímicas con anticuerpos marcados con oro coloidal específicos frente al α -1,3-glucano y los diferentes tipos de β -glucano han permitido conocer la localización exacta de estos componentes dentro de la pared celular (Humbel *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003) (Fig. 21A-D):

a) **β -1,3-glucano lineal**: Únicamente está presente en el septo primario. Este compuesto se detecta tan pronto comienza la síntesis del septo y puede observarse hasta que se deposita la capa de α -galactomanano entre las dos células hijas.

b) **β -1,3-glucano ramificado**: Se encuentra distribuido por toda la pared celular, aunque principalmente se concentra en la capa menos densa a los electrones, y en ambos septos. En algunas ocasiones se ha observado que los anticuerpos empleados se disponen en forma de estructuras lineales que van desde la capa interna hacia la

capa de α -galactomanano. El β -1,3-glucano ramificado está también presente en el septo, pero, a diferencia del anterior, no desaparece una vez terminada la síntesis del mismo.

c) **β -1,6-glucano ramificado (diglucano)**: Se dispone por toda la pared celular en la capa menos densa a los electrones, pero siempre más cercano a la capa externa de α -galactomanano que a la membrana plasmática. También está presente en el septo secundario, permaneciendo en esta localización incluso una vez completada la síntesis del septo. Esta disposición concuerda con el papel que se le ha asignado: el de conectar las α -galactomanoproteínas con los polisacáridos de la pared celular (Sugawara *et al.*, 2004).

d) **α -1,3-glucano**: El α -1,3-glucano se localiza preferentemente en la zona colindante a la membrana plasmática (Sugawara *et al.*, 2004).

e) **α -galactomanano**: Estudios con lectinas han permitido localizar este polisacárido en la superficie más externa y en las proximidades de la membrana plasmática, coincidente con las capas electrodensas. Está conectado a proteínas de pared celular mostrando una estructura a modo de pelo, lo cual apoya la hipótesis de que se trata de una estructura altamente flexible (Sugawara *et al.*, 2004).

En *S. cerevisiae*, las moléculas de β -1,6-glucano están situadas por fuera del armazón o andamiaje de la pared celular (constituido por quitina y β -1,3-glucano), conectándolo con las GPI-CWPs. Algunos trabajos, como el realizado por Kapteyn y colaboradores (1996) mostraron que el tratamiento con β -1,6-glucanasas libera proteínas de

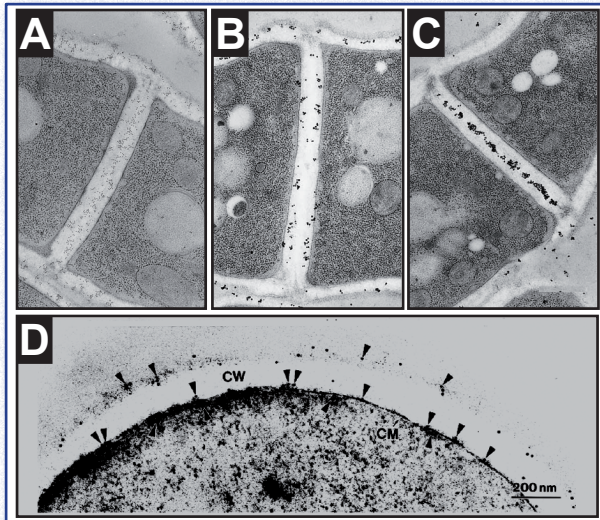


Figura 21. Inmunolocalización de los glucanos en la pared celular de *S. pombe*. (A) El β -1,3-glucano ramificado se distribuye por la capa menos densa a los electrones. (B) El β -1,6-glucano altamente ramificado está presente en el septo secundario y en la zona más externa de la capa transparente a los electrones. (C) El β -1,3-glucano lineal está localizado exclusivamente en el septo primario. (D) El α -1,3-glucano se localiza preferentemente en la zona colindante a la membrana plasmática (fotografías tomadas de Humbel *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003).

pared celular, lo que refuerza esta hipótesis. Sin embargo, otros investigadores han mostrado que el tratamiento de las paredes de *S. pombe* con estas mismas enzimas no consigue liberar ninguna proteína (Blad *et al.*, 2001). Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que el β -1,6-glucano de la levadura de fisión está mucho más ramificado que el de la levadura de gemación, de modo que quizás no puede ser digerido por las β -1,6-glucanasas empleadas. Los datos publicados por Sugawara y colaboradores (2004) apuntan a que el β -1,6-glucano altamente ramificado presente en *S. pombe* se encuentra por fuera del almacén de α -1,3-glucano y β -1,3-glucano ramificado, y conectado a las proteínas de la pared, de manera análoga a lo descrito para *S. cerevisiae*.

(I)- 6.3. Biogénesis de la pared celular

En los últimos tiempos se ha producido un gran avance no sólo en la descripción de los elementos estructurales que componen la pared celular, sino también en el conocimiento de las enzimas implicadas en su biosíntesis y de las rutas de señalización que regulan estas actividades. A pesar de ello, aún quedan por identificar algunas de las enzimas biosintéticas y la manera en que *S. pom-*

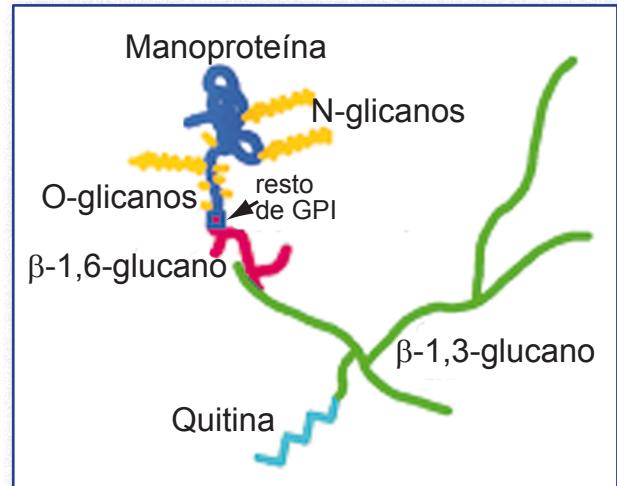


Figura 22. Posible organización del módulo unitario constituyente de la pared celular de *S. cerevisiae*. Los distintos componentes se hallan señalados con distintos colores. Las manoproteínas están coloreadas de azul, mientras que los N- y O-oligosacáridos se muestran en amarillo. Se han dibujado únicamente algunas de las ramificaciones de los glucanos. La quitina también puede estar unida al β -1,6-glucano (tomado de Lipke y Ovalle, 1998).

be integra estas señales para la extensión y ensamblaje de la pared.

Aunque se dispone de más datos sobre todos estos procesos en *S. cerevisiae*, tampoco se ha descifrado aún completamente el proceso de ensamblaje de la pared celular en dicha levadura. Sin embargo, se ha propuesto un modelo para la arquitectura de la pared, en el que los componentes estarían unidos covalentemente formando módulos unitarios que se ensamblarían entre sí para constituir la pared celular. Cada uno de los módulos unitarios estaría constituido por una cadena de β -1,3-glucano con 40-50 puntos de ramificación e incluiría una o dos moléculas de β -1,6-glucano y manoproteínas. Algunos de estos módulos tendrían cadenas de quitina unidas al β -1,6-glucano o al β -1,3-glucano directamente (Fig. 22). Los módulos estarían asociados por uniones no covalentes en la capa de glucano y quitina y por enlaces covalentes en la capa de manoproteínas (revisado por Lipke y Ovalle, 1998). Por el contrario, aún no se ha llegado a comprender cómo los distintos componentes de la pared de *S. pombe* se organizan en una unidad funcional tras ser sintetizados.

En *S. cerevisiae* se ha señalado que el primero de los componentes de la pared celular que se sintetiza es el β -1,3-glucano, tras lo cual sigue la adición del β -1,6-glucano y posteriormente las

manoproteínas. La quitina es el último polímero en acoplarse al β -1,3-glucano (Roh *et al.*, 2002). La microscopía electrónica de barrido ha permitido llevar a cabo estudios de regeneración de la pared celular en protoplastos de *S. pombe* que han revelado que la pared celular se genera creando una red de fibras de β -1,3-glucano que se unen lateralmente formando cintas o láminas. Dichas láminas pueden agruparse posteriormente en forma de haces entrelazados. Los huecos son rellenos por partículas amorfas de α -galactomanano y, posteriormente, de α -glucano y glicoproteínas (Kobori *et al.*, 1989; Osumi *et al.*, 1998). La utilización de un inhibidor específico de la síntesis del β -1,3-glucano mostró que es el principal componente de la estructura fibrilar observada en los protoplastos. Del mismo modo, el α -1,3-glucano también desempeña una importante función en la generación de estas estructuras fibrilares, puesto que mutantes defectuosos en la biosíntesis del α -1,3-glucano son incapaces de desarrollar los haces durante la regeneración de los protoplastos, aunque sí llegan a formar fibrillas (Horisberger y Rouvet-Vauthay, 1985; Konomi *et al.*, 2003).

(I)- 6.3.1. Biosíntesis del β -1,3-glucano

La actividad β -glucán-sintasa (E.C.2.4.1.34, UDP-glucosa:(1,3)- β -D-glucano-3- β -glucosil-transferasa) (β GS) es la encargada de la síntesis de cadenas de β -1,3-glucano a partir de monómeros de UDP-glucosa. El sistema de síntesis es muy similar en *S. pombe* y en *S. cerevisiae* (revisado por Cabib *et al.*, 1998; Douglas, 2001; Latgé, 2007).

Se han identificado genes cuya mutación, delección o sobreexpresión causa defectos en la pared celular en *S. pombe*, algunos de los cuales, como *cwg2⁺*, *cps1⁺* o *rho1⁺*, están directamente implicados en la síntesis de β -1,3-glucano. El complejo β GS consta, al menos, de una subunidad catalítica unida a la membrana plasmática y una subunidad soluble reguladora capaz de unir GTP. En *S. cerevisiae*, el primer gen de estas características aislado fue *FKS1/GSC1*. Mediante una técnica conocida como atrapamiento de producto (*product entrapment*), se comprobó que este gen codificaba la subunidad catalítica de la β GS (revisado en

Ishiguro, 1998). El hecho de que la cepa *fks1 Δ* no fuera letal y presentara sensibilidad a papulacandina indicaba que debía de existir un segundo gen, que fue denominado *FKS2*, cuya proteína presenta un 88% de identidad con Fks1p (Mazur *et al.*, 1995). Durante la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*, se identificó un tercer gen que se denominó *FKS3* y que presenta un 55% de identidad con Fks1p y Fks2p (Chervitz *et al.*, 1998). *FKS3* no es un gen esencial. Su delección no produce ningún efecto en la célula y no muestra interacciones genéticas con *FKS1* ni *FKS2* (Winzeler *et al.*, 1999). *FKS1* y *FKS2* presentan distintos patrones de expresión. El primero se expresa durante el crecimiento en glucosa y presenta variaciones periódicas a lo largo del ciclo celular, mientras que la transcripción de *FKS2* se ve inducida durante el crecimiento en medios donde la fuente de carbono es escasa o en presencia de altas concentraciones extracelulares de Ca^{2+} y feromonas. En cepas *fks1 Δ* , Fks2p se vuelve esencial para la supervivencia celular (revisado por Ishiguro, 1998).

En *S. pombe*, se han identificado cuatro genes que podrían codificar subunidades catalíticas de este complejo: *bgs1⁺/cps1⁺/drc1⁺*, *bgs2⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺/cwg1⁺/orb11⁺*. La proteína bgs1p presenta un 69% de identidad con las proteínas Fks, siendo esencial para la viabilidad de las células vegetativas, pero no para la germinación de las ascosporas (Cortés *et al.*, 2002; Cortés, 2005; Liu *et al.*, 1999). La subunidad bgs1p es una proteína integral de membrana que se localiza en el septo durante la citoquinesis formando un anillo y también en los polos, en las proyecciones de conjugación y en las ascosporas (Cortés *et al.*, 2002; Cortés, 2005; Liu *et al.*, 2002).

La secuenciación del genoma permitió la identificación de *bgs2⁺* y *bgs4⁺*. La proteína bgs2p es la subunidad catalítica de la β GS durante el proceso de esporulación. La expresión de *bgs2⁺* se induce al final del proceso de esporulación. Las cepas *bgs2 Δ* no presentan ningún defecto durante el crecimiento vegetativo, pero las ascas formadas a partir del diploide homocigótico *bgs2 Δ /bgs2 Δ* presentan un grave defecto en la maduración de las ascosporas y una disminución de la actividad β GS detectada durante la esporulación. Las pa-

redes de las esporas mutantes poseen una pared más delgada, sobre todo en la capa más clara a los electrones, que está supuestamente constituida por β -1,3-glucano (Martín *et al.*, 2000; Martín, 2002).

La obtención de mutantes hipersensibles a equinocandina (mutantes *ehs*) permitió la clonación de *bgs3⁺* como supresor del fenotipo de hipersensibilidad del mutante *ehs2-1* (Carnero *et al.*, 2000). El gen *bgs3⁺* es esencial para la viabilidad, pero no para la germinación de las esporas; esta letalidad no se suprime con un estabilizador osmótico. La represión de la expresión de *bgs3⁺* produce un fenotipo de células hinchadas y redondeadas, que finalmente dejan de crecer, lo que sugiere que *bgs3p* está relacionada con la supervivencia de células vegetativas, así como con el mantenimiento de la viabilidad celular. La pared celular se aprecia más gruesa al microscopio y la cuantificación de los polisacáridos que la constituyen muestra un aumento global de pared, con una ligera reducción de la proporción de β -glucano y un notable aumento de la de α -glucano. El alelo *bgs3⁺* se expresa de manera constante a lo largo del ciclo celular y *bgs3p* se localiza en los polos de crecimiento durante interfase y en el septo de división durante citoquinesis (Martín, 2002; Martín *et al.*, 2003).

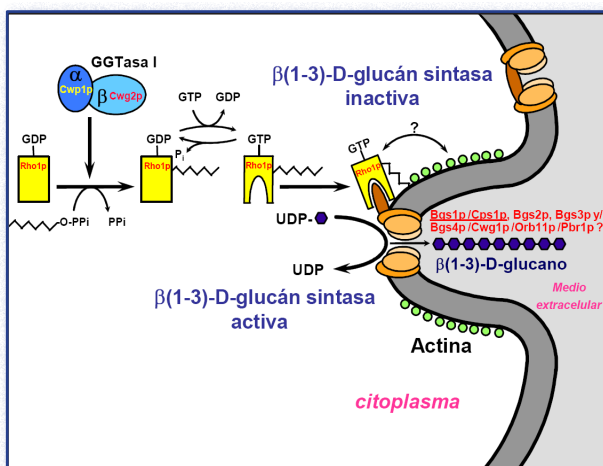


Figura 23. Modelo de activación de β GS. El complejo enzimático está formado, al menos, por dos subunidades y se localiza en la cara interna de la membrana plasmática. Consta de una subunidad reguladora soluble (*rho1p*) y una subunidad catalítica integrada en la membrana plasmática (las proteínas *bgs1p* y *bgs2p*). La GTPasa *rho1p* debe ser prenilada por el heterodímero geranil-transferasa de tipo I, formada por *cwp1p* y *cwp2p*, para poder anclarse a la membrana plasmática (adaptado de Drgonova *et al.*, 1999).

El gen *bgs4⁺/cwg1⁺/orb11⁺* es esencial para la viabilidad celular durante la citoquinesis y el crecimiento polarizado. Las esporas carentes de *bgs4⁺* son capaces de germinar, pero se lisan antes de completar la primera división celular. La proteína *bgs4p* parece estar relacionada con la síntesis del septo secundario (Cortés *et al.*, 2005).

El análisis de mutantes termosensibles con actividad β GS reducida, mostró que el mutante *cwg2-1* está afectado en el componente regulador de la β GS. La clonación del gen *cwg2⁺* reveló que codifica la subunidad β de la geranil-transferasa de tipo I (Díaz *et al.*, 1993). Esta enzima transfiere un grupo prenilo a la caja CaaX (donde "a" es un aminoácido alifático), localizada en el extremo carboxilo de las GTPasas de la familia Rho. En el caso de la β GS de *S. pombe*, la GTPasa reguladora es la proteína *rho1p*. A su vez, la actividad de esta GTPasa está regulada por otras proteínas intercambiadoras de GTP (revisado por Arellano *et al.*, 1996; Cabib *et al.*, 1998; Cortés, 2005; Drgonova *et al.*, 1996; García, P. *et al.*, 2006; Park y Bi, 2007). En la Figura 23 se muestra un esquema de las proteínas de *S. pombe* que están implicadas en la biosíntesis del β -1,3-glucano (Arellano *et al.*, 1999; Cabib *et al.*, 1998).

(I)- 6.3.2. Biosíntesis del β -1,6-glucano

Existe poca información sobre la síntesis de β -1,6 glucano, que se ha obtenido fundamentalmente a través de dos estrategias distintas en *S. cerevisiae*. Una basada en la resistencia a la toxina *killer K1*, que es una proteína que se une específicamente al β -1,6-glucano (Al-Aidroos y Bussey, 1978; Boone *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993), mientras que la segunda se basó en la hipersensibilidad a calcoflúor, lo que permite identificar mutantes con defectos en la pared celular (Lussier *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1994). Estas búsquedas han permitido la identificación de genes *KRE* (*killer toxin resistant*), *CWH* (*calcofluor white hypersensitive*) y *ECM* (*extracellular mutant*), cuyos productos se localizan a lo largo de la ruta de secreción y la superficie celular, lo que sugiere que tanto eventos intracelulares como de superficie son necesarios para la biosíntesis de este polímero. Así, en el RE se han identificado los productos de los genes

KRE5, *CWH41/GLS1*, *ROT2/GLS2* y *CNE1*; en el aparato de Golgi se encuentran las proteínas Kre6p y Skn1p, homólogas entre sí; y, por último, en la superficie celular se localizan Kre1p y Kre9p (Shahinian y Bussey, 2000).

No está claro dónde ocurre la síntesis del β -1,6-glucano, ya que no ha sido posible encontrar una β -1,6-glucán-sintasa en la membrana y tampoco se detecta este polímero en el interior celular. Esto, unido al hecho de que se han encontrado genes implicados en la síntesis de β -1,6-glucano a lo largo de toda la ruta secretora, sugiere la posibilidad de que se necesite una estructura de tipo receptor en el RE y aparato de Golgi, que se utilizará como precursor o será unida a β -1,6-glucano en la superficie celular (Shahinian y Bussey, 2000). En *S. pombe*, este polímero ha sido detectado en el aparato de Golgi (Humbel *et al.*, 2001) y también se han identificado genes homólogos a los implicados en la síntesis de β -1,6-glucano en *S. cerevisiae* (Durán y Pérez, 2004). Hay que destacar que recientemente se ha descrito un ensayo para detectar la actividad β -1,6-glucán-sintasa *in vitro*, lo que facilitará identificar el gen o genes que codifican esta actividad (Vink *et al.*, 2004).

(I)- 6.3.3. Biosíntesis de α -glucano

Dos grupos de trabajo independientes llegaron a la conclusión de que el gen *ags1⁺/mok1⁺* era el principal responsable de la síntesis de α -1,3-glucano, al menos en las células vegetativas (Hochstenbach *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999). Hochstenbach y colaboradores obtuvieron mutantes termosensibles que presentaban un fenotipo de lisis y disminución del contenido de α -1,3-glucano a la temperatura restrictiva. Por su parte, el grupo de Katayama estaba analizando mutantes para identificar genes que actuaran en la ruta de la proteína quinasa C (PKC) en *S. pombe*; uno de ellos mostraba lisis y menores cantidades de α -glucano en la pared. Ambos trabajos describieron que *ags1⁺/mok1⁺* codifica una enzima de 272 kDa y 2.410 aminoácidos que se distribuyen en 5 dominios estructurales. El primero de ellos es la secuencia señal, que dirige la proteína hacia la ruta de secreción. A continuación, existe un dominio extracelular (dominio TGL) de aproximadamente

1.000 aa que posee homología con las α -amilasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -1,4 o α -1,6. El tercer dominio es una corta región transmembrana, de unos 20 aa, que conecta los dominios extracelular e intracelular. Tras él, existe un dominio intracelular (dominio SYN) de aproximadamente 1.000 aa, que presenta una homología significativa con las glicógeno-sintasas bacterianas y las almidón-sintasas vegetales. El quinto y último dominio estaría constituido por los 400 aa del extremo carboxilo, que contiene 12 motivos que atraviesan la membrana plasmática. La proteína mok1p se localiza en las regiones de crecimiento activo (polos y septo) en un proceso dependiente de la actina, aunque no colocaliza con ella (Katayama *et al.*, 1999; Konomi *et al.*, 2003).

A la luz de sus resultados, ambos grupos propusieron que *ags1p* sería la responsable de la síntesis del α -glucano. El mecanismo de acción sería el siguiente: el dominio sintasa intracelular produciría homopolímeros de α -1,3-glucano. Estos polímeros deben ser transportados a través de la membrana, y quizás ésta sea la función del dominio transmembrana, que formaría un poro. Una vez en el exterior, el dominio extracelular enlazaría los polímeros de α -glucano recién formados con otros componentes de la pared celular. Por tanto, *ags1p* podría funcionar como una maquinaria completa de síntesis-transporte-remodelación de α -glucano (Hochstenbach *et al.*, 1998). Este mecanismo de acción coincide con la estructura de las moléculas de α -1,3-glucano presentes en la pared celular (Grün *et al.*, 2005). Un estudio reciente (Vos *et al.*, 2007) ha arrojado luz sobre la síntesis de la pequeña proporción de α -1,4-glucano presente en la pared celular. Este trabajo demuestra que el dominio SYN es capaz de sintetizar α -1,4-glucano, de modo que la ausencia de *ags1p* o mutaciones en este dominio disminuyen la cantidad de este polímero, mientras que la sobreexpresión de la enzima completa o únicamente del dominio SYN provocan la acumulación de α -1,4-glucano. Estos datos no permiten descartar la posibilidad de que el dominio SYN sea capaz de desempeñar funciones de polimerización α -1,3 y α -1,4. El dominio TGL extracelular tampoco parece un buen candidato para la síntesis de cadenas α -

1,3. Por tanto, Vos y colaboradores proponen que una enzima aún no identificada sería la responsable de la síntesis de la fracción α -1,3-glucano. Si su hipótesis resultara cierta, debería redefinirse el modelo de mecanismo de acción propuesto por los grupos de Hochstenbach y de Katayama para *ags1p*. En el nuevo modelo, los oligosacáridos de α -1,4-glucano (de aproximadamente 12-14 glucosas) presentes en el α -glucano de la pared celular estarían producidos por el dominio SYN de *ags1p/mok1p*. Estos oligosacáridos de α -1,4-glucano servirían de cebadores para la elongación llevada a cabo por esta hipotética y desconocida α -1,3-glucán-sintasa. Este bloque estructural sería transportado al otro lado de la membrana a través del dominio transmembrana en forma de poro de *ags1p/mok1p*. Una vez en la cara extracelular de la membrana, el dominio TGL de esta enzima lo uniría con otro bloque estructural, formándose así el α -glucano maduro.

En el genoma de *S. pombe* existen otros cuatro genes que codifican proteínas con una alta similitud (55-70%) a *mok1⁺*. Fueron denominados *mok11⁺*, *mok12⁺*, *mok13⁺* y *mok14⁺*. Todos los productos codificados poseen la misma estructura de *mok1p*, salvo *mok14p*, que no presenta el dominio similar a α -amilasas. Ninguno de ellos es esencial durante el crecimiento vegetativo, pero están implicados en esporogénesis. Dichos genes se expresan de manera secuencial durante el proceso de esporulación: primero, *mok11⁺* y *mok13⁺*, luego, *mok12⁺* y *mok14⁺*. No ha sido posible aún dilucidar la función de la proteína *mok11p*, pero sí la de las otras tres enzimas. La proteína *mok12p* parece participar directamente en la síntesis del α -1,3-glucano de la pared de la espora, localizándose en la periferia de las ascosporas. Se ha propuesto que desempeña su papel al final del proceso de esporulación, cuando se produce el ensamblaje y maduración de la pared de las esporas. La enzima *mok13p* se localiza en la membrana de la forespora y parece que va guiando a la misma para su cierre. Dado la diferencia de los fenotipos entre *mok12 Δ* y *mok13 Δ* , se ha propuesto que ambas enzimas sintetizarían diferentes polímeros, pero ambos con enlaces α -1,3. Por último, *mok14p* es la responsable de la síntesis de α -1,4-glucano,

el polímero de naturaleza amiloidea responsable de la coloración parda que adquieren las esporas cuando se exponen a vapores de yodo (García, 2006; García, I. *et al.*, 2006).

(I)- 6.3.4. Biosíntesis de α -galactomano-proteínas

S. pombe secreta proteínas altamente galactosiladas al espacio periplásmico y las incorpora en su pared celular. La O-glicosilación comienza por la adición de una α -manosa al motivo S/T, seguida por la unión de hasta tres α -1,2-manosas más. En *S. cerevisiae*, la primera manosa es añadida por proteínas manosil-transferasas (PMT) en el RE empleando dolicol-P-manosa (Dol-P-Man) como donador de manosa. El resto de O-manosas se añade en el aparato de Golgi empleando como donador GDP-Man. Las estructuras de α -1,2-manosas suelen presentarse recubiertas de α -1,2-galactosas proporcionadas por *gma12p* o *gth1p*, pudiendo también contener la penúltima galactosa unida por un enlace α -1,3, que también está presente en los N-glicanos de *S. pombe* (revisado por Gemmill y Trimble, 2004; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). En *S. pombe* se ha descrito la caracterización de las O-manosil-transferasas (genes *oma⁺*) implicadas en el proceso de O-manosilación y se ha demostrado que la O-manosilación es esencial para la integridad de la pared celular y la viabilidad, así como para la septación (Willer *et al.*, 2005).

Los primeros pasos de N-glicosilación están muy conservados en todos los eucariotas, incluido *S. pombe*, así como la mayoría de los genes implicados. La glicosilación comienza en el RE y continúa a través de los compartimentos del aparato de Golgi. En el primer paso, se sintetiza en la cara citoplásmica de la membrana del RE un oligosacárido unido a dolicol-pirofosfato (Dolicol-PP), que consiste en dos N-acetil-glucosaminas (GlcNAc) y cinco manosas (Man). Este precursor es translocado al lumen del RE, donde se añaden cuatro manosas y tres glucosas (Glc) más. El oligosacárido resultante, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, es transferido a la proteína naciente que posee un sitio aceptor (Asn-X-Ser/Thr) gracias a la acción de un complejo oligosacaril-transferasa. Tres glucosas y una manosa son posteriormente elimina-

das por α -glucosidasas y α -manosidasas en el RE para producir $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, que recibe el nombre de núcleo de N-oligosacárido (en inglés, *N-linked core oligosaccharide*). La proteína *gmd3p* está implicada en la síntesis de este núcleo (Umeda *et al.*, 2000). La proteína en formación, ya con el núcleo de N-oligosacárido, es transportada al aparato de Golgi donde es modificada de diferentes modos, dependiendo del organismo. En las levaduras, se le une una cadena externa de manosas muy grande. Este proceso de elongación es común a la mayoría de hongos y la manosil-transferasa iniciadora de este proceso, *och1p*, ha sido clonada y caracterizada en *S. pombe*. En la levadura de fisión, los N-oligosacáridos contienen grandes cantidades de galactosa además de manosa (revisado por Gemmill y Trimble, 2004; Umeda *et al.*, 2000).

(I)- 6.3.5. Biosíntesis de quitina

En *S. cerevisiae* se han descrito tres actividades quitín-sintasas con distinto significado biológico. La actividad quitín-sintasa I (QSI), codificada por *CHS1*, es una actividad reparadora, importante para contrarrestar la acción de la quitinasa durante la separación celular e impedir la lisis celular (Cabib *et al.*, 1992). La actividad quitín-sintasa II (QSII), codificada por *CHS2*, es responsable de sintetizar la quitina del septo primario. El gen *CHS3* codifica la actividad quitín-sintasa III (QSIII), implicada en el inicio de la gemación, ya que forma un anillo de quitina en la zona donde se desarrollará la yema, y en la deposición de la quitina de las paredes laterales de la célula (Cabib *et al.*, 1997; Chuang y Schekman, 1996; revisado por Jiménez Ortigosa, 2008; Roncero, 2002; Shaw *et al.*, 1991).

A pesar de que la presencia de quitina en *S. pombe* es un dato controvertido, existen dos genes homólogos a las quitín-sintasas, *chs1+* y *chs2+* (Arellano *et al.*, 2000; Martín-García *et al.*, 2003). La delección de *chs2+* no es letal, pero sí su sobreexpresión, que provoca graves defectos en la formación del septo. Su expresión aumenta antes de la formación del septo. La proteína *chs2p* se localiza en el margen interior del septo creciente, colocalizando con el anillo contráctil. A pesar de su homología con otras quitín-sintasas, no presenta la secuencia consenso QRRRW y

carece de varios aa esenciales para la actividad QSII (Martín-García *et al.*, 2003). A pesar de ello, *chs2+* es capaz de complementar el fenotipo de una cepa *chs1 chs2 chs3* de *S. cerevisiae* (Matsuo *et al.*, 2004b) y su sobreexpresión aumenta la actividad quitín-sintasa en células vegetativas de *S. pombe* (Martín-García *et al.*, 2003; Matsuo *et al.*, 2004b). Recientemente, se le ha atribuido un papel en el mantenimiento o la estabilización del anillo contráctil, colaborando con otras proteínas del mismo (Martín-García y Valdivieso, 2006). Por su parte, y como se indicó en apartados anteriores, la delección o sobreexpresión del gen *chs1+* no produce ningún fenotipo durante el crecimiento vegetativo, pero es el responsable de la síntesis de quitina presente en las ascosporas (Arellano *et al.*, 2000).

Asimismo, *S. pombe* posee un gen, *cda1+*, que codifica una proteína con homología a las quitín-desacetilasas *ScCda1p* y *ScCda2p*. Estas enzimas se encargan de transformar la quitina en quitosán, componente de la segunda capa (empezando desde el exterior) de la pared de las ascosporas (Briza *et al.*, 1988). La proteína *cda1p*, de 320 aa, contiene el dominio polisacárido-desacetilasa. Los diploides *cda1Δ/cda1Δ* forman un 46% de ascas normales, con cuatro esporas, y un 3% de ascas con una, dos o tres esporas. *cda1+* aumenta su expresión durante la esporulación, siendo necesario para una correcta esporulación, aunque el requerimiento de *cda1+* es menor que el de *chs1+* (Matsuo *et al.*, 2005).

Por último, se han analizado los genes de cuatro posibles factores reguladores (*chr1p-chr4p*) de la quitín-sintasa, pero su efecto sobre la misma parece muy limitado (Matsuo *et al.*, 2004a).

(I)- 6.4. Remodelación de la pared celular

El ensamblaje de los componentes secretados en una estructura compleja ocurre, presumiblemente, mediante interacción entre distintas fuerzas físicas, mecánicas y enzimáticas. Existen dos teorías para explicar cómo se produce la incorporación de nuevo material de pared en la estructura preexistente. La primera, cada vez más aceptada, propone que la expansión de la pared celular im-

plica un continuo proceso de síntesis y degradación, produciéndose una disolución de los enlaces ya establecidos en las zonas de crecimiento activo para que se inserten los nuevos “bloques de construcción”. Ello supone un equilibrio entre las actividades de tipo hidrolítico y ligasa. La segunda posibilidad es que la pared recién formada crezca por un proceso de intususcepción antes de que se formen los enlaces cruzados entre los distintos componentes de la pared celular y se vuelvan rígidos; los polímeros preexistentes se reorganizarían, deslizándose ligeramente unos sobre otros, para dejar libre una nueva área donde se depositan los nuevos materiales de la pared. De cualquier modo, habría procesos en los que los procesos hidrolíticos serían indispensables, como la emergencia de las proyecciones o *shmoos* para la conjugación. Cualquiera que sea el mecanismo, es evidente que en determinadas situaciones tiene lugar una hidrólisis altamente localizada de la pared existente. En consonancia con este hecho, se han identificado y caracterizado numerosas hidrolasas asociadas con la envuelta de las levaduras, que incluyen β -glucanasas, α -glucanasas y quitinasas, α -manosidasasas (revisado en Cid *et al.*, 1995; Latgé, 2007).

(I)- 6.4.1. Mecanismo de acción de las O-glicosidasas

Dado que los carbohidratos presentan una gran variedad estereoquímica y pueden estar ensamblados de múltiples maneras, existe una gran variedad de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos; dichas enzimas se conocen con el nombre genérico de O-glicosidasas. La hidrólisis de estos enlaces tiene lugar, generalmente, mediante catálisis ácida. Las glicosidasas pueden clasificarse en dos grandes grupos en función de su mecanismo de acción: aquéllas que hidrolizan el enlace glicosídico con inversión de la configuración del carbono anomérico (actúan mediante un desplazamiento directo del grupo saliente por una molécula de agua) y aquéllas que lo hacen reteniendo dicha conformación (mediante un doble desplazamiento que implica un intermediario glicosil-enzima) (Fig. 24A y B) (revisado en McCarter y Withers, 1994; White y Rose, 1997). Am-

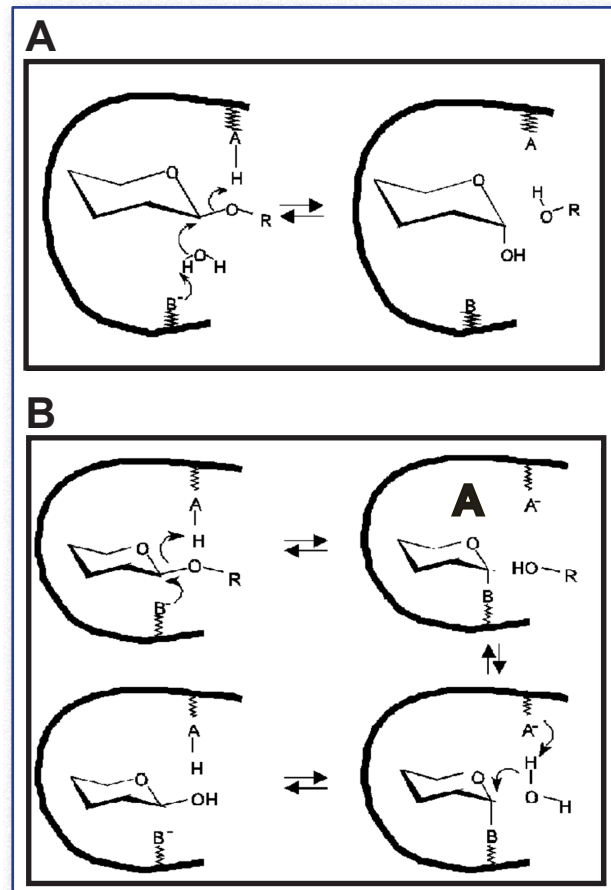


Figura 24. Mecanismo propuesto para las glicosidasas inversoras y retentivas. (A) Mecanismo de inversión. En un mismo paso, se produce el desplazamiento del grupo saliente por una molécula de agua. (B) Mecanismo de retención propuesto para una β -glicosidasa. El β -oligosacárido entra en el sitio catalítico y se forma un intermediario covalente α -glicosil-enzima, que posteriormente es hidrolizado a través de estados de transición de tipo ión oxocarbenio (adaptado de McCarter y Withers, 1994; White y Rose, 1997).

bos tipos de hidrolasas utilizan un par de ácidos carboxílicos en el sitio activo. En las enzimas que provocan inversión, un residuo funciona como ácido y el otro como base, mientras que en las hidrolasas retentivas un aminoácido actúa como ácido y como base, mientras que el segundo residuo adopta el papel de nucleófilo y grupo saliente. En el caso de las glicosidasas que invierten la conformación anomérica, dichos residuos catalíticos están separados 9-9,5 Å, dado que deben acomodar tanto el sustrato como la molécula de agua a la vez. En el caso de las glicosidasas de retención, la distancia que separa dichos aminoácidos catalíticos es, aproximadamente, la mitad (4,8-5,3 Å). Asimismo, las dos clases de hidrolasas actúan a través de estados de transición. Los distintos datos obtenidos de diversos estudios sugieren que se forma un intermediario covalente azúcar-

enzima que, posteriormente, se libera mediante estados de transición de tipo ión oxocarbenio (Davies y Henrissat, 1995; McCarter y Withers, 1994; White y Rose, 1997). Una característica especial del mecanismo de retención es que también puede catalizar reacciones de transglicosidación. En este caso, tras haberse formado el intermediario glicosil-enzima, en el sitio catalítico penetra una molécula aceptora de tipo oligosacárido.

(I)- 6.4.2. Clasificación de O-glicosidasas

Las glicosidasas se han intentado clasificar de múltiples maneras. La más simple se basa en su especificidad de sustrato, siguiendo las recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), y se expresa con el número EC de una determinada enzima. Las O-glicosilhidrolasas reciben el código EC 3.2.1.X, donde X indica la especificidad de sustrato. Sin embargo, esta clasificación no puede acomodar de manera precisa las enzimas que actúan sobre varios sustratos diferentes. Una segunda clasificación se basa en el mecanismo de acción (retención o inversión), pero dado que sólo genera dos clases, no resulta útil. Otra manera de agrupar las glicosidasas se fundamenta en el modo de acción, según provoquen la liberación de monosacáridos (exo-glicosidasas) o de pequeños oligosacáridos (endo-glicosidasas) a partir del sustrato. Aunque esta tercera clasificación proporciona información útil, algunas enzimas pueden actuar como endo- y exo-glicosidasas, así que tampoco resulta práctica. Por último, la clasificación basada en la secuencia de aminoácidos es la más ampliamente aceptada, según la cual, proteínas con una alta homología en su secuencia primaria pertenecerían a la misma familia. El principio por el que se rige esta clasificación supone que la secuencia primaria de una proteína y su estructura están relacionadas, de modo que se podría deducir información estructural y del mecanismo de acción a partir de la secuencia aminoacídica. Como el mecanismo catalítico viene determinado por la estructura, la clasificación en familias refleja de manera directa la estereoquímica de cada familia (revisado por Henrissat y Davies, 1997).

Esta clasificación puede consultarse en el servidor web CAZy (<http://www.cazy.org/>). Se ha comprobado que existen familias que comparten un alto parecido en su estructura y en su mecanismo de acción, lo que se ha empleado para definir una agrupación jerárquica por encima de las familias, que se ha denominado clan. Así, un clan agrupa a familias que poseen una estructura tridimensional similar e idénticos aminoácidos catalíticos, y que actúan en sustratos relacionados estereoquímicamente. Por ejemplo, el clan GH-A agrupa más de 2.800 secuencias de 16 familias (GH1, GH2, GH5, GH10, GH17, GH26, GH35, GH39, GH42, GH50, GH51, GH53, GH59, GH72, GH79 y GH86). Todas ellas actúan con mecanismos de retención sobre enlaces glucosídicos ecuatoriales (Henrissat y Bairoch, 1996; Henrissat y Davies, 2000; Stam *et al.*, 2005). El dominio catalítico de las proteínas de este clan comparten una estructura terciaria similar, consistente en un barril $(\alpha/\beta)_8$ (Durand *et al.*, 1997).

(I)- 6.4.3. Estructura modular de las O-glicosil-hidrolasas

En algunos casos, las enzimas que actúan sobre carbohidratos suelen presentar una estructura modular, en la que, junto al dominio catalítico, aparecen otros dominios adicionales no catalíticos, pero que desempeñan algún papel en la función de la proteína (Henrissat y Davies, 2000). Así, las enzimas pueden presentar regiones ricas en serinas y treoninas, característica muy común en las proteínas de la pared celular. Estas regiones pueden encontrarse tanto en el extremo amino como en el carboxilo. Estos residuos de serina y treonina suelen estar altamente O-glicosilados, y se ha propuesto que podrían adoptar una conformación rígida y extendida. En ciertos casos, esta disposición permitiría a las proteínas ancladas a la membrana plasmática de células animales atravesar el glicocálix y situar sus dominios catalíticos en la superficie celular, hacia el medio externo. En el caso de las levaduras, es poco probable que un dominio de este tipo permita atravesar todo el grosor de la pared celular (mucho mayor que el del glicocálix). Otra función de los oligosacáridos parece estar relacionada con la protección o esta-

bilización de proteínas (revisado por Orlean, 1997; Stratford, 1994). También se ha sugerido que algunas de estas cadenas manosiladas podrían intervenir en el enlace de algunas proteínas de pared al β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1999b).

Otras regiones que pueden estar presentes en las proteínas son los dominios de unión a carbohidratos (CBM; *carbohydrate binding domain*). Estos dominios presentan gran afinidad por determinados polisacáridos, de modo que pueden facilitar la acción de la enzima ya sea porque permiten la concentración de estas proteínas en la proximidad del sustrato, o bien porque al interactuar con el sustrato modifican ligeramente su estructura, haciéndolo más susceptible a la hidrólisis (Bolam *et al.*, 1998; Boraston *et al.*, 2004; Southall *et al.*, 1999; Tomme *et al.*, 1995). Un ejemplo es el dominio de unión a carbohidratos de la β -1,3-endoglucanasa eng1p de la levadura de fisión. La proteína completa se localiza en forma de anillo alrededor del septo para llevar a cabo la degradación del septo primario. Cuando se elimina el CBM, la proteína también aparece en las paredes laterales de la célula, y es incapaz de rescatar el fenotipo de separación del mutante *eng1Δ*, de modo que el CBM es necesario para la función biológica de eng1p en la degradación del septo primario. Por su parte, cuando se expresa el CBM aislado, la localización es similar a la de la proteína completa, lo cual indica que este dominio es el responsable de mantener a la β -1,3-endoglucanasa cerca de su sustrato en el septo primario (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008). Los CBMs se han clasificado en familias basadas en la similitud de secuencia (Coutinho y Henrissat, 1999).

(I)- 6.5. Proteínas GPI

Los anclajes GPI poseen funciones importantes en el transporte intracelular de determinadas proteínas y en el ensamblaje de la pared celular, y la disolución de estos anclajes podría ser la manera por la cual se regularía su localización en la superficie celular. El núcleo del anclaje GPI consiste en un residuo de etanolamina-fosfato-(manosa)₂-glucosamina-inositol unido a un fosfolípido de membrana que se une por el extremo no

reductor de la cadena glucídica a la proteína (revisado por Orlean, 1997). La adición del motivo GPI es un proceso en el que, de manera coordinada, se elimina la región hidrofóbica a la altura del par de aminoácidos pequeños por un complejo transaminidasa, seguido de la unión del grupo GPI al nuevo extremo carboxilo.

En protozoos y células de mamíferos, las proteínas GPI permanecen en la membrana plasmática y allí realizan funciones relacionadas con las interacciones célula-célula y célula-entorno. En las levaduras, existen algunas proteínas GPI ancladas a la membrana plasmática, mientras que otras están destinadas a la pared celular y su anclaje a la membrana es transitorio (revisado en Cid *et al.*, 1995; Pittet y Conzelmann, 2007). El procesamiento de las proteínas de pared ocurre en dos pasos: degradación del motivo GPI de la proteína y unión de la proteína liberada al β -1,6-glucano. Se cree que la información necesaria para determinar el destino final de la proteína GPI (GPI-PMP, para una proteína en la membrana plasmática, o GPI-CWP, para una proteína en la pared celular) viene codificada en la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998).

En general, la señal para recibir un anclaje GPI (independientemente de que se trate de una GPI-PMP o de una GPI-CWP) se localiza en el extremo carboxilo de la proteína, y está compuesta por el punto de corte, una región espaciadora de unos 8-12 aa y una secuencia hidrofóbica terminal de, al menos, 10 aa. El sitio de corte (sitio ω) debe ser un aminoácido de pequeño volumen, como Asn, Ser, Gly, Ala, Asp o Cys seguido de dos aminoácidos con cadena lateral pequeña (posiciones $\omega+1$ y $\omega+2$). Cuando las posiciones ω y $\omega+2$ se sustituyen por aminoácidos de gran tamaño, la proteína deja de ser susceptible de recibir un grupo GPI. La función de la región hidrofóbica es retener la proteína en la membrana hasta la adición del GPI (Caro *et al.*, 1997; de Groot *et al.*, 2003; Hamada *et al.*, 1998).

El destino final de las proteínas GPI parece estar determinado por la región inmediatamente anterior al sitio ω (las posiciones $\omega-5$ a $\omega-1$). La

presencia de residuos básicos en estas posiciones favorece que sea la membrana plasmática el destino final. Es más, la existencia de un motivo dibásico ocupando las posiciones ω -1 y ω -2, parece ser suficiente para determinar este destino. Por otro lado, la presencia de Val, Ile o Leu en los sitios ω -4 y ω -5, y de Tyr o Asn en ω -2 actúa como señal para una localización en la pared celular. Otro dato importante es que las proteínas-GPI cuyo destino final es la pared celular suelen poseer regiones ricas en Ser/Thr. De hecho, se ha constatado que proteínas que poseen un motivo dibásico inmediatamente antes de la posición ω , pero que también presentan una región rica en Ser/Thr que solapa con esta zona, suelen estar situadas en la pared celular (Caro *et al.*, 1997; Friedman y Cormack, 2003; 2004; Hamada *et al.*, 1998; Nuoffer *et al.*, 1993). De todos modos, es preciso aclarar que la localización de las proteínas en la membrana o en la pared no es absoluta; más bien existe un espectro de distribución, y las proteínas se concentran más en la pared celular o membrana dependiendo de sus características.

Cuando una proteína-GPI es procesada para alcanzar su destino final en la pared celular, pierde el fosfolípido, de modo que el resto del anclaje GPI, al cual se une el β -1,6-glucano mediante un enlace fosfodiéster, posee la siguiente estructura: etanolamina-fosfato- Man_4 (Kapteyn *et al.*, 1999a; Klis *et al.*, 2002).

En un trabajo reciente se han analizado e identificado algunas de las proteínas ancladas de manera covalente a la pared celular de *S. pombe*. Entre los resultados destaca la detección de proteínas de tipo ASL (hasta la fecha no se había encontrado ninguna en la levadura de fisión) y de cuatro proteínas tipo GPI-CWPs, entre las que destacan los productos proteicos de SPAC19B12.02C (gas1p) y SPAC11E3.13C (gas5p), dos homólogos de ScGas1p (de Groot *et al.*, 2007).

(I)- 6.6. Glicosil-hidrolasas de la familia 72 (GH72)

En la familia 72 de las glicosil hidrolasas (GH) se han incluido hasta el momento 94 proteínas de distintos orígenes (<http://www.cazy.org/fam/GH72.html>). Son proteínas modulares que poseen un dominio catalítico común de aproximadamente 310 aa (dominio GluTD, de *Glucanosyl-Transferase Domain*), así como un péptido señal en el extremo amino. La secuencia que sigue al dominio GluTD es más variable, pudiendo presentar regiones ricas en serinas y treoninas, dominios ricos en cisteínas (que presentan similitud con los CBMs de la familia 43) y 10-12 aminoácidos hidrofóbicos que constituyen la señal para la adición del motivo GPI. El primer miembro identificado de esta familia fue la proteína Gas1p de *S. cerevisiae*.

La glicoproteína Gas1p fue identificada en dos estudios bioquímicos independientes. El primero trataba de caracterizar proteínas lábiles sintetizadas durante la transición G1/S del ciclo celular, y así se identificó el precursor de una glicoproteína estable, gp115 (Popolo y Alberghina, 1984; Popolo *et al.*, 1986). En el segundo, que buscaba proteínas que portasen un complejo glicosil-fosfatidil-inositol, se identificó una proteína de 125 kDa (Conzelmann *et al.*, 1988). Más tarde, aproximaciones genéticas diseñadas para aislar genes involucrados en la biosíntesis de pared celular condujeron de nuevo a la identificación de gp115 (Ram *et al.*, 1995). Aunque se ha hecho referencia al gen que codifica la proteína gp115 con diversos nombres, como *GGP1* (*glycophospholipid-anchored glycosylated protein*) (Vai *et al.*, 1991), *GAS1* (*glycolipid-anchored surface protein*) (Nuoffer *et al.*, 1991) y *CWH52* (*Calcofluor White hypersensitive*) (Ram *et al.*, 1995), la denominación *GAS1* es la más extendida en la actualidad. Todos estos estudios han permitido la caracterización de la ruta biosintética de Gas1p, la identificación de su posible papel en la construcción de la pared celular, la identificación de homólogos de Gas1p y el análisis de la regulación de la expresión de *GAS1*.

En cuanto a la biosíntesis de Gas1p, parece que sufre tres tipos de modificaciones post-traduccionales: N-glicosilación, O-manosilación y adición

de un anclaje GPI. Gas1p contiene 10 posibles sitios de N-glicosilación y una alta proporción de serinas (14,6%) y treoninas (8%) (región *Ser-rich*) que proporcionan numerosos sitios potenciales de O-glicosilación. No se conoce la función de la N- y O-glicosilación en Gas1p, puesto que la delección o duplicación de la región *Ser-rich* no afecta la actividad de la proteína *in vivo* (revisado por Popolo y Vai, 1999). En lo referente al motivo GPI, se une al residuo N528 y la presencia de dos aminoácidos básicos (Lys-Lys) en las posiciones 526 y 527 parece determinar que Gas1p se localice en la membrana plasmática (GPI-PMP). La eliminación del dominio hidrofóbico terminal provoca un retraso en el transporte intracelular de la proteína, así como a la secreción de Gas1p al medio de cultivo (Nuoffer *et al.*, 1991). Las formas secretadas no rescatan el fenotipo del mutante *gas1*, lo que indica que la localización en la superficie celular es imprescindible para su función biológica (revisado por Popolo y Vai, 1999).

La disrupción de *GAS1* provoca numerosos defectos morfológicos: pérdida de la forma elipsoidal típica y adopción de una morfología redondeada, defectos en la maduración de la yema y separación celular, y presencia de grumos de células en la fase estacionaria. Estos defectos pueden corregirse con la adición de un estabilizador osmótico en el medio de cultivo (Turchini *et al.*, 2000). Por su parte, la pared celular de las células *gas1Δ* es muy resistente a Zimoliasa (β -1,3-glucanasa) y más sensible a agentes que interfieren con la pared celular, como el calcoflúor, o desestabilizadores osmóticos, como el dodecil-sulfato sódico (SDS). Estudios bioquímicos de la composición de la pared revelaron que, aunque el contenido total de glucanos en una cepa *gas1Δ* es similar al de la cepa silvestre, cambia su distribución entre álcali-soluble y álcali-insoluble, además de un aumento de quitina, lo que refleja diferencias en los enlaces existentes entre los distintos polímeros de la pared (Popolo *et al.*, 1997; Valdivieso *et al.*, 2000). Las modificaciones en la pared celular de estos mutantes se deben tanto a defectos primarios en el ensamblaje de glucanos, como a los mecanismos de compensación para preservar la integridad celular (revisado por Popolo y Vai, 1999).

En *S. cerevisiae* se han identificado otros cuatro genes que codifican proteínas de la familia GH72 (*GAS2-5*). Gas2p es la más similar a Gas1p, mientras que Gas4p es la que menos identidad comparte con Gas1p. *GAS1* y *GAS5* se expresan durante el crecimiento vegetativo y se encuentran reprimidas durante meiosis y esporulación, mientras que *GAS2* y *GAS4* presentan un patrón de expresión opuesto al anterior. *GAS3* apenas se expresa durante el crecimiento vegetativo o esporulación, y podría tener alguna relación con la regeneración de protoplastos (Pardo *et al.*, 1999). Un estudio reciente ha demostrado que Gas2p y Gas4p participan en la maduración de las ascosporas y parecen tener funciones redundantes (Ragni *et al.*, 2007a).

Otras proteínas similares a Gas1p están presentes en otras especies de hongos y levaduras (*Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum*, *Kluyveromyces lactis*, *Neurospora crassa*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pichia pastoris*, *S. pombe* y *Yarrowia lipolytica*, entre otras), y todas ellas conforman la familia GH72. Se han descrito dos subfamilias distintas (GH72⁺ y GH72⁻), dependiendo de la presencia o ausencia del dominio *Cys-box* (o *Pfam X8*) y que posee homología con el dominio de unión a carbohidratos de la familia CBM43, presente en algunas proteínas vegetales (Barral *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007b).

Respecto a la actividad enzimática de estas proteínas, sólo se han publicado datos referentes a una decena de ellas. Tiempo atrás se había postulado que las cadenas nacientes de β -1,3-glucano lineal sintetizadas por el complejo β GS deberían ser procesadas por diversas enzimas para su incorporación en la pared celular; dichas enzimas desempeñarían un papel directo en procesos como la ramificación de este polímero mediante la introducción de puntos de ramificación β -1,3/ β -1,6 o el establecimiento de uniones con otros componentes, como la quitina. Se habían dedicado muchos esfuerzos para identificar estas enzimas que resultaron infructuosos, aunque los datos sugerían la implicación de transferasas. Por fin, en 1996 se aisló una glicoproteína de *A. fumigatus* que cata-

lizaba una reacción consistente en la disolución endo-hidrolítica de un enlace de β -1,3-glucano y posterior creación de un nuevo enlace β -1,3 con una nueva molécula aceptora de glucano (Hartland *et al.*, 1996). Por tanto, esta enzima podría participar en la incorporación del glucano recién sintetizado en la pared celular y fue identificada como el producto del gen *AfGEL1* (Mouyna *et al.*, 2000a). En este trabajo se comprobó que Gel1p compartía un alto grado de similitud con las proteínas codificadas por los genes *GAS* de *S. cerevisiae*, así como con los genes *PHR* de *C. albicans* y *EPD* de *C. glabrata*, y que compartían con aquélla la actividad β -1,3-glucanosil-transferasa. De esta manera, se concluyó que las transglucosidasas ancladas a la superficie celular mediante un anclaje GPI desempeñan una función activa en el ensamblaje de la pared celular (Mouyna *et al.*, 2000a).

La disponibilidad de un ensayo para detectar la actividad β -1,3-glucanosil-transferasa, así como el alineamiento de las secuencias de estas proteínas homólogas permitió identificar dos secuencias muy conservadas dentro del dominio GluTD, que podían estar involucradas en la actividad catalítica. Además, el método HCA (*Hydrophobic Cluster Analysis*, descrito por Gaboriaud *et al.*, 1987) describió las proteínas de tipo Gas al clan GH-A, formado por proteínas que presentan una estructura en barril $(\beta/\alpha)_8$ (también conocido como *TIM-barrell*) y cuyos aminoácidos catalíticos están situados en los extremos carboxílicos de las hebras β -4 y β -7 (Papaleo *et al.*, 2006). Se identificaron dos

ácidos glutámicos ocupando esas posiciones en AfGel1p (E160 y E261). Estos glutamatos también estaban presentes en todos los miembros de la familia GH72. Mediante mutagénesis dirigida se pudo comprobar que los aminoácidos identificados correspondían al sitio catalítico de las enzimas, tanto en AfGel1p primero, como en Gas1p y otras proteínas después (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000b).

La regulación de la expresión de los genes que codifican miembros de la familia GH72 varía de una especie a otra. Así, mientras que en *S. cerevisiae* los distintos genes parecen expresarse en distintos momentos del ciclo celular y/o del proceso de diferenciación celular (Ragni *et al.*, 2007a; Ragni *et al.*, 2007b), en *C. albicans*, la expresión de los genes homólogos está regulada por el pH del medio de cultivo (Fonzi, 1999). Los datos conocidos hasta la fecha hacen suponer que en las especies en las que existen varias proteínas homólogas del tipo Gas, cada una de ellas se encuentra especializada en llevar a cabo su función en un momento preciso del ciclo biológico o de los procesos de invasión/infección de un organismo hospedador en aquellos hongos o levaduras patógenos.

En *S. pombe* se han identificado cuatro posibles fases de abiertas de lectura que podrían codificar proteínas pertenecientes a la familia GH72, ya que se ha identificado en ellas un posible dominio GluTD. Esta Memoria recoge el trabajo experimental desarrollado para caracterizar estos genes y los productos por ellos codificados.

(II)- OBJETIVOS

OBJETIVOS

El trabajo descrito en esta Memoria se enmarca dentro de un proyecto más amplio que tiene como objetivo la identificación de genes que regulan la morfogénesis y la biosíntesis de la pared celular de levaduras, en particular, de *Schizosaccharomyces pombe*.

El presente proyecto de investigación tiene como fin la caracterización funcional de genes de la familia 72 de las glicosil-hidrolasas en *S. pombe*. Las proteínas de esta familia han sido previamente caracterizadas como glucanosil-transferasas en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *A. fumigatus*. Por ello, los objetivos planteados son:

- La identificación de genes homólogos a *GAS1* en *S. pombe* y la determinación de su función biológica en la levadura de fisión, mediante la generación de mutantes nulos en los que se analizará la composición y estructura de la pared celular.
 - El análisis de la expresión de los genes tipo *GAS* a lo largo del ciclo celular en la levadura de fisión y la localización de las proteínas que codifican.
 - La determinación de la actividad catalítica de estas proteínas en *S. pombe*, identificando la especificidad de sustrato y el mecanismo de acción de las mismas, así como si existe redundancia en la función de esta familia de proteínas.
-

(III)- RESULTADOS

**Identificación de genes homólogos
a *ScGAS1* en *S. pombe***

(III)- RESULTADOS: Identificación de genes homólogos a ScGAS1 en *S. pombe*

(III)- 1. Las proteínas *gas1p*, *gas2p*, *gas4p* y *gas5p* pertenecen a la familia 72 de las glicosil-hidrolasas (GH72)

Como ya se mencionó en la Introducción de esta Memoria, la proteína Gas1p de *S. cerevisiae* es una de las proteínas ancladas a la membrana mediante un grupo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) más abundantes de la superficie celular. Para identificar si en la levadura de fisión también existen glicosil-hidrolasas de la familia 72, se realizó una búsqueda de proteínas que presentasen similitud de secuencia con la glucanosil-transferasa ScGas1p. Para ello, se utilizó la secuencia de dicha proteína y se realizó un BLASTp comparándola con las secuencias de proteínas del genoma de *S. pombe* presentes en la base de datos del Centro Sanger (Reino Unido). Ello permitió la identificación de cuatro posibles proteínas pertenecientes a la familia GH72 (las codificadas por las fases de lectura abiertas SPAC19B12.02c, SPBC29A10.08, SPAC11E3.13C y SPBC342.03). Estas cuatro proteínas comparten características comunes con ScGas1p, como la presencia de una secuencia señal en el extremo amino (identificada mediante el programa informático *Signal P* - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) seguida del dominio conservado presente en las proteínas de la familia 72 GH72 y conocido como GluTD (de las siglas en inglés de *glucan transferase domain*), y una región hidrofóbica en el extremo carboxilo que las herramientas bioinformáticas (tales como las aplicaciones *GPI-SOM* y *big-PI Predictor*) califican como una posible señal para anclaje mediante un grupo GPI. Por estas razones, las proteínas codificadas por los marcos de lectura abiertos identificados parecían posibles candidatas a desarrollar una actividad β -1,3-glucanosil-transferasa, como la descrita para ScGas1p, ScGas2p, ScGas4p,

ScGas5p, AfGel1p y AfGel2p, entre otras (Mouyna *et al.*, 2000; Mouyna *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007b).

(III)- 1.1. Estructura modular de las proteínas de *S. pombe* pertenecientes a la familia GH72

Las proteínas de la familia GH72 poseen una estructura modular y pueden contener dominios adicionales entre la región GluTD y el anclaje GPI. De este modo, en ciertos miembros de esta familia es posible identificar una región rica en cisteínas (*Cys-rich region*) que presenta similitud de secuencia con proteínas pertenecientes a la familia 43 de los dominios de unión a carbohidratos (CBM43). De hecho, la presencia o ausencia de la región rica en cisteínas ha permitido dividir las transferasas de la familia 72 en dos subfamilias, denominadas GH72⁺ (las que poseen el CBM43) y GH72⁻ (las que carecen del mismo) (Ragni *et al.*, 2007b). Asimismo, también es frecuente encontrar en la secuencia de las proteínas de la familia GH72 una zona rica en serinas (*Ser-rich region*), altamente susceptible de sufrir O-glicosilación.

En *S. cerevisiae* existen cinco proteínas Gas (ScGas1p a ScGas5p) que se diferencian estructuralmente entre sí por contener diversas combinaciones de los dominios citados anteriormente (Fig. 25A). Como primera aproximación para tratar de identificar si existía una mayor similitud entre alguna de las proteínas de *S. cerevisiae* y las de *S. pombe*, se realizaron alineamientos globales por pares de las secuencias de aminoácidos y se determinó el porcentaje de identidad entre cada par. Los resultados mostraron que la proteína con mayor porcentaje de identidad a ScGas1p era la codificada por el gen SPAC19B12.02c (46,9% de identidad, Fig. 25B). Del mismo modo, ScGas5p presentaba una mayor identidad cuando se comparaba con los productos de SPBC342.03 y SPAC11E3.13c (45,6 y 46,5%, respectivamente). Sin embargo, en el caso de ScGas2p, ScGas3p y ScGas4p era más difícil determinar cuál de los genes de *S. pombe* podría ser el homólogo ya que los porcentajes de identidad eran similares.

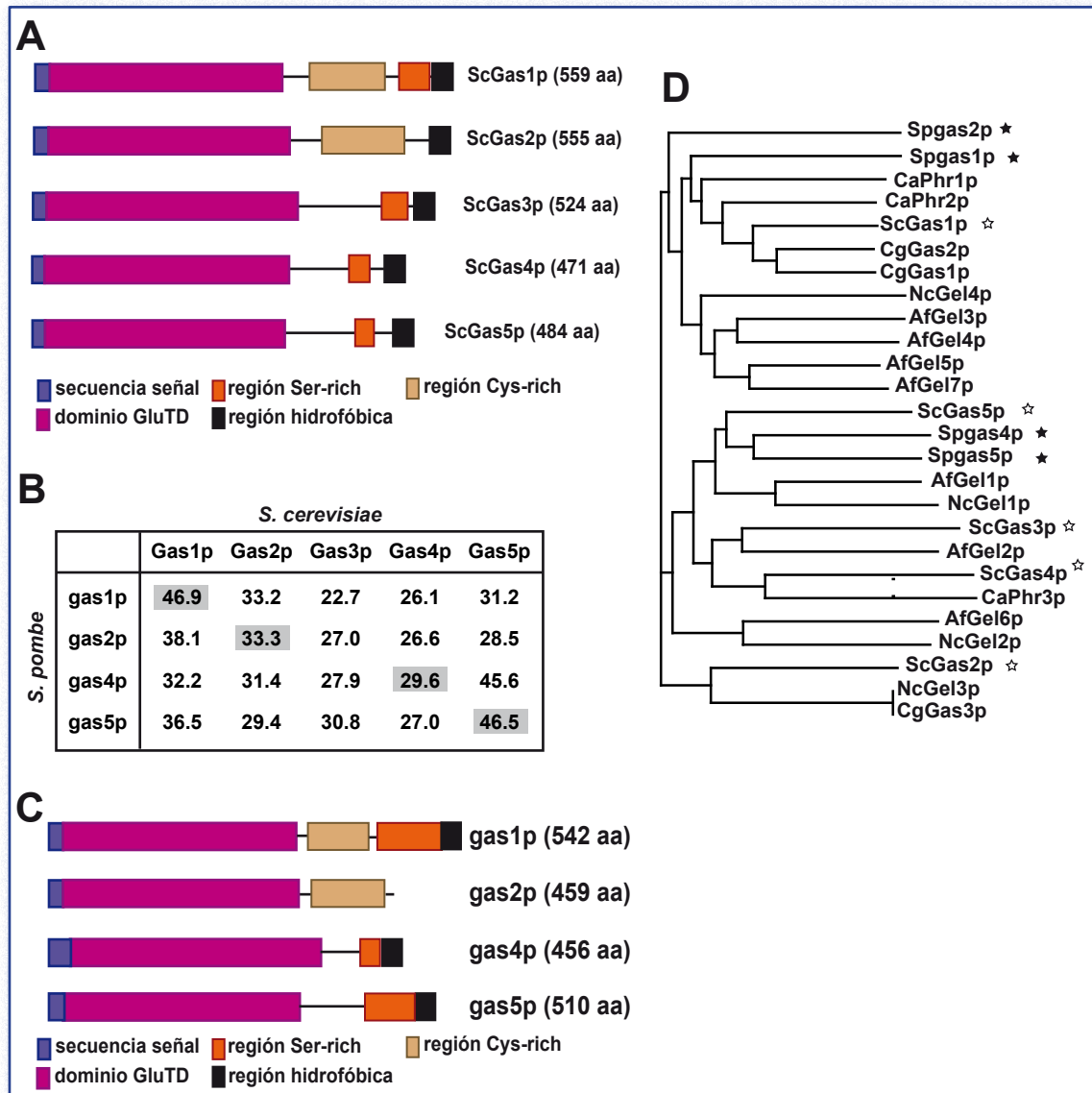


Figura 25. Características de las proteínas GH72 de *S. pombe*. (A) Representación esquemática de la organización modular de las proteínas de *S. cerevisiae* Gas1p, Gas2p, Gas3p, Gas4p y Gas5p (figura adaptada de Ragni *et al.*, 2007b). (B) Porcentaje de identidad entre las proteínas GH72 de *S. cerevisiae* y *S. pombe*. (C) Representación esquemática de la organización modular de las proteínas de *S. pombe* gas1p, gas2p, gas4p y gas5p. (D) Dendrograma generado por Clustal X tras el alineamiento de la región N-terminal (GluTD y espaciador) de las proteínas pertenecientes a la familia GH72. Las secuencias de *S. pombe* son: *Spgas1p* (código SwissProt Q9P378), *Spgas2p* (Q9USU5), *Spgas4p* (Q9Y7Y7), *Spgas5p* (O13692); *S. cerevisiae*: *ScGas1p* (P22146), *ScGas2p* (Q06135), *ScGas3p* (Q03655), *ScGas4p* (Q08271), *ScGas5p* (Q08193); de *Candida albicans*: *CaPhr1p* (P43076), *CaPhr2p* (O13318), *CaPhr3p* (Q9P8R2); de *C. glabrata*: *CgGas1p* (Q8X0Z7), *CgGas2p* (Q8X0Z6), *CgGas3p* (Q8X0Z5); de *A. fumigatus*: *AfGel1p* (O74687), *AfGel2p* (Q9P8U4), *AfGel3p* (Q9P8U3), *AfGel4p* (Q4WHH9), *AfGel5p* (XP_746993), *AfGel6p* (XP_754302), *AfGel7p* (XP_751119); de *Neurospora crassa*: *NcGel1p* (Q8X0X4), *NcGel2p* (Q8X094), *NcGel3p* (Q873D1), *NcGel4p* (Q872H7) y *NcGel5p* (Q7S962). Los asteriscos blancos señalan las proteínas de la levadura de gemación, mientras que las proteínas de la levadura de fisión están indicadas con asteriscos negros.

Ya que la comparación de las secuencias de aminoácidos no resultó ser suficiente para determinar la relación entre las proteínas de la levadura de gemación y la de fisión, se procedió al análisis de la estructura de las proteínas identificadas. Este análisis mostró que todas las proteínas de *S. pombe* presentaban la estructura modular típica de las proteínas de la familia GH72, aunque existían diferencias entre ellas (Fig. 25C y Tabla 3). Así, las cuatro proteínas presentan un péptido

señal en el extremo amino para la entrada en la ruta secretora cuya longitud oscila entre 19 y 25 aminoácidos (Tabla 3). A continuación se encuentra el posible dominio catalítico (GluTD; de unos 300 aminoácidos), en el que los aminoácidos que constituyen el centro activo en otras proteínas de la familia -los glutámicos E161 y E262 en la proteína *ScGas1p*, que actúan como donadores y aceptores de electrones (Carotti *et al.*, 2004)- están perfectamente conservados en las cuatro proteínas

Tabla 3. Resumen de las características de las proteínas GH72 de *S. pombe*.

	SPAC19B12.02c gas1p	SPBC29A10.08 gas2p	SPBC342.03 gas4p	SPAC11E3.13c gas5p
Aminoácidos	542	459	456	510
Pm estimado	58,1	50,6	50,7	53,6
Secuencia señal	M1-A19	M1-A19	M1-T25	M1-A22
GluTD	S20-I326	Y20-S332	H26-G337	D23-A336
Posible sitio catalítico	E157 y E258	E156 y E263	E157 y E257	E159 y E261
Cys-rich	C345-K422	C350-C449	NO	NO
Ser-rich	A435-S520	NO	T419-S435	S423-T489
GPI	SI	NO	SI	SI

de *S. pombe*. Adicionalmente, los productos de los genes SPAC19B12.02c y SPBC29A10.08 poseen una región *Cys-rich* y las proteínas codificadas por SPAC19B12.02c y SPAC11E3.13c contienen un dominio *Ser-rich* relativamente largo (85 y 66 aminoácidos, respectivamente), mientras que este módulo es de menor longitud en SPBC342.03 (18 aminoácidos) y está ausente en SPBC29A10.08. Por último, las aplicaciones informáticas *GPI-SOM* y *DGPI* clasificaron las proteínas codificadas por SPAC19B12.02c, SPBC342.03 y SPAC11E3.13c como glicoproteínas ancladas a la membrana mediante un motivo GPI, de tamaños moleculares calculados teóricamente de 58,1, 50,7 y 53,6 kDa, respectivamente. Las tres contienen una secuencia hidrofóbica en su extremo carboxilo que puede servir de señal para la unión a una molécula de GPI. Por el contrario, la proteína SPBC29A10.08 (50,6 kDa) aparentemente carece de una señal para este tipo de modificación, lo que la distingue del resto de miembros de esta familia.

Cuando se comparó la estructura modular de las distintas proteínas de *S. pombe* con la de las proteínas de *S. cerevisiae* (Fig. 25A y C), se comprobó que la estructura de la proteína codificada por SPAC19B12.02c era muy similar a la de ScGas1p (organización GluTD-Cys-Ser-GPI), mientras que el producto de SPBC29A10.08 era similar a ScGas2p al poseer una estructura de tipo GluTD-Cys, aunque parecía carecer del anclaje GPI. Finalmente, la estructura de las proteínas SPBC342.03p y SPAC11E3.13cp era similar a la

de ScGas4p y ScGas5p (GluTD-Ser-GPI). Basándonos en estos parecidos estructurales así como en los porcentajes de identidad entre las secuencias de proteínas (Fig. 25B), los marcos de lectura SPAC19B12.02c, SPBC29A10.08, SPBC342.03 y SPAC11E3.13c se designaron como *gas1+*, *gas2+*, *gas4+* y *gas5+*, respectivamente.

Estos datos se vieron confirmados cuando se realizaron alineamientos múltiples con otras proteínas de la familia GH72 de hongos y levaduras utilizando el programa CLUSTAL X (Fig. 25D), ya que la proteína gas1p estaba más próxima en el dendrograma a ScGas1p dentro de la subfamilia GH72⁺ y las proteínas gas4p y gas5p se encontraban en la rama GH72⁻ junto con ScGas4p y ScGas5p. Como ya habían observado Ragni y colaboradores, la proteína gas2p quedaba fuera de la rama GH72⁺ a pesar de tener el dominio rico en cisteínas (Ragni *et al.*, 2007b).

(III)- 1.2. La proteína gas2p es diferente de otros miembros de la familia GH72

La ausencia de una secuencia hidrofóbica que actuase como señal para la adición del grupo GPI en el extremo carboxilo de la proteína gas2p es un hecho inusual en la familia GH72. Los demás miembros conocidos de esta familia, tanto de otras especies como del mismo *S. pombe*, presentan una secuencia altamente hidrofóbica en la zona carboxilo (Fig. 26A). Cuando la secuencia de las proteínas de *S. pombe* se analiza con herramien-

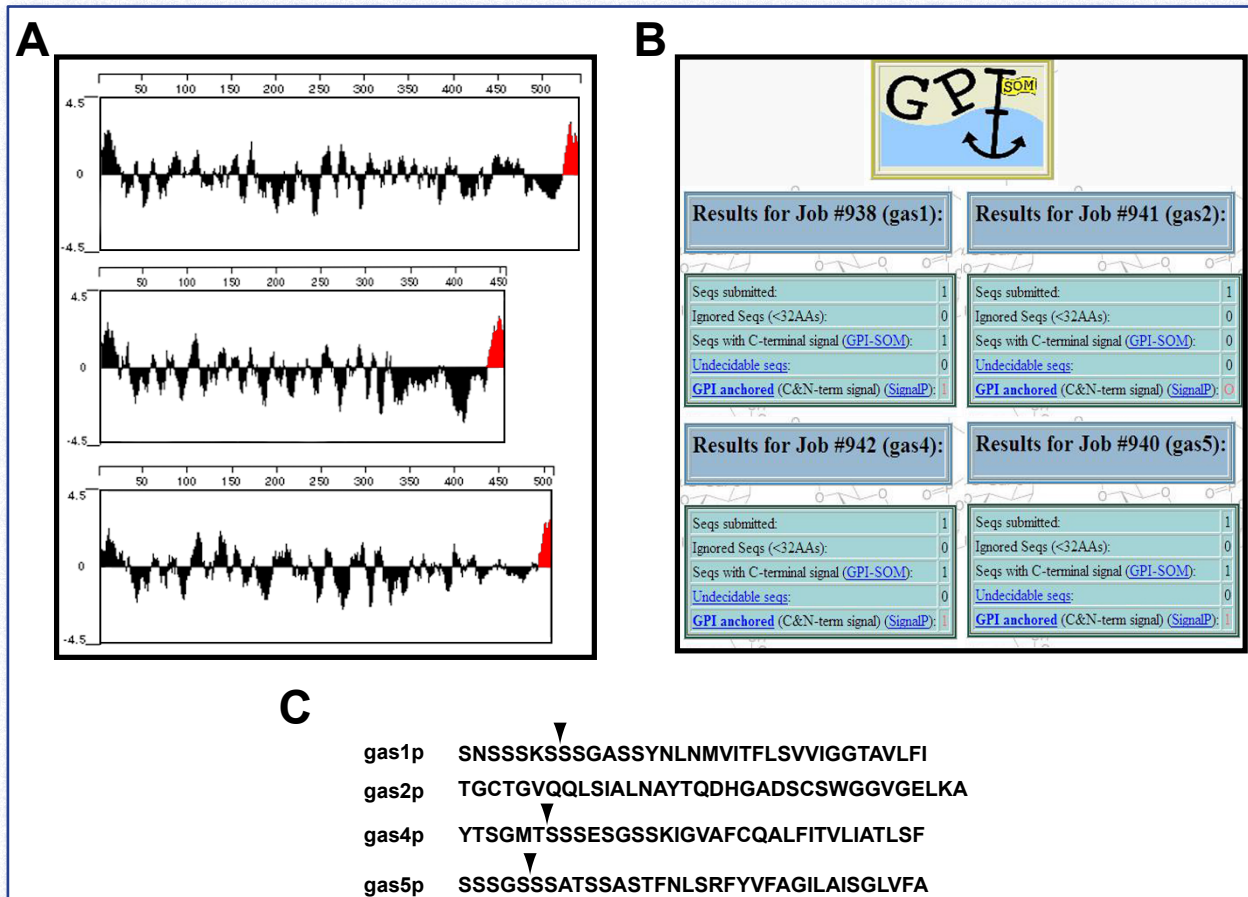


Figura 26. Las proteínas *gas1p*, *gas4p* y *gas5p* poseen una señal hidrofóbica en el extremo carboxilo para la unión de un grupo GPI. (A) Perfil hidrofóbico de las proteínas *gas1*, *gas4p* y *gas5p* generado con el programa *Protean* (*DNASTAR* de *Lasergene*). Se indican en rojo las regiones hidrofóbicas en el extremo carboxilo. (B) *gas2p* carece de señal para la unión de un grupo GPI. Las secuencias proteicas de las proteínas GH72 de *S. pombe* recuperadas de la base de datos fueron analizadas con la herramienta bioinformática *GPI-SOM*. (C) Sitios de corte de las proteínas para la unión del grupo GPI. Se muestra la región carboxilo-terminal de las proteínas y se indica el sitio de corte propuesto por *GPI-SOM*.

tas bioinformáticas que predicen la existencia de señales para el anclaje GPI y el punto de corte (*DGPI*, *big-PI Predictor* o *GPI-SOM*, por ejemplo), se observa que en el caso de las proteínas *gas1p*, *gas4p* y *gas5p* existe una posible señal de unión de GPI (Fig. 26B), con puntos de corte predichos en los aminoácidos -28, -29 y -30, respectivamente (Fig. 26C). Sin embargo, *gas2p* carece de la región hidrofóbica, por lo que no existen posibles sitios de unión de GPI. Este hecho ha llevado a Ragni y colaboradores a sugerir que esta proteína podría no ser funcional o tratarse de un polipéptido que fuese secretado, en lugar de quedar anclado a las envueltas celulares, como ocurre con otras proteínas de la familia GH72 (Ragni *et al.*, 2007b). Por esta razón, antes de comenzar el estudio de esta proteína decidimos comprobar si la secuencia presente en la base de datos de *S. pombe* (GeneDB) era correcta.

La hipótesis más sencilla para explicar esta diferencia era que la secuencia del gen *gas2⁺* presente en la base de datos fuese errónea y que existiese algún cambio en la fase de lectura cerca del extremo carboxilo. Puesto que tanto el dominio GluTD como parte de la región rica en cisteínas están presentes en *gas2p*, se asumió que, de existir un cambio en la fase de lectura, éste debía haberse producido entre el final del dominio *Cys-rich* y el posible extremo carboxilo (Fig. 27A). Cuando se analiza la secuencia de nucleótidos de esta región y las posibles fases de lectura presentes se observa que existen dos traducciones alternativas en las fases -1 y +1 respecto a la de *gas2⁺*. Si existiera un cambio en la fase de lectura en esta región se podrían generar dos secuencias de proteínas variantes y ligeramente más largas que *gas2p*. Estas dos posibles alternativas fueron denominadas *gas2p** y *gas2p***, respectivamente (la

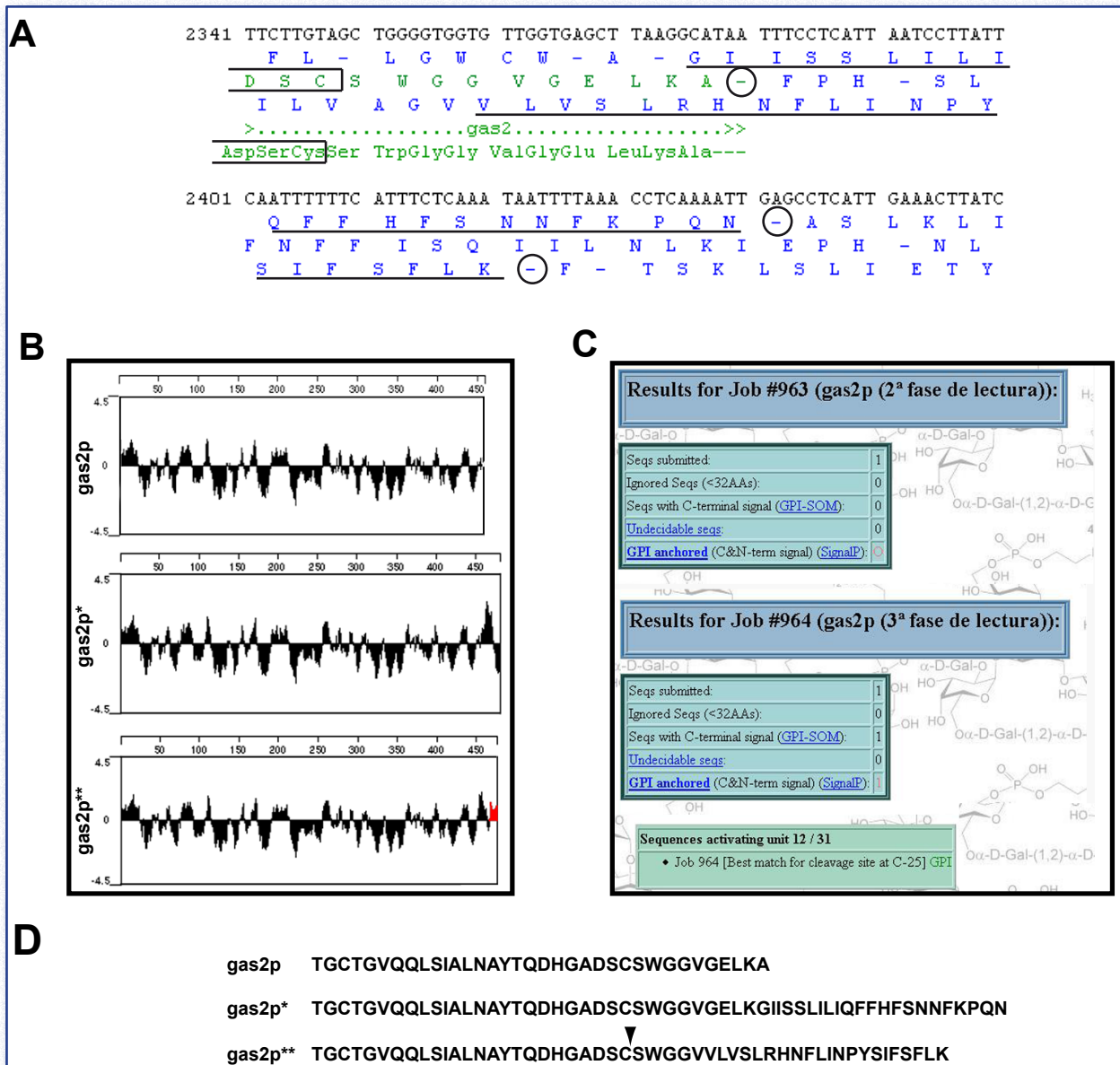


Figura 27. Análisis de las distintas fases de lectura de *gas2*⁺. (A) Fases de lectura alternativas de la zona 3' de *gas2*⁺. La secuencia nucleotídica fue analizada con el programa *Seqbuilder* (*Lasergene*). Se muestran las tres fases de lectura posibles de la región terminal del gen *gas2*⁺. En verde se indica la secuencia proteica contenida en la base de datos, mientras que el color azul se ha reservado para las fases de lectura alternativas. Los círculos indican codones de parada de la traducción. (B) Perfil hidrofóbico de la secuencia polipeptídica de *gas2p*, *gas2p*^{*} y *gas2p*^{**} obtenido con el programa *Protean* (*Lasergene*). Se indica en rojo la región hidrofóbica en el extremo carboxilo. (C) *gas2p*^{**} presenta un posible sitio de anclaje para un grupo GPI, según indica el programa *GPI-SOM*. (D) Sitio de unión del grupo GPI propuesto por el programa *GPI-SOM*, según los resultados mostrados en (C).

denominación *gas2p* se reservó para la secuencia proteica recuperada de la bases de datos).

Al analizar las características de las dos posibles fases de lectura alternativas, encontramos que *gas2p*^{**} generaba una secuencia peptídica de carácter hidrofóbico en el extremo carboxilo (Fig. 27B). Cuando se analizó la secuencia de *gas2p*^{*} y *gas2p*^{**} con *big-PI Predictor*, el resultado fue negativo para ambas variantes. Sin embargo, el programa *GPI-SOM* indicó que *gas2p*^{**} podría ser susceptible de sufrir un procesamiento post-tra-

duccional y recibir la adición de un grupo GPI (Fig. 27C). De hecho, según este programa, el punto de corte para su posterior unión a la molécula de GPI se encontraría en el aminoácido -25 (Fig. 27D). Por esta razón, se quiso comprobar si la secuencia de *gas2*⁺ y la fase de lectura propuestas en la base de datos eran correctas, descartando que se hubiese producido un error en la secuenciación. Para ello, partiendo de ADN genómico de una cepa silvestre de la colección del laboratorio, se amplificó la región final del gen *gas2*⁺ mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos y se

secuenciaron ambas cadenas, comprobando que la secuencia presente en las bases de datos era correcta y que no existían cambios en la fase de lectura. Estos datos nos llevaron a concluir que *gas2p* pertenece a la familia GH72 ya que posee el dominio GluTD y los aminoácidos conservados que forman parte del centro catalítico descrito en otros miembros de esta familia, pero se diferencia de todos ellos por el hecho de carecer del motivo de unión GPI. Una posibilidad es que durante la Evolución, el gen *gas2⁺* haya perdido su funcionalidad y no se exprese, quedando en el genoma como un pseudogen. Por ello, una parte del trabajo experimental recogido en esta Memoria ha consistido comprobar que *gas2⁺* es un verdadero gen, así como en un estudio detallado de la actividad y localización de esta proteína, para corroborar su pertenencia a la familia de enzimas β -1,3-gluconosiltransferasas.

(III)- 2. Expresión de los genes *gas⁺* en distintos momentos del ciclo de vida de *S. pombe*

(III)- 2.1. Los genes *gas1⁺*, *gas2⁺* y *gas5⁺* se expresan periódicamente durante el ciclo mitótico

Antes de proceder al estudio detallado de los genes identificados y de las correspondientes proteínas por ellos codificadas, se decidió comprobar que los marcos abiertos de lectura generaban transcritos en los fondos genéticos utilizados en nuestro laboratorio. Se pretendía determinar así si todos los genes se transcribían y si existían diferencias temporales en el momento de su expresión. De esta manera, se procedió a la extracción de ARN total de una cepa silvestre (*h20*) en fase de crecimiento exponencial a 32°C en medio rico (YES) y se realizó un ensayo *Northern-blot*. Se emplearon sondas de ADN correspondientes a cada uno de los genes identificados para detectar sus transcritos. Para evitar la hibridación cruzada entre los distintos genes de esta familia, las sondas de ADN utilizadas eran fragmentos de

entre 400 y 500 pb obtenidos mediante PCR y correspondientes a las regiones 3' de los genes, ya que son las regiones que presentan una mayor divergencia entre ellos. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 28A y, como puede observarse, se detectaron transcritos correspondientes a cada uno de los genes estudiados, incluso para *gas2⁺*. Este resultado descarta la

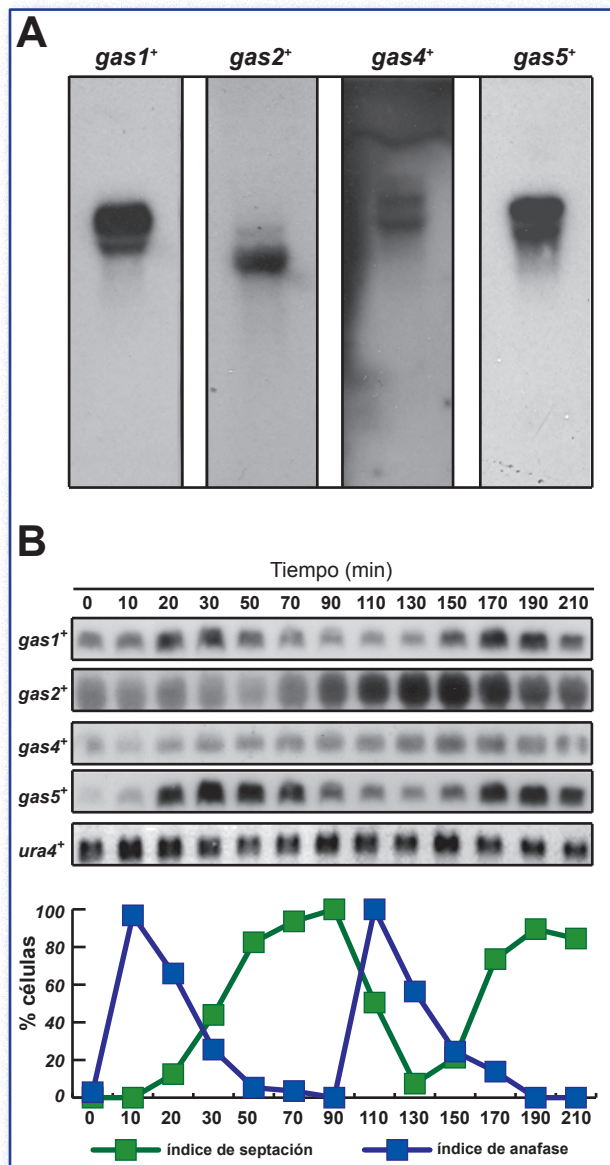


Figura 28. Expresión de los genes *gas⁺* durante el crecimiento vegetativo. (A) Los genes *gas⁺* se expresan a distintos niveles durante el crecimiento vegetativo. El ARNm extraído de la estirpe silvestre *h20* durante el crecimiento exponencial fue hibridado con sondas marcadas radiactivamente específicas para los genes *gas1⁺*, *gas2⁺*, *gas4⁺* y *gas5⁺*. (B) Expresión durante el ciclo celular. La sincronía fue inducida por bloqueo-liberación de un mutante *cdc25-22* y las muestras se tomaron a los tiempos indicados (minutos). El ARN fue hibridado con las mismas sondas. El gen *ura4⁺* se utilizó como control de carga. La gráfica representa el índice de anafase (■) y/o el de septación (■) para cada tiempo. En este experimento, el máximo de septación tuvo lugar a los 70-90 minutos.

posibilidad de que *gas2⁺* sea un pseudogen, presente en el genoma pero sin expresión. Asimismo, en dicha figura puede comprobarse que existen diferencias en el tamaño de los transcritos, habiendo, en general, una buena correlación entre el tamaño de las posibles fases de lectura y el ARN mensajero, salvo para *gas4⁺*. Resultó muy llamativo el hecho de encontrar un transcrito de mayor tamaño del esperado para *gas4⁺*. Según la información recogida en la base de datos *GeneDB*, los genes *gas2⁺* y *gas4⁺* poseen un número similar de nucleótidos. Por ello, cabría esperar que sus transcritos fuesen también de tamaño parecido y generasen proteínas similares en cuanto al número de aminoácidos que las forman. Sin embargo, como se comprobó en éste y otros ensayos tipo *Northern-blot* en los que la misma membrana fue hibridada sucesivamente con las sondas de *gas2⁺* y *gas4⁺*, el transcrito de este último gen era mayor. Por último, otra observación importante es que la detección del transcrito correspondiente al gen *gas4⁺* necesitó de una exposición mucho más larga que el resto de los genes (36 horas frente a 30 minutos), indicando que este gen se transcribe en menor cuantía que sus homólogos en las condiciones del ensayo (crecimiento vegetativo a 32°C en medio líquido YES).

Una vez comprobado que los cuatro genes se expresaban durante el crecimiento vegetativo, aunque en distinta cuantía, se decidió estudiar si existían variaciones cíclicas en su transcripción a lo largo del ciclo celular y, en caso afirmativo, en qué momento se producía el máximo de expresión. Para ello, su expresión fue analizada mediante ensayo de *Northern-blot* en un mutante *cdc25-22* que había sido sincronizado mediante un bloqueo a la temperatura restrictiva de 37°C y, posteriormente, liberado a 25°C, para recoger muestras a diferentes tiempos después del desbloqueo. Al examinar los niveles de los respectivos ARN mensajeros (ARNm) a lo largo del tiempo, se encontró que la expresión de tres de los genes (*gas1⁺*, *gas2⁺* y *gas5⁺*) estaba regulada a lo largo del ciclo celular (Fig. 28B). Curiosamente, los niveles máximos de expresión se alcanzaban en distintos momentos del ciclo celular. Así, como se observa en la Figura 28B, *gas1⁺* y *gas5⁺* pre-

sentaban un pico de expresión durante la mitosis, justo antes de la septación, mientras que el nivel del transcrito correspondiente a *gas2⁺* era mayor durante la fase G2 del ciclo. Por el contrario, cuando se examinaron los niveles de ARNm de *gas4⁺*, se encontró que el nivel de expresión de este gen era muy bajo, como se había observado anteriormente, pero constante a lo largo del ciclo celular y sin oscilaciones periódicas detectables (Fig. 28B). Estos datos permitieron concluir que los cuatro genes identificados mediante BLAST podrían ejercer su función en distintos momentos del ciclo celular y procesos biológicos. Más concretamente, *gas1⁺*, *gas2⁺* y *gas5⁺* actuarían durante el crecimiento mitótico, pero en diferentes momentos del crecimiento celular.

(III)- 2.2. La expresión de *gas4⁺* alcanza su máximo durante el proceso de esporulación

Ya que la expresión de *gas4⁺* era muy baja y constante durante el crecimiento vegetativo de *S. pombe*, cabía la posibilidad de que este gen se expresara y desempeñara su función durante otros procesos celulares, como ocurre con la expresión diferencial de los genes *cps1⁺/bgs1⁺*, *bgs2⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺* (Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2003). Por ello, se estudió la expresión del gen *gas4⁺* a lo largo del proceso de esporulación, analizando los niveles de ARNm mediante ensayo *Northern-blot* durante una meiosis sincrónica inducida en un mutante *pat1-114*. La proteína kinasa *pat1p* es necesaria para inhibir la meiosis en células diploides (Beach, 1985; McLeod y Beach, 1988). Cuando una cepa mutante homocigótica *h/h pat1-114/pat1-114* se incubaba en un medio pobre en nitrógeno y a la temperatura restrictiva (34°C), la inactivación de la actividad kinasa permite la inducción de la meiosis sincrónica en las células (Fig. 29A). Se recogieron muestras a diferentes tiempos después de transferir los cultivos a la temperatura restrictiva (34°C) y se utilizaron para extraer ARNm y analizarlas mediante un ensayo tipo *Northern-blot*. La progresión meiótica fue analizada mediante tinción del material nuclear con DAPI (Fig. 29B). El transcrito *gas4⁺* estaba presente en baja can-

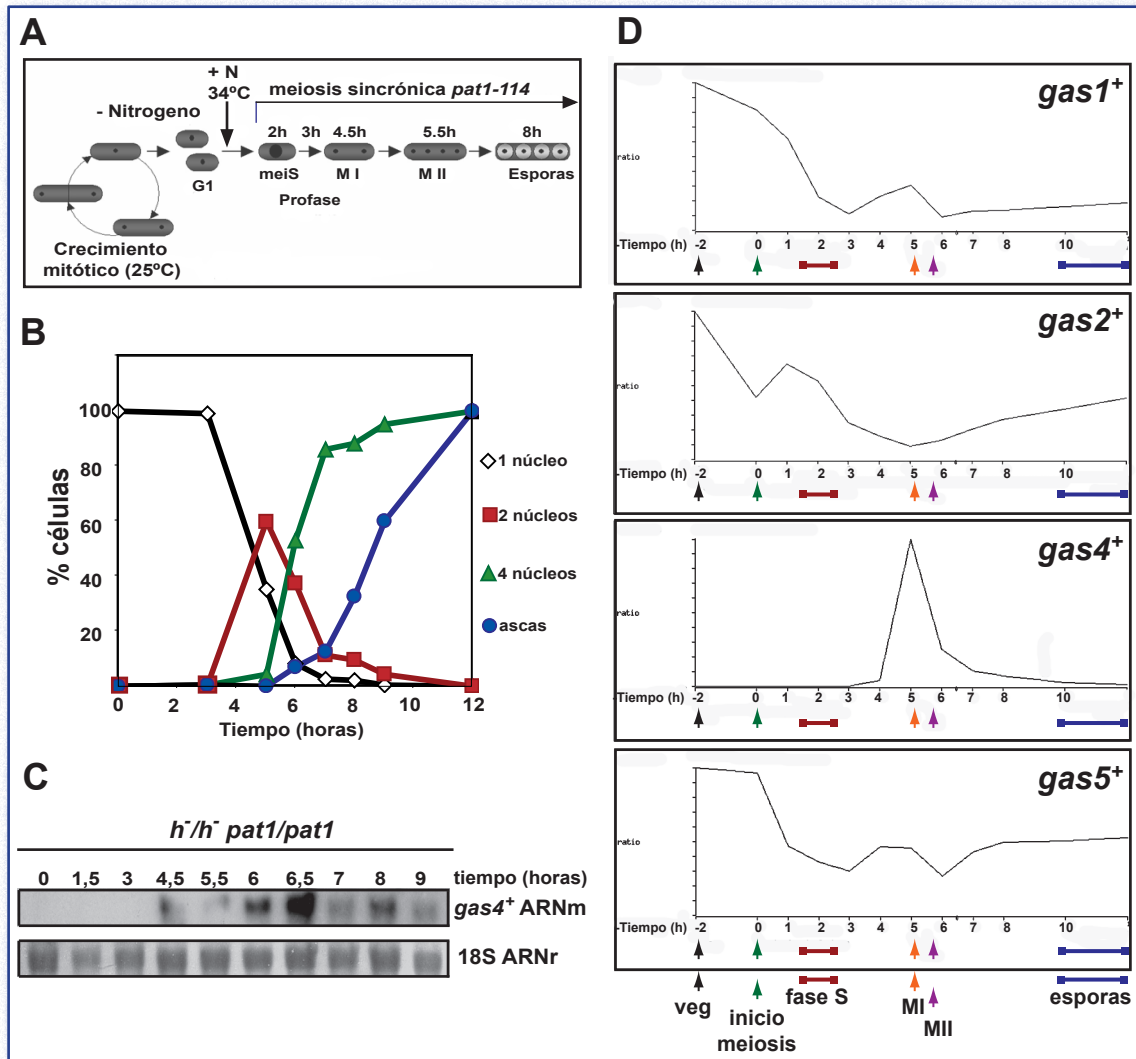


Figura 29. Expresión de los genes *gas+* durante meiosis. *gas4+* pertenece al grupo de los genes tardíos. (A) Representación esquemática de una meiosis sincrónica en un mutante *pat1-114*. El crecimiento en un medio carente de fuente de nitrógeno durante 14 horas produce un bloqueo de las células en la fase G1. La inactivación del alelo termosensible de la proteína quinasa *pat1p* por incubación a 34°C (tiempo 0 en B y C) induce la entrada sincrónica de las células en el proceso meiótico. El momento aproximado de los eventos meióticos más importantes se encuentra indicado en la figura. (B) Meiosis sincrónica de la estirpe S964 (*pat1-114*). La progresión meiótica fue monitorizada mediante la tinción de los núcleos con DAPI, y la formación de esporas mediante observación microscópica de las ascas. El porcentaje de células mononucleadas, binucleadas y tetranucleadas y de esporas para cada tiempo se halla representado. (C) Análisis tipo *Northern-blot* de la expresión de *gas4+* durante la meiosis sincrónica de la cepa S964 mostrada en (B). Los niveles de ARNr 18S fueron empleados como control de carga. (D) Patrón de expresión de los genes *gas+* durante la meiosis según los datos de *GeneDB*.

tividad en el momento en el que las células diploides fueron transferidas a la temperatura restrictiva (tiempo 0), pero su expresión se veía fuertemente inducida durante la meiosis y alcanzaba su máximo durante la meiosis II (6h), coincidiendo con el momento en el que se empezaban a detectar las primeras esporas maduras (Fig. 29C). Este perfil de inducción es similar al de los genes específicos de meiosis que han sido clasificados en el grupo tardío o *late group*, cuyos productos están implicados principalmente en la formación de las ascosporas (Mata *et al.*, 2002). De hecho, el patrón de expresión observado para *gas4+* durante la espo-

lución coincide perfectamente con el descrito recientemente para este gen en este análisis de la expresión génica global durante la esporulación usando microarrays (Fig. 29D).

La expresión de los tres genes que se expresan periódicamente durante el crecimiento vegetativo -*gas1+*, *gas2+* y *gas5+*- no se analizó durante la esporulación. Sin embargo, los datos del análisis global de la expresión génica durante la esporulación disponibles en *GeneDB* indican que ninguno de los tres se induce en este proceso, sino que los niveles de sus transcritos se reducen a lo largo de la esporulación (Fig. 29D) (Mata *et al.*,

2002). Considerando conjuntamente todos estos resultados, podemos concluir que hay una expresión diferencial de cada uno de los genes de la familia GH72 presentes en *S. pombe*. Así, mientras que el producto del gen *gas4*⁺ ejercería su función durante la esporogénesis, los otros tres genes se expresan preferentemente durante el ciclo mitótico. Además, estos últimos podrían tener funciones

diferentes (no redundantes), puesto que alcanzan picos de expresión en distintos momentos del ciclo celular (los niveles de ARNm de *gas1*⁺ y *gas5*⁺ son máximos en los instantes previos a la septación, mientras que *gas2*⁺ predomina durante anafase). Por esta razón, el papel de *gas4p* fue estudiado con mayor detalle durante la esporogénesis, como se verá en el Capítulo V de esta Memoria.

(IV)- RESULTADOS

**Caracterización funcional de los genes
gas⁺ durante crecimiento vegetativo**

(IV)- RESULTADOS: Caracterización funcional de los genes *gas*⁺ durante crecimiento vegetativo

(IV)- 1. La proteína *gas1p* es indispensable durante el crecimiento vegetativo, no así *gas2p*, *gas4p* y *gas5p*

Como se ha comentado en la Introducción, las β -glucanosiltransferasas desempeñan un papel importante en la remodelación de la pared celular de hongos y levaduras en distintas fases de su ciclo de vida. Para analizar si esta familia de proteínas también es importante en la síntesis de la pared celular en la levadura de fisión, se procedió a generar mutantes carentes de cada uno de estos genes en los que poder analizar los efectos de la ausencia de las proteínas. La delección de los genes *gas2*⁺, *gas4*⁺ y *gas5*⁺ se obtuvo fácilmente. Sin embargo, en el caso del gen *gas1*⁺ la obtención de mutantes fue más complicada y necesitó de varias estrategias alternativas que se describen a continuación.

(IV)- 1.1. Estrategia 1: Delección de la región codificante de cada gen

La primera aproximación para obtener mutantes carentes de los genes de la familia GH72 fue la siguiente: deleccionar la región codificante de cada uno de ellos mediante la generación de casetes de interrupción empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Wach, 1996). Así, se diseñaron cuatro casetes de delección que contenían el gen que confiere resistencia a la kanamicina (*gas1* Δ ::*KanMX4*, *gas2* Δ ::*KanMX4*, *gas4* Δ ::*KanMX4* y *gas5* Δ ::*KanMX4*) flanqueados por fragmentos de ADN de 400-500 pb aproximadamente, correspondientes a las regiones inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción y al codón de parada (Fig. 30A). Estos casetes fueron clonados en el vector KS para asegurar su dispo-

nibilidad mediante simple digestión con las restricciones apropiadas (ver Materiales y Métodos). Con dichos casetes de delección, se transformó la cepa haploide silvestre para reemplazar la copia silvestre de cada uno de los genes por el marcador de selección mediante recombinación homóloga. Sólo se obtuvieron transformantes carentes de los genes *gas2*⁺ (YMMR16), *gas4*⁺ (YMMR17) o *gas5*⁺ (YMMR18), que fueron debidamente reaislados y comprobados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Fig. 30B-D). En cada caso se analizaron diferentes transformantes, seleccionando aquellos en los que aparecía una banda específica del tamaño esperado. Las bandas amplificadas en la reacción de PCR para la comprobación de los mutantes fueron únicas en el caso de *gas2* Δ ::*KanMX4* y *gas4* Δ ::*KanMX4*. (Fig. 30B-C). En los posibles mutantes nulos *gas5*⁺, aparecían dos y hasta tres bandas amplificadas (Fig. 30D). Puesto que a) uno de los fragmentos de ADN se correspondía con el tamaño esperado, b) no se disponía de un control positivo en el que determinar que la pareja de oligonucleótidos 816 y 1037 anillaban en un único sitio en la cepa problema, y c) dichas amplificaciones no aparecían en el carril correspondiente a la estirpe silvestre, se asumió que los transformantes que presentaban dichas bandas contenían la delección buscada.

Antes de proceder al estudio detallado de los fenotipos de los mutantes construidos, se realizó un estudio morfológico preliminar al microscopio óptico durante el crecimiento vegetativo. Dado que los genes estudiados codificaban proteínas cuya función podría estar probablemente relacionada con la síntesis y/o remodelación de la pared celular, cabía la posibilidad de que las células presentaran defectos en la morfología o en la pared celular. Para los mutantes *gas2* Δ y *gas4* Δ no se observaron diferencias significativas con la cepa silvestre durante el crecimiento vegetativo, y la caracterización detallada de los mismos se explicará en los siguientes apartados de este Capítulo. Por el contrario, resultaron sorprendentes los resultados obtenidos en la observación microscópica del mutante YMMR18. Esta cepa, en teoría, debía contener la delección del gen *gas5*⁺ como parecía indicar la presencia de una banda de tamaño apropiado

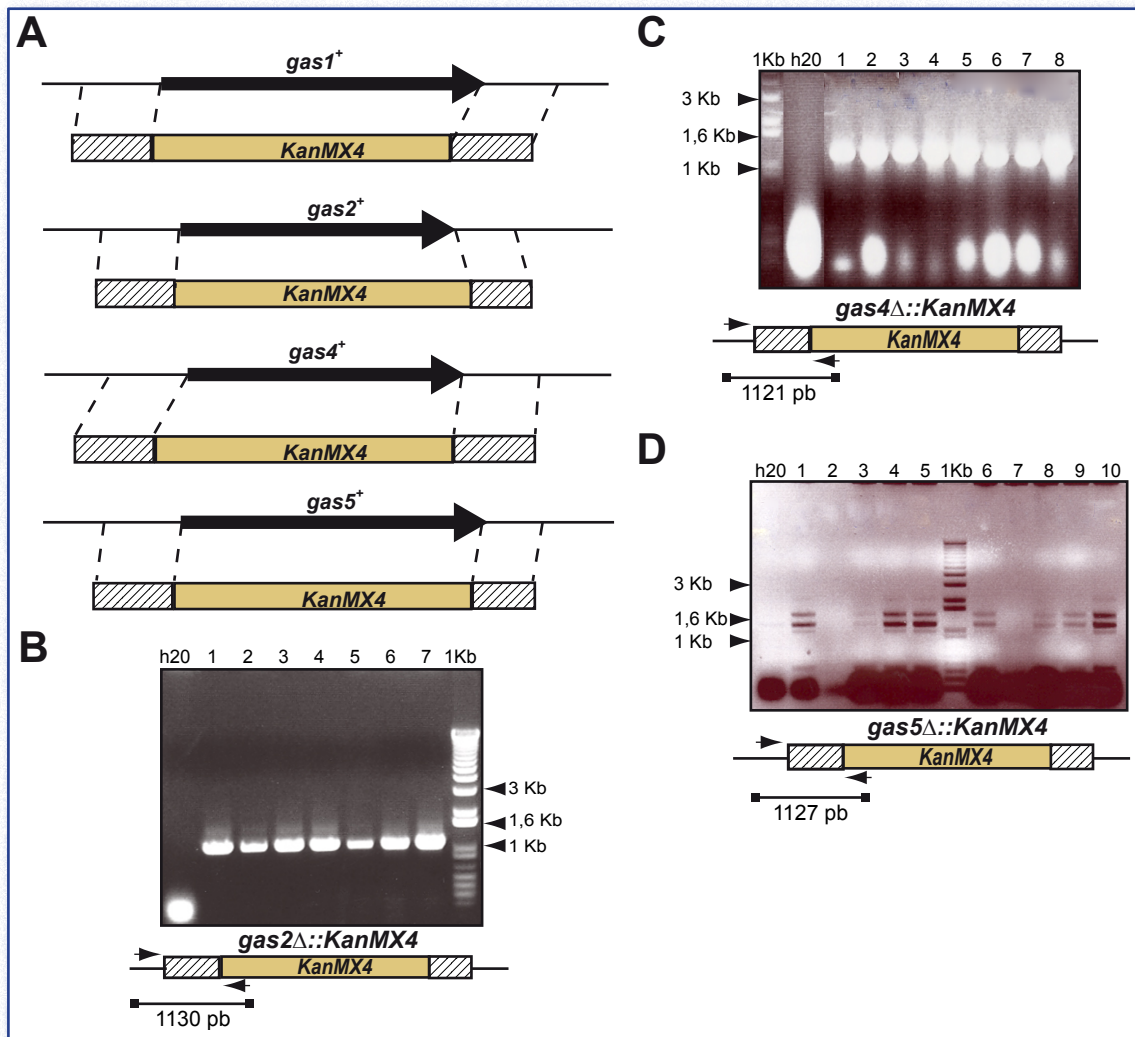


Figura 30. Delección de *gas1+*, *gas2+*, *gas4+* y *gas5+*. (A) Casetes de delección generados para reemplazar la región codificante completa de los genes *gas1+*, *gas2+*, *gas4+* y *gas5+* por el marcador de selección *KanMX4*, que confiere resistencia al antibiótico G418. (B) Comprobación de los mutantes *gas2Δ::KanMX4* mediante PCR. Distintos transformantes (YMMR16) fueron reaislados para obtener colonias puras, las cuales fueron analizadas por PCR, empleando un oligonucleótido externo al casete de delección que anillaba en la región flanqueante de cada gen, y otro que anillaba en la región codificante del gen de resistencia a la kanamicina. El tamaño esperado de la banda era de 1.130 pb. (C) Comprobación de los mutantes *gas4Δ::KanMX4* mediante PCR. Se analizaron diversos transformantes (YMMR17) de forma similar a la descrita en (B). El tamaño esperado de la banda era de 1.121 pb. (D) Comprobación de los transformantes que supuestamente portaban la delección de *gas5+* (YMMR18) mediante PCR. El tamaño esperado de la banda era de 1.127 pb.

obtenida en la comprobación por PCR mostrada en la Figura 30D. Sorprendentemente, el estudio al microscopio de la estirpe *gas5Δ* (YMMR18) reveló defectos en el acoplamiento de la mitosis y la citoquinesis. Como puede observarse en la Figura 31A, algunas células presentaban un defecto en la separación celular, otras, engrosamientos de la pared celular, pero lo más destacable era la existencia de septos aberrantes a modo de dobles tabiques, dejando un compartimento anucleado entre las dos células hijas. Además, también se pudo constatar que en muchos casos existía un defecto en la migración nuclear tras la mitosis. Así, era frecuente encontrar células en las que uno de

los núcleos no había migrado correctamente al polo celular correspondiente o que permanecía en la zona media de la célula durante la citoquinesis, entorpeciendo la síntesis del septo de división, de forma similar a los mutantes *cut* (Hirano *et al.*, 1986; Samejima *et al.*, 1993). Especialmente, este último defecto no parecía propio de la ausencia de una proteína supuestamente implicada en la síntesis y/o remodelación de la pared celular. Por ello, se procedió a confirmar que el fenotipo observado era realmente debido a la falta de *gas5p* en la célula.

La forma más sencilla para responder a esta cuestión era, con la ayuda de un plásmido, re-

introducir el gen *gas5*⁺ en la estirpe mutante y comprobar si complementaba los defectos observados. Aprovechando las auxotrofías de la cepa YMMR18, se clonó dicho gen con su propio promotor en el vector pAL-KS. Tanto el vector como el plásmido resultante (pMMR9) fueron introducidos en la cepa mutante YMMR18 para estudiar si dicho gen era capaz de revertir el fenotipo observado. Así, se incubaron a 32°C en medio líquido adecuadamente suplementado la estirpe YMMR18 sin plásmido, portando el vector o con el plásmido pMMR9. Sin embargo, al estudiar el aspecto los distintos transformantes al microscopio de fluorescencia para detectar la posición de los núcleos y de los septos, el resultado, sorprendentemente, fue que las tres se comportaban como una estirpe silvestre (datos no mostrados). Es decir, el supuesto mutante *gas5*Δ presenta defectos de segregación nuclear cuando crece en medio rico, pero no en medio mínimo. La explicación que se propone para este fenómeno es que, quizás, la menor tasa de crecimiento (esto es, un mayor tiempo de generación) de la levadura en medio mínimo podría proporcionar un tiempo suplementario para que las células terminen la mitosis correctamente. En la práctica, esto se tradujo en un impedimento para comprobar si la delección del gen *gas5*⁺ era la responsable del defecto en segregación nuclear mediante la aproximación planteada.

Por ello, fue preciso recurrir a una segunda estrategia para confirmar si la cepa YMMR18 realmente carecía del gen *gas5*⁺, empleando esta vez la técnica *Southern-blot*. Estudiando los sitios de restricción presentes en la región cromosómica circundante a *gas5*⁺, se seleccionaron restrictasas que digirieran el genoma y generaran fragmentos de tamaño distinto según el genoma contuviese el alelo silvestre *gas5*⁺ o la delección *gas5*Δ::*KanMX4*. Así, se extrajo el material genómico de una estirpe silvestre (h20) y de los distintos transformantes YMMR18 obtenidos y se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI. Para la detección de dichos fragmentos, se empleó la misma sonda específica para *gas5*⁺ que ya había sido utilizada en los estudios de expresión génica. Esta sonda anilla dentro de la región codificante del gen, por lo que debería detectar un fragmento de aproximadamente 1,1 Kb

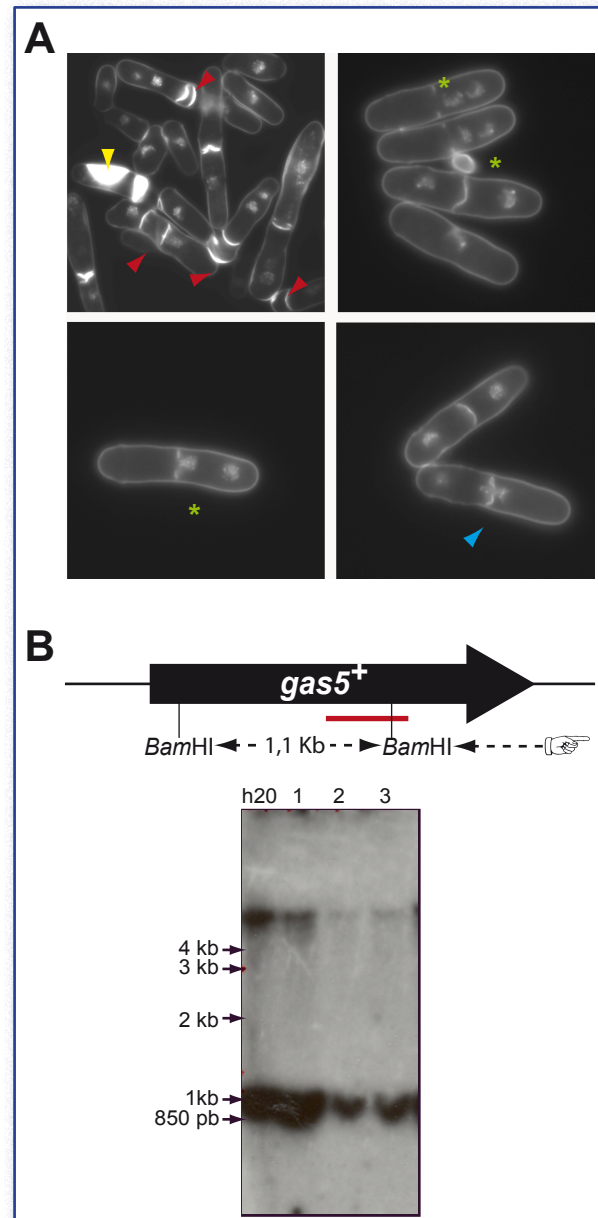


Figura 31. El transformante YMMR18 no es realmente un mutante nulo *gas5*Δ. (A) Fenotipo de la cepa YMMR18. Células de la estirpe YMMR18 fueron incubadas a 32°C en medio rico (YES), fijadas con etanol al 70%, lavadas y teñidas con azul de anilina y DAPI. Las puntas de flecha rojas señalan tabiques múltiples, mientras que la amarilla, acumulaciones anormales de material de pared celular. Los asteriscos verdes indican células con núcleos mal posicionados. Nótese el núcleo estrangulado por el septo de división, con una punta de flecha azul. (B) Análisis de *Southern-blot* de la cepa YMMR18. ADN genómico de una cepa silvestre (h20) y de los transformantes fueron digeridos con la enzima *Bam*HI e hibridados con la sonda específica de *gas5*⁺ (señalada en rojo en el esquema). Las bandas de 1.114 pb y 7 Kb corresponden al alelo silvestre de *gas5*⁺.

y una banda de 7 kb (existe un sitio *Bam*HI dentro de la región reconocida por la sonda) en la cepa silvestre, pero no debería hibridar con el ADN de aquellos transformantes en los que *gas5*⁺ hubiera sido delecionado correctamente (Fig. 31B). Cuando se analizó el resultado de la hibridación, en la

cepa silvestre se observó la presencia de dos bandas (de 1,1 y >7 kb). Estas dos bandas estaban también presentes en los distintos transformantes analizados, lo que indicaba que todos ellos contenían una copia del gen *gas5⁺*, y que el fenotipo observado no se debía a la ausencia de la proteína *gas5p* en la célula. El hecho de que la cepa YMMR18 fuese resistente al antibiótico G418 sugería que el casete de delección empleado se había integrado en otro lugar del genoma, interrumpiendo o modificando de alguna manera la fase de lectura de otro gen distinto, lo cual era la causa de los defectos observados en la migración de los núcleos.

Antes de diseñar un nuevo casete de delección para *gas5⁺* o de volver a realizar dicha delección con el mismo casete, las regiones flanqueantes al marcador de selección que se habían utilizado para dirigir su integración en el locus *gas5⁺* fueron analizadas para comprobar si presentaban similitud con otras regiones del genoma de *S. pombe* que pudieran explicar su integración en otra zona cromosómica. Para ello, se compararon las secuencias utilizadas con el genoma de *S. pombe* utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) y FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta/>), pero no se detectaron homologías significativas con ninguna otra región del genoma. Ello indujo a intentar de nuevo la delección de *gas5⁺* utilizando el mismo casete, aunque en este caso se empleó una estirpe silvestre diferente (h116). Dicha cepa se transformó con el casete *gas5Δ::KanMX4* y los transformantes resistentes a G418 obtenidos fueron reaislados y confirmados por PCR (Fig. 32A). En esta ocasión, la banda amplificada era única y correspondía con el tamaño esperado si la recombinación homóloga hubiese tenido lugar correctamente (1.127 pb), al contrario de lo observado para el mutante YMMR18 (Fig. 30D), donde se amplificaron dos bandas de tamaños similares. Este hecho parecía ya indicar que los transformantes obtenidos correspondían realmente a la delección de *gas5⁺*. A pesar de ello, y debido a los resultados obtenidos en el fondo genético h20, se realizó un análisis de tipo *Southern* para confirmar que los transformantes carecían del gen *gas5⁺*. Así, una vez extraído el material genómico de

la cepa silvestre (h116) y de los transformantes, éste fue digerido con las enzimas de restricción *Hind*III o *Bam*HI y se analizó mediante hibridación con una sonda específica para *gas5⁺* marcada radiactivamente. Esta sonda debería detectar en la cepa silvestre el fragmento de 1,1 Kb y el de >7 kb descrito anteriormente cuando el ADN era digerido con *Bam*HI, y una banda de 5,7 Kb cuando era cortado con *Hind*III, pero en ninguno de los dos casos debería hibridar con el ADN de

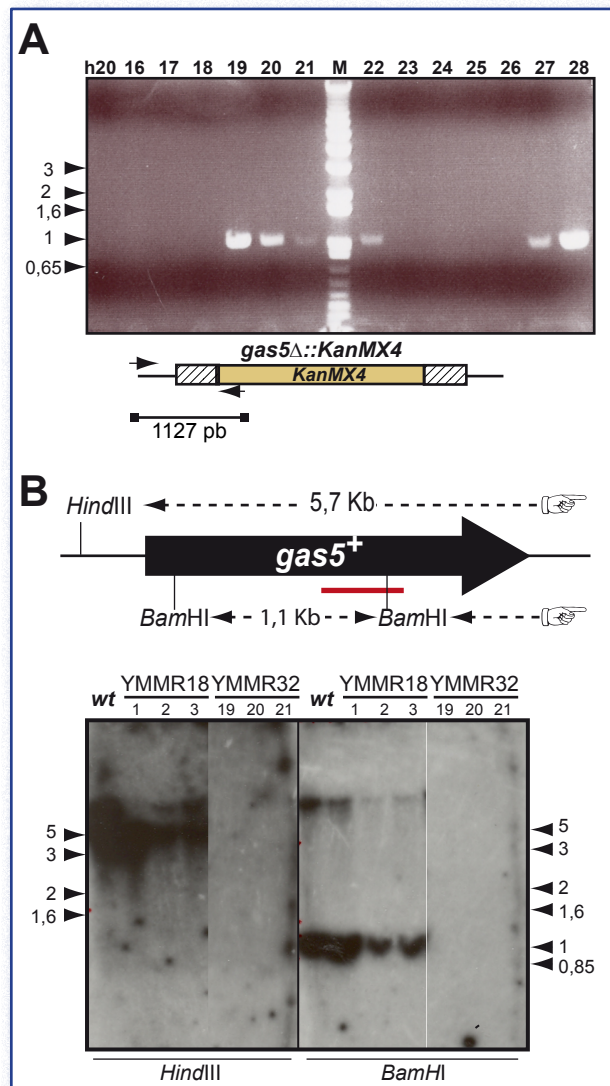


Figura 32. Comprobación de la correcta delección de *gas5⁺* en el transformante YMMR32. (A) Comprobación de la cepa YMMR32 mediante PCR. Los transformantes obtenidos fueron analizados mediante PCR utilizando los mismos oligonucleótidos (816 y 1041) que en la Figura 30D. El tamaño del marcador molecular está indicado en kilobases (Kb). (B) Comprobación de la cepa YMMR32 mediante *Southern-blot*. ADNg de la cepa silvestre (h116), de tres clones de YMMR18 y de los transformantes obtenidos (YMMR32) fue digerido con *Hind*III o *Bam*HI e hibridados con la sonda específica de *gas5⁺*. La banda de 5,7 Kb (en el caso de la digestión con *Hind*III) y las bandas de 1,1 y > 7 Kb (cuando se digirió con *Bam*HI) se corresponden con el alelo silvestre de *gas5⁺*. El tamaño molecular está indicado en kilobases (Kb).

los transformantes en los que *gas5⁺* hubiera sido deletado correctamente. Conforme a lo esperado, únicamente se detectó señal radiactiva en la estirpe silvestre y en los transformantes derivados de la cepa h20 (YMMR18), pero no en los transformantes derivados de la cepa h116 (Fig. 32B). Estos resultados indicaron que la delección del gen *gas5⁺* se había realizado satisfactoriamente, obteniéndose así la cepa YMMR32 (*gas5Δ*).

Puesto que los mutantes *gas2Δ* y *gas5Δ* se habían obtenido en cepas de tipo sexual opuesto, mediante cruce genético entre las cepas YMMR16 e YMMR32 se obtuvo el doble mutante *gas2Δ gas5Δ* (YMMR41). No se generó ningún doble mutante *gas2Δ gas4Δ* o *gas4Δ gas5Δ* puesto que, como se indicó en el apartado anterior, el gen *gas4⁺* no parecía expresarse durante el crecimiento vegetativo.

(IV)- 1.2. Estrategia 2: Represión de *gas1⁺* mediante un promotor regulable

Tras varios intentos de obtener mutantes con el casete de delección *gas1Δ::KanMX4* en células haploides, no se obtuvo ningún transformante que portara la delección del gen, por lo que cabía la posibilidad de que el gen *gas1⁺* fuera esencial para la viabilidad celular. Por ello, se utilizó una cepa silvestre diploide (HVP24) como receptora de la transformación, con la intención de generar mutantes heterocigóticos en los cuales existiera una copia silvestre del gen *gas1⁺* y una copia reemplazada por el gen de resistencia a la kanamicina. Sin embargo, tampoco fue posible obtener transformantes resistentes a G418 en varias transformaciones independientes. Varias hipótesis podrían explicar estos hechos: a) el casete de delección no estaba bien construido, bien por carecer de alguna de las secuencias flanqueantes necesarias para dirigir la integración o bien porque la reacción de PCR hubiera introducido errores en la región codificante del gen marcador de selección, con lo cual las células podían estar integrando el casete en su genoma pero no eran capaces de desarrollar resistencia al antibiótico; b) el gen *gas1⁺* era esencial y, además, la dosis génica era importante para mantener la viabilidad celular en células

diploides; y c) la región del genoma en la que se encuentra el gen *gas1⁺* podría ser poco recombinogénica, dificultando la integración de cualquier fragmento de ADN.

Para descartar la primera posibilidad, el casete de delección clonado en el vector KS fue secuenciado con oligonucleótidos que anillaban en las regiones flanqueantes del vector para comprobar que las regiones del genoma de *S. pombe* habían sido clonadas y que correspondían con las regiones del extremo 5' y 3' del gen *gas1⁺*. Adicionalmente, para descartar que durante la amplificación del marcador de selección se hubieran producido errores que alteraran la fase de lectura del gen *KanMX4*, se reemplazó la región codificante de este gen por otra obtenida a partir del plásmido pFA6a*KanMX4* mediante digestión con enzimas de restricción apropiadas. Este nuevo casete confirmado fue utilizado para transformar la cepa diploide, pero tampoco se obtuvieron transformantes resistentes a G418.

Estos resultados indicaban que la primera de las posibilidades descrita no era correcta, por lo que se diseñaron dos estrategias alternativas para tratar de obtener mutantes condicionales que contuvieran la proteína *gas1p* en unas condiciones de crecimiento y carecieran de ella o expresaran una proteína *gas1p* defectuosa en otras. La primera estrategia consistió en controlar la expresión del gen *gas1⁺* mediante un promotor regulable que pudiera ser reprimido fácilmente. La segunda fue tratar de generar mutantes termosensibles, capaces de crecer a 25°C pero no a 37°C.

Para reprimir la expresión de *gas1⁺*, se creó una construcción para sustituir en el genoma el promotor de *gas1⁺* por el promotor regulable *Pnmt1* (nmt: *no messenger in thiamine*) (Bähler *et al.*, 1998). De las diversas versiones existentes de este promotor (3X, 41X y 81X), se escogió la variante 81X, por ser la que genera una menor transcripción del gen en ausencia de tiamina y, por tanto, su represión es más fácil. La construcción diseñada llevaba como extremos regiones de 80 pb homólogas a las presentes en la región 5' (precedente al ATG) del gen que se pretendía sustituir. Además, incorporaba el gen de resistencia a la kanamicina

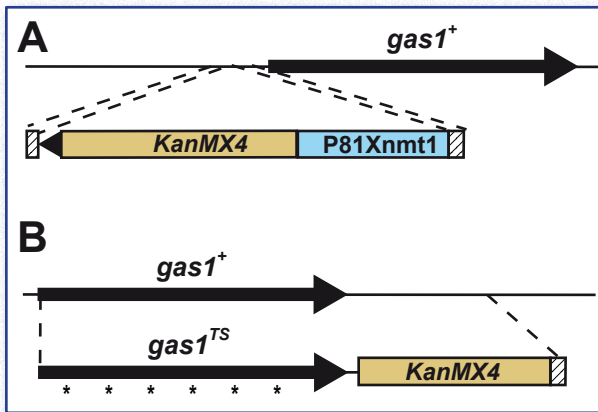


Figura 33. Otras aproximaciones para la obtención de estirpes carentes de *gas1+*. (A) Casete para la represión del gen *gas1+*, sustituyendo el promotor del gen por el promotor regulable *P81nmt1* sustituiría. (B) Casete para la obtención de mutantes termosensibles de *gas1+*. Los asteriscos pretenden indicar las posibles mutaciones que se habrían incorporado mediante la PCR degenerada.

como marcador de selección (Fig. 33A). Una vez construido el casete, se transformaron cepas silvestres haploides y diploides, sembrando siempre las células en un medio carente de tiamina para mantener la expresión de *gas1+*. De nuevo, no se obtuvieron transformantes resistentes a G418 en ninguna de las dos cepas receptoras utilizadas. Esta estrategia tampoco permitió determinar si el gen *gas1+* era esencial, aunque la ausencia de transformantes resistentes parecía indicar un defecto en la recombinación en ese *locus* genómico.

(IV)- 1.3. Estrategia 3: Generación de mutantes termosensibles de *gas1+*

Al mismo tiempo que se construían las cepas con el promotor regulable, se trató de generar mutantes termosensibles en el gen *gas1+*. Para llevar a cabo esta aproximación, se amplificó la región codificante del gen *gas1+* mediante PCR en condiciones en las que se favorecía la aparición de mutaciones. Para ello, la mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) utilizados no presentaba la misma concentración de cada uno de ellos, sino que las concentraciones de dCTP y dGTP eran 10 veces mayores que las de dATP y dTTP. El producto de esta PCR degenerada se fusionó mediante una nueva reacción de PCR al gen de resistencia a la kanamicina, seguida de una región de 500 pb homólogas a la región 3' adyacente a *gas1+* (Fig.

33B). Con dicho casete se transformaron cepas silvestres haploides y diploides.

Este casete de delección generado en realidad era una mezcla de muchos alelos diferentes entre los que habría algunas mutaciones que aboliesen completamente la actividad catalítica de la proteína, otras mutaciones (mutaciones sinónimas y silenciosas) que generarían una proteína silvestre y otras que resultarían en proteínas termosensibles. En el caso de que *gas1+* fuera un gen esencial, las células que recibieran el primer tipo de mutaciones resultarían inviables. Las mutaciones sinónimas o silenciosas generarían transformantes capaces de crecer a cualquier temperatura. Por último, las mutaciones que condicionasen el plegamiento o la actividad de la proteína según la temperatura, producirían transformantes resistentes a kanamicina capaces de crecer a baja temperatura (25°), no así a la temperatura restrictiva (37°C). De este modo, para seleccionar los mutantes termosensibles, una vez obtenidos los distintos transformantes, deberían ser reaislados e incubados a 25°C y 37°C, seleccionando aquellos que fueran capaces de crecer únicamente a la temperatura permisiva.

Esta aproximación no permitió la obtención de ningún transformante termosensible, ya que no fue posible obtener transformantes resistentes a kanamicina tras varios intentos de transformación con el casete generado. Este hecho fue llamativo, pues sugería que los eventos de recombinación en la región cromosómica que contenía a *gas1+* eran menos frecuentes o se encontraban con más dificultades que en otras regiones genómicas, a pesar de que en esta ocasión se usaron regiones diferentes del genoma para dirigir la integración del casete.

(IV)- 1.4. Estrategia 4: Interrupción de la región codificante de *gas1+*

Los primeros resultados arriba descritos parecían señalar que *gas1+* era realmente un gen esencial para la célula (por lo que no se obtenían transformantes a partir de cepas haploides) y a que la dosis génica del mismo podría ser un factor importante para la viabilidad del organismo (lo que explicaría la imposibilidad de generar mutantes en

cepas diploides, con una única copia silvestre del gen). Sin embargo, la ausencia de transformantes resistentes a G418 cuando se intentó generar mutantes termosensibles (entre los que debían de aparecer transformantes portando mutaciones que no afectarían a la proteína) parecía indicar que la razón se debería a una baja eficiencia de recombinación en esa región cromosómica. No obstante, los resultados negativos nunca son concluyentes, por lo que se decidió utilizar una nueva y última estrategia para tratar de anular la función de este gen. Dicha aproximación consistió en generar un nuevo casete de delección en el que el gen de resistencia a la kanamicina (con promotor y terminador propios) estaba flanqueado por regiones de ADN correspondientes a la región codificante de *gas1⁺* (posiblemente mejor conservadas que las flanqueantes) (Fig. 34A). De esta manera, se reemplazaba únicamente la región central que contiene el dominio GluTD por el marcador de selección. La hipotética proteína generada en las cepas con esta construcción contendría únicamente los primeros 148 aminoácidos, aunque carecería de gran parte del dominio GluTD responsable de su actividad catalítica y, presumiblemente, de su función biológica. Asimismo, al introducir el marcador de selección con regiones adyacentes que no se traducen, se evitaría también la transcripción y traducción de las regiones situadas por debajo del marcador, como los dominios *Ser-rich*, *Cys-rich* y la región hidrofóbica del extremo carboxilo. Siguiendo este planteamiento, se transformó la cepa diploide HVP24 con la construcción que se muestra en la Figura 34A y se obtuvieron cuatro transformantes (YMMR104). Dichos transformantes se reaislaron en medio suplementado con G418, creciendo únicamente 3 de ellos. Se tomaron dos colonias de cada uno de los reaislados y se comprobó mediante PCR que la integración había ocurrido en el *locus* de *gas1⁺* utilizando un oligonucleótido que anillaba en el marcador de selección y otro externo a la región usada para dirigir la recombinación (Fig. 34A). En cuatro de las colonias analizadas se observó la presencia de una banda de amplificación del tamaño esperado, en torno a 1,6 Kb (Fig. 34B). Sin embargo, dada la dificultad para obtener transformantes en

intentos anteriores, se consideró que era necesario confirmar plenamente que se había generado una cepa heterocigótica antes de continuar con su estudio. Por ello se realizó una hibridación del ADN genómico digerido con las enzimas *NheI* o

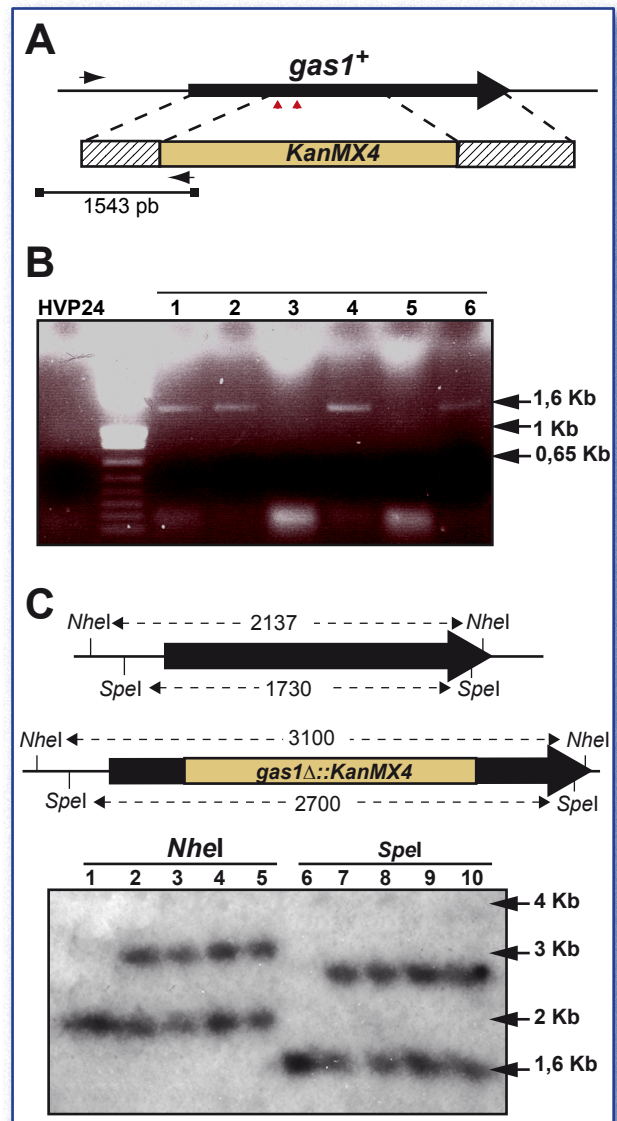


Figura 34. Interrupción del gen *gas1⁺*. (A) Casete de interrupción de la región GluTD de *gas1⁺*. Las puntas de flecha indican la posición de los posibles aminoácidos catalíticos. (B) PCR de comprobación de la cepa heterocigótica YMMR104. Los transformantes obtenidos fueron analizados mediante PCR utilizando un oligonucleótido externo al casete y homólogo a la región promotora del gen *gas1⁺* y un oligonucleótido que anillaba en la región del marcador de selección. Los carriles 1 y 2 son duplicados del primer transformante; los carriles 3 y 4 son duplicados del segundo, y 5 y 6, del tercero. (C) Southern blot de la cepa heterocigótica *gas1⁺/gasΔ* YMMR104. ADNg de una cepa silvestre (carriles 1 y 6) o de los distintos clones transformantes (carriles 2-5 y 7-10) fueron digeridos con *NheI* (carriles 1-5) o *SpeI* (carriles 6-10). La banda de 2.138 pb corresponde a la forma nativa de *gas1⁺* en los carriles 1-5, mientras que la banda de 3.108 pb corresponde a la interrupción *gas1Δ::KanMX4* (carriles 2-5). De manera análoga, en los carriles 6-10, la banda de mayor movilidad electroforética (1.730 pb) corresponde a *gas1⁺*, mientras que la de menor movilidad (2.700 pb) es *gas1Δ::KanMX4* (carriles 7-10).

SpeI con una sonda específica para *gas1*⁺. Este análisis confirmó la presencia de la copia silvestre de *gas1*⁺ en la cepa receptora de la transformación (fragmentos de 2,1 Kb y 1,7 Kb) mientras que los cuatro transformantes obtenidos eran heterocigóticos, ya que poseían una copia silvestre y, además, una copia interrumpida (fragmentos de 3,1 Kb y 2,7 Kb, Fig. 34C).

Se indujo la esporulación en los diploides heterocigóticos para *gas1*⁺ y se realizó un análisis de las tétradas en medio rico para obtener mutantes nulos haploides. Dicho análisis mostró que cada asca contenía dos esporas viables y dos inviables, y que las esporas viables generaban siempre colonias sensibles a G418 (*kan*^s), es decir, eran portadoras de la copia silvestre del gen (Fig. 35A). Con la ayuda de un macroscopio se estudió el aspecto de las esporas que habían sido incapaces de formar colonias viables, comprobando que la mayoría de ellas eran capaces de germinar, generando dos o tres células redondeadas que se lisaban (Fig. 35C). Por el contrario, cuando el análisis de tétradas se realizó en medio rico suplementado

con sorbitol 1,2 M, se obtuvieron cuatro esporas viables en las que las esporas portadoras del alelo mutante *gas1Δ::KanMX4* eran capaces de formar colonias, aunque de tamaño ligeramente inferior al de la cepa silvestre. A continuación, las colonias generadas fueron replicadas en a) medio rico con soporte osmótico y suplementado con el antibiótico G418 y b) en medio rico en ausencia de sorbitol. Los resultados de este ensayo mostraron que las colonias resistentes al antibiótico, es decir, las colonias *gas1Δ*, eran incapaces de crecer en ausencia de sorbitol (Fig. 35B). Las colonias resistentes a G418 fueron seleccionadas como cepas haploides *gas1Δ* y denominadas YMMR106.

Como se intuía en los resultados mostrados en la Figura 35C, la ausencia de *gas1*⁺ parecía provocar graves defectos en la célula que impedían su crecimiento en ausencia de un estabilizador osmótico. Para corroborar esta observación, se sembraron en medio sólido sin sorbitol tanto la cepa silvestre como la cepa YMMR106, que previamente habían sido cultivadas en medio sólido con estabilizador osmótico. En esta ocasión, al

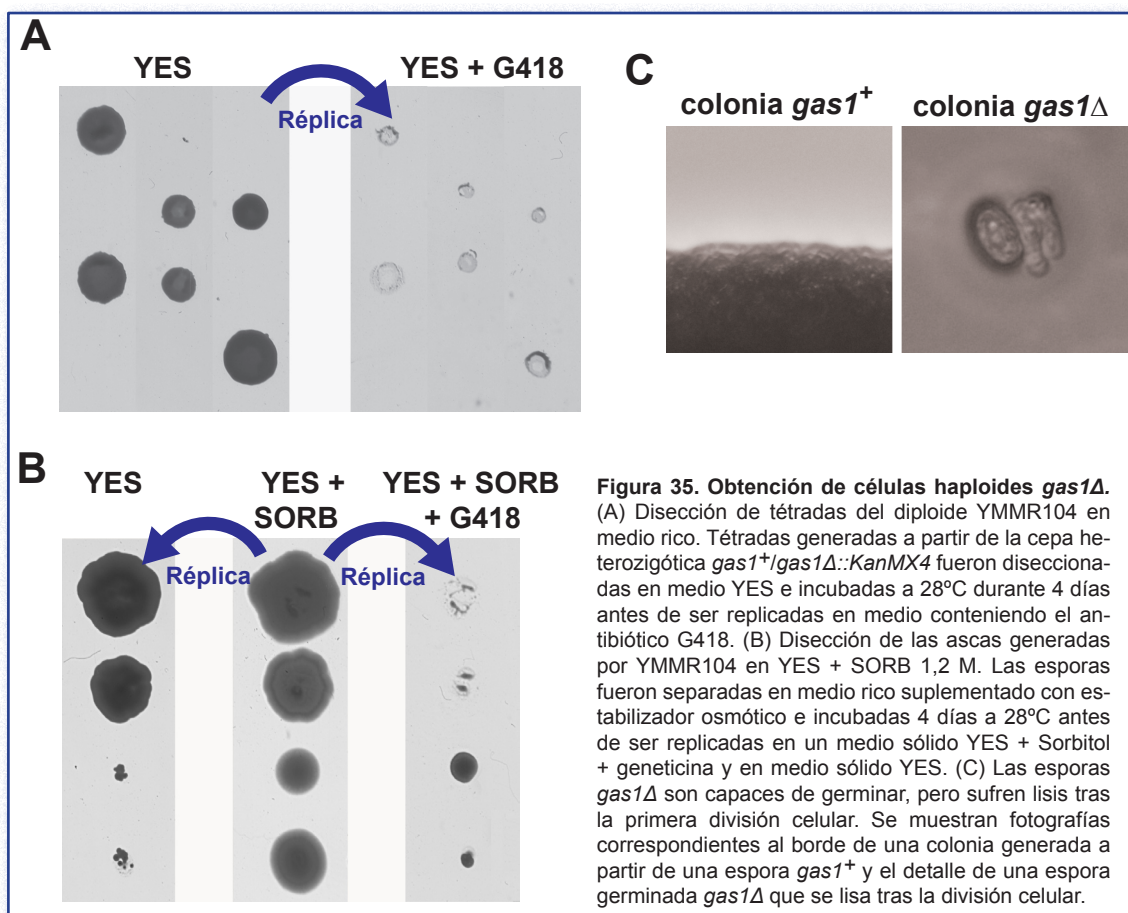


Figura 35. Obtención de células haploides *gas1Δ*. (A) Disección de tétradas del diploide YMMR104 en medio rico. Tétradas generadas a partir de la cepa heterocigótica *gas1*⁺/*gas1Δ::KanMX4* fueron diseccionadas en medio YES e incubadas a 28°C durante 4 días antes de ser replicadas en medio conteniendo el antibiótico G418. (B) Disección de las ascas generadas por YMMR104 en YES + SORB 1,2 M. Las esporas fueron separadas en medio rico suplementado con estabilizador osmótico e incubadas 4 días a 28°C antes de ser replicadas en un medio sólido YES + Sorbitol + geneticina y en medio sólido YES. (C) Las esporas *gas1Δ* son capaces de germinar, pero sufren lisis tras la primera división celular. Se muestran fotografías correspondientes al borde de una colonia generada a partir de una espora *gas1*⁺ y el detalle de una espora germinada *gas1Δ* que se lisa tras la división celular.

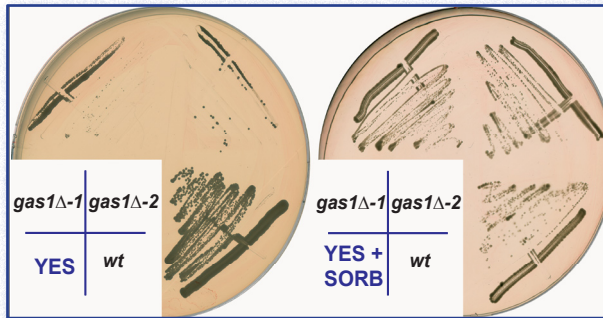


Figura 36. Las células carentes de *gas1p* requieren la presencia de estabilizador osmótico en el medio de cultivo. El mutante nulo *gas1Δ* es incapaz de crecer en ausencia de estabilizador osmótico. Las cepas h116 e YMMR106 (transformantes 1 y 2) fueron inoculadas en medio rico sólido con y sin sorbitol 1,2 M, e incubadas durante 3 días a 32°C antes de tomar las fotografías.

igual que en la anterior, sólo la cepa poseedora de la copia silvestre de *gas1+* era capaz de crecer (Fig. 36). Finalmente, para tener la certeza de que el fenotipo lítico era únicamente debido a la delección de *gas1+*, este gen fue clonado en un vector pAL-KS, generando el plásmido pMMR13. Células mutantes fueron transformadas con el vector (control negativo) y con el plásmido pMMR13. Los transformantes obtenidos fueron sembrados en medio mínimo (suplementado con los requerimientos nutricionales necesarios pero carente de soporte osmótico) e incubados durante tres días a 32°C. Se pudo comprobar así que la expresión ectópica de *gas1+* conseguía revertir el fenotipo de lisis celular (datos no mostrados).

Todos los resultados descritos hasta el momento llevaron a concluir que *gas1+* es un gen esencial para la viabilidad celular, mientras que *gas2+*, *gas4+* y *gas5+* son dispensables durante el crecimiento vegetativo de la célula. Cabe también destacar que *gas1p* no parece ser necesaria para la germinación de las esporas, pero sí para el crecimiento mitótico. Además, los experimentos llevados a cabo para la obtención de mutantes *gas1Δ* indican que las regiones cromosómicas que flanquean el gen *gas1+* no son susceptibles de sufrir eventos de recombinación homóloga fácilmente.

(IV)- 2. Crecimiento vegetativo de los mutantes de delección generados

El hecho de que un gen se exprese preferentemente durante un proceso determinado no excluye la posibilidad de que pueda estar realizando también alguna función en aquellos momentos en los que su expresión es inferior. Así, el gen *eng2+* se expresa durante el crecimiento mitótico pero los niveles de su ARNm aumentan varias veces al final del proceso de esporulación. Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que, si bien *eng2p* parece desempeñar un papel importante en la hidrólisis de la pared del asca y liberación de las ascosporas, también está implicado en procesos de polaridad durante el ciclo celular mitótico (Javier E. del Dedo, comunicación personal). Por esta razón, la cepa *gas4Δ* también se incluyó en los estudios preliminares de los mutantes de delección: determinación del tiempo de generación y estudio fenotípico al microscopio óptico.

Una de las primeras cuestiones abordadas en el estudio de mutantes de delección es determinar si su tasa de crecimiento varía respecto a la cepa silvestre parental. Así, para investigar si el tiempo de generación estaba alterado en alguno de los mutantes nulos generados, se realizaron ensayos de crecimiento en medio líquido, comparándolas con las cepas silvestres h20 y/o h116. En estos ensayos, a partir de cultivos líquidos que habían crecido O/N en medio rico líquido se inocularon nuevos cultivos y se incubaron en agitación a 32°C y a 37°C. Se recogieron muestras a distintos tiempos y se determinó el crecimiento celular por el incremento en la turbidez de los mismos, lo cual se controló mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (ver Materiales y Métodos). Los datos así obtenidos se representaron gráficamente (Fig. 37) y se compararon las curvas correspondientes a cada una de las cepas estudiadas. Los resultados indicaron que, en el caso de las cepas *gas2Δ* (YMMR16), *gas4Δ* (YMMR17), *gas5Δ* (YMMR32) y el mutante doble *gas2Δ gas5Δ* (YMMR41), no se observaba ninguna diferencia significativa en el crecimiento entre las estirpes mutantes y las silvestres en las distintas temperaturas ensayadas (Fig. 37A). Es

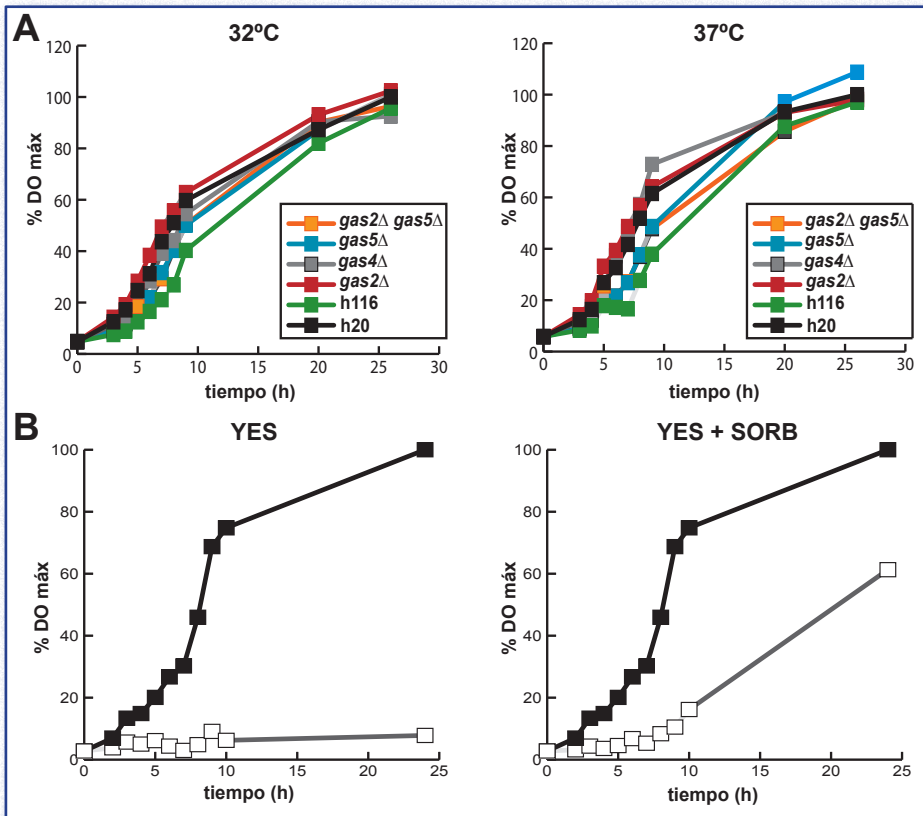


Figura 37. Crecimiento vegetativo en medio líquido de los mutantes *gas1Δ*, *gas2Δ*, *gas4Δ*, *gas5Δ* y *gas2Δ gas5Δ*. (A) Curvas de crecimiento de las estirpes silvestres h20 (■) y h116 (■) y de los mutantes *gas2Δ* (■), *gas5Δ* (■), *gas4Δ* (■), *gas5Δ* (■) y *gas2Δ gas5Δ* (■) a 32 °C (izquierda) y 37°C (derecha). Los mutantes generados no muestran diferencias aparentes de crecimiento respecto a la estirpe silvestre. (B) Tasa de crecimiento de las estirpes *gas1+* (■) y *gas1Δ* (□) en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) de un estabilizador osmótico en el medio de cultivo.

decir, durante el crecimiento mitótico, los mencionados mutantes eran viables a todas las temperaturas y no mostraron ningún defecto aparente de crecimiento. En medio mínimo, los resultados obtenidos fueron similares (datos no mostrados).

Por otro lado, para determinar el tiempo de generación del mutante *gas1Δ*, se analizó el efecto de la presencia o la ausencia de un estabilizador osmótico en el medio de cultivo (sorbitol a una concentración de 1,2 M). Así, se prepararon preinóculos en medio YES + sorbitol 1,2 M de las cepas silvestre y *gas1Δ* y se incubaron toda una noche a 32°C en agitación. Posteriormente, cada uno de los cultivos fue diluido en medio rico con y sin sorbitol y se incubaron de nuevo a 32°C en agitación. Al tomar muestras de cada uno de los cultivos a distintos tiempos y calcular la turbidez de los mismos, se obtuvieron los datos representados en la Figura 37B. Como se observa en dichas gráficas, el mutante *gas1Δ* era incapaz de crecer en medio sin soporte osmótico, a diferencia de la cepa *gas1+*. Este fenotipo se revertía parcialmente cuando el medio contenía sorbitol, pero también se observaba una menor tasa de crecimiento respecto de la estirpe silvestre. No se observó termosensibilidad para dicho mutante (datos no mostrados).

(IV)- 3. Morfología de los mutantes de delección durante el ciclo mitótico

La morfología de las células mutantes fue también analizada durante el crecimiento a distintas temperaturas mediante su observación al microscopio, utilizando azul de anilina para teñir el β -1,3-glucano de la pared celular (Kippert y Lloyd, 1995). No se observaron diferencias significativas entre el mutante *gas2Δ*, el mutante *gas4Δ*, el mutante *gas5Δ* y la cepa silvestre (Fig. 38). Adicionalmente, el mutante doble *gas2Δ gas5Δ* tampoco presenta defectos morfológicos, a pesar de que ambos genes se expresan en distintos momentos del ciclo celular. Estos resultados indican que las proteínas *gas2p* y *gas5p* son prescindibles para el crecimiento vegetativo en *S. pombe*. En los siguientes apartados de este Capítulo se continuará con la descripción de los genes *gas+* que parecen desempeñar un papel durante el crecimiento mitótico.

Por el contrario, las células *gas1Δ* que habían sido cultivadas en medio con sorbitol eran de menor longitud y más redondeadas que las de la cepa silvestre, apareciendo, además, algunas células lisadas (Fig. 39A). Asimismo, la tinción de

la pared celular era en muchos casos menos uniforme que la observada en las células silvestres, detectándose acúmulos de material que se teñían más intensamente y de forma irregular (Fig. 39A,

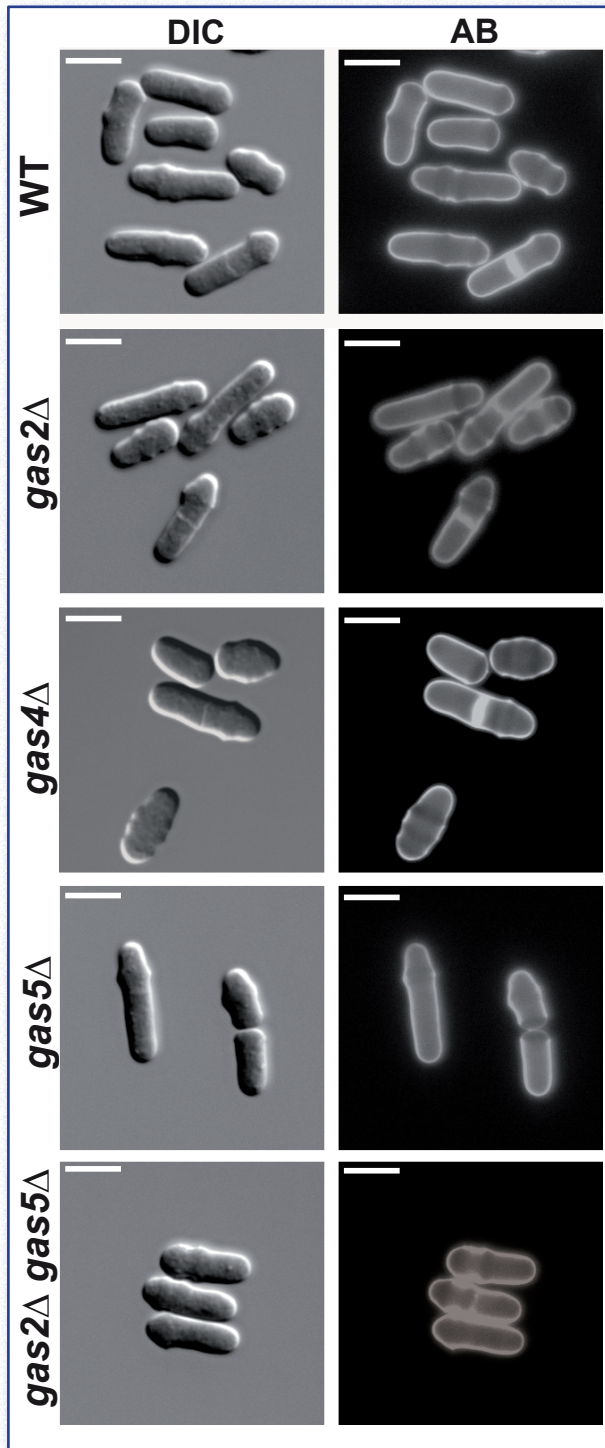


Figura 38. Aspecto microscópico de las células silvestres y las células mutantes *gas2Δ*, *gas4Δ*, *gas5Δ* y *gas2Δ gas5Δ*. La cepa silvestre (h20) y las mutantes *gas2Δ*, *gas5Δ* y *gas2Δ gas5Δ* (YMMR16, YMMR32 e YMMR41, respectivamente) fueron incubadas en medio rico (YES), fijadas con etanol al 70%, lavadas y teñidas con azul de anilina. En la figura se muestran fotografías de microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC) o teñidas con azul de anilina (AB, de *aniline blue*). Barras de escala, 10 μ m.

flechas). Cuando las células mutantes se transferían a un medio sin estabilizador osmótico y se cultivaban en estas condiciones durante un par de horas, cesaban de crecer y presentaban un porcentaje de células lisadas cercano al 60% mientras que el 40% restante presentaban un aspecto vacuolizado, y cerca de la mitad de ellas habían perdido la polaridad y se habían vuelto redondeadas (Fig. 39B y C). Es interesante destacar que muchas de las células lisadas (más del 40% del total) presentaban un defecto terminal similar, ya que aparecían como parejas de células en las que se había producido la lisis durante la separación celular (Fig. 39A). Cuanto más se prolongaba el tiempo de incubación en medio sin soporte osmótico, mayor era el número de células lisadas en los cultivos (datos nos mostrados), lo cual concuerda con los datos representados en las curvas de crecimiento.

El hecho de que la mayoría de las células lisadas aparecieran unidas en parejas inducía a pensar en una posible correlación entre la lisis y el proceso de separación celular, momento en el que las glucanasas *eng1p* y *agn1p* desempeñan su función (Dekker *et al.*, 2004; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Por ello, se decidió analizar con más detalle en qué momento del ciclo celular estaba ocurriendo la lisis celular. Con esta finalidad se realizó un experimento de *time-lapse*, consistente en observar el crecimiento de una célula concreta al microscopio óptico a lo largo del tiempo. Para ello, se preparó un portaobjetos sobre el cual se depositó una lámina de medio rico sólido (YES conteniendo agarosa al 2%) en el que se prescindió del estabilizador osmótico para analizar la lisis. Sobre esta lámina se inocularon células *gas1Δ* provenientes de un cultivo líquido en fase exponencial en YES + Sorbitol 1,2 M. Esta preparación se colocó en un microscopio y se tomaron fotografías a lo largo del tiempo cada minuto. De esta manera se pudo comprobar que las células eran capaces de crecer con relativa normalidad (aunque presentaban defectos de polaridad en numerosos casos) y llegaban a ensamblar el septo de división correctamente (Fig. 40). Del mismo modo, el proceso de separación celular comenzaba normalmente, con la invaginación típica en la zona de

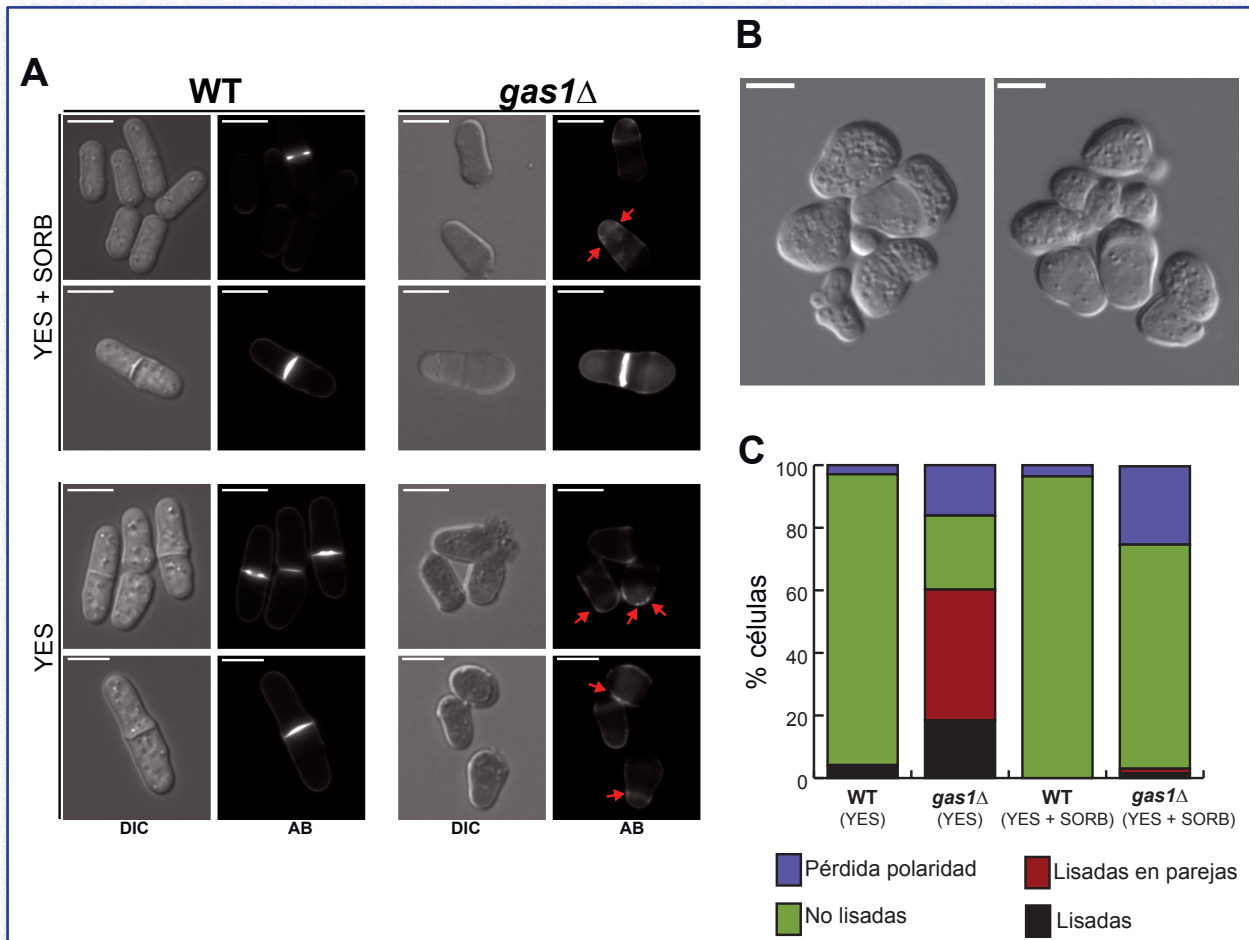


Figura 39. Aspecto microscópico de las células silvestres y mutantes *gas1Δ*. (A) La estirpe silvestre y el mutante *gas1Δ* fueron incubados en medio rico suplementado con 1,2 M sorbitol o en ausencia de dicho estabilizador osmótico. Las muestras, sin fijar, fueron teñidas con azul de anilina antes de su observación al microscopio. Se muestran fotografías de microscopía de contraste interferencial (DIC) o de fluorescencia (AB). Las flechas indican acúmulos de material tipo glucano. Barras de escala, 10 μm. (B) Los defectos de polaridad de *gas1Δ* se agravan en ausencia de un estabilizador osmótico. Ejemplos de mutantes *gas1Δ* con defectos en la polaridad. Barras de escala, 10 μm. (C) Cuantificación de los defectos del mutante *gas1Δ* en medio con y sin estabilizador osmótico. Las estirpes silvestre y *gas1Δ* fueron crecidas durante toda una noche en medio líquido con soporte osmótico y se inocularon en medio con y sin sorbitol 1,2 M, incubándolas a 32°C durante 2 horas. Tras este tiempo, se calcularon los porcentajes de células lisadas aisladas (■), células lisadas en parejas (■), células no lisadas de aspecto aparentemente normal (■) y células no lisadas con defectos de polaridad (■).

la pared celular que rodea al septo. En muchos casos, la lisis tenía lugar durante la separación de las dos células hermanas, durante la disolución del tabique de división.

En la célula silvestre, en la separación celular intervienen mecanismos enzimáticos -agn1p degrada las moléculas de α-glucano de la pared celular que rodea al septo y eng1p hidroliza el β-1,3-glucano lineal del septo primario (Dekker *et al.*, 2004; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003)- y fuerzas mecánicas que ayudan a la degradación enzimática (la turgencia de las células hijas al ir separándose genera fuerzas de cizalla en la zona del septo). En el mutante *gas1Δ*, cuando las fuerzas mecánicas empezaban a ejercer su papel en el proceso de división celular, los polos nuevos de

las células hijas se deformaban o hinchaban y se producía la lisis de modo súbito, liberando el contenido celular al medio (ver minutos 19, 27, 80, 98 y 104 en Fig. 40A; minutos 2 y 11 en la Fig. 40B; y minuto 8 en la Fig. 40C).

Ya que las proteínas *gas1p*, *gas2p* y *gas5p* son nuevos miembros de la familia GH72, cabía suponer que podrían actuar en la síntesis y remodelación de la pared celular en *S. pombe* de forma similar a lo que ocurre en otros hongos y levaduras (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000a; Popolo y Vai, 1999), por lo que podrían actuar entrelazando los distintos compuestos que la forman y fortaleciendo su estructura. Si esto fuera cierto, podría ocurrir que en el mutante *gas1Δ* la pared celular tuviera una composición o estructura diferente,

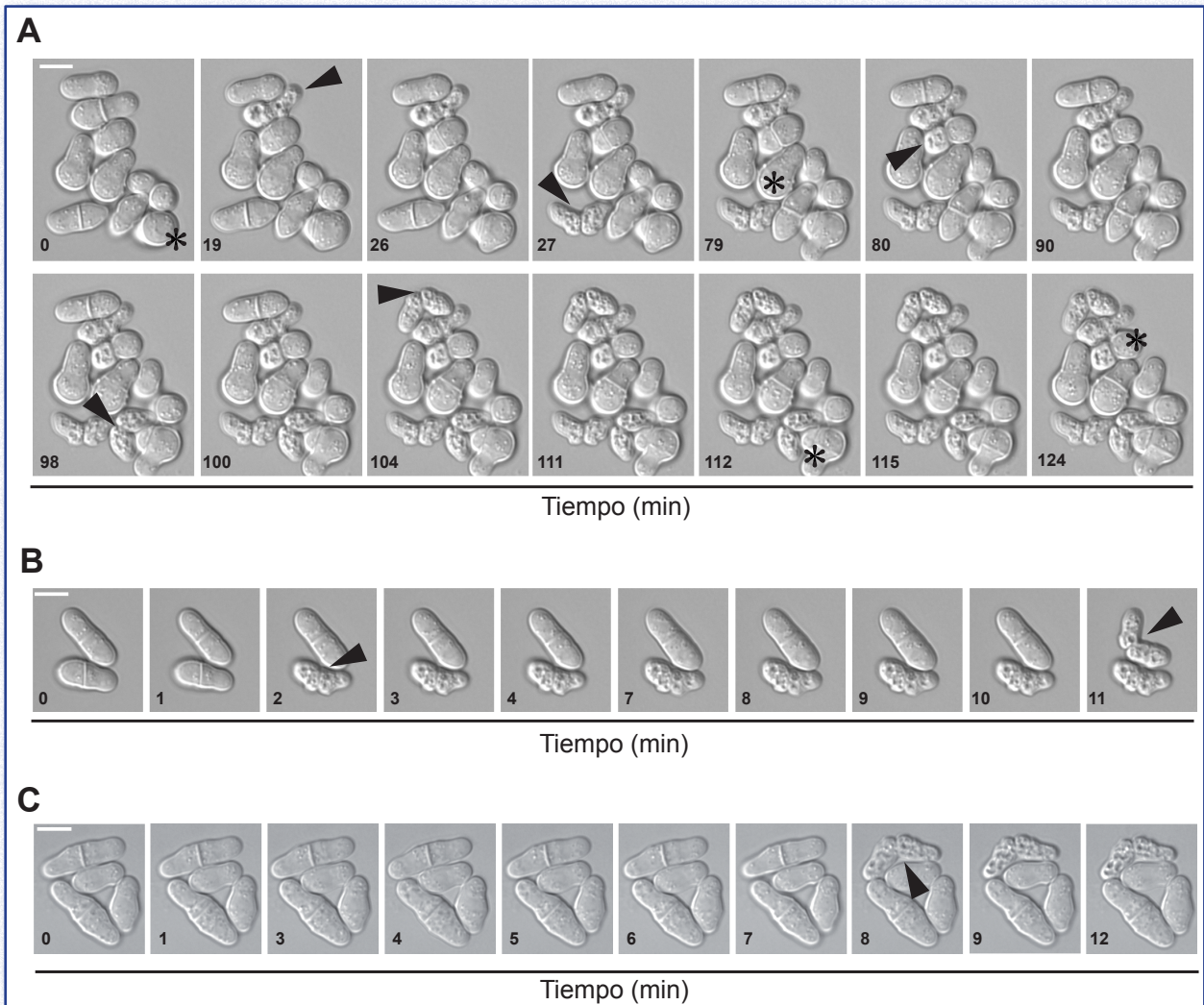


Figura 40. Microscopía a lo largo del tiempo de la cepa *gas1Δ*. Células *gas1Δ* crecidas en un medio rico suplementado con sorbitol 1,2 M fueron sembradas en láminas de YES sólido sobre un portaobjetos. Las muestras se incubaron a 30°C bajo el objetivo del microscopio equipado para la técnica Nomarski y se capturaron imágenes cada minuto. (A), (B) y (C) muestran el crecimiento, pérdida de polaridad y lisis de células mutantes a lo largo del tiempo. Las puntas de flecha negra indican las células que se lisan en cada momento. Los asteriscos marcan las células con pérdida de polaridad. Barras de escala, 10 μm.

siendo más sensible a la acción de las hidrolasas *eng1p* y/o *agn1p* durante el proceso de separación celular y, por ello, se produciría la lisis mayoritaria al final del ciclo celular. Si esta hipótesis fuera cierta, cabría esperar que la delección de la α -glucanasa *agn1p* o de la β -glucanasa *eng1p* pudiera revertir el fenotipo de lisis del mutante *gas1Δ*. Así pues, se intentó construir mediante cruce genético los mutantes dobles *gas1Δ eng1Δ* (YMMR106-2 x OL538; ésta última cepa es *eng1Δ::ura4+*) y *gas1Δ agn1Δ* (YMMR106-2 x OL599; ésta última cepa es *agn1Δ::ura4+*). Las ascas formadas en cada cruce fueron tratadas con glusulasa para destruir cualquier célula vegetativa residual y facilitar la liberación de las esporas de las ascas. Una vez germinadas las correspondientes esporas, mediante réplicas, se seleccionaron las colonias que eran a

la vez resistentes a G418 y capaces de crecer en medio sin uracilo (procedimiento conocido como *random spore analysis*). A las esporas seleccionadas del cruce *gas1Δ x eng1Δ* se las denominó YMMR119, mientras que las esporas provenientes del cruce *gas1Δ x agn1Δ* recibieron el nombre de YMMR120.

Debido a la dificultad que había supuesto la obtención de mutantes nulos *gas1+*, mencionados anteriormente en esta Memoria, se quiso comprobar mediante PCR que las esporas seleccionadas eran realmente portadoras del casete de interrupción de *gas1+* y que no habían retenido ningún alelo silvestre de dicho gen. Así, se diseñó una reacción de PCR en la que los oligonucleótidos (1037 y 1038) anillaban tanto en el caso del alelo

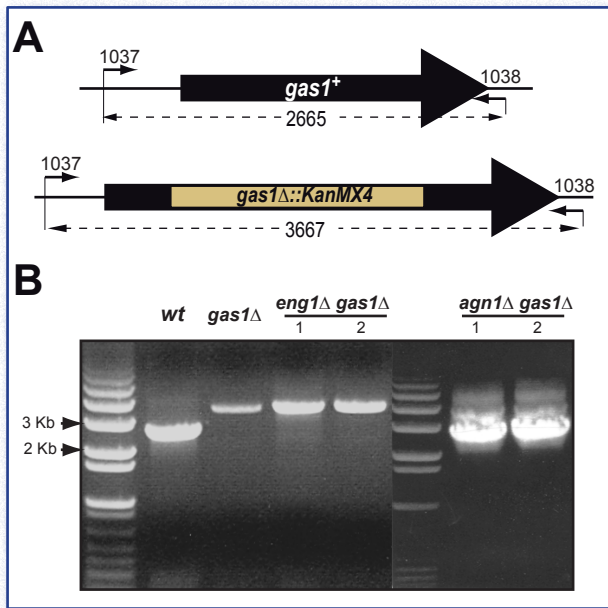


Figura 41. La cepa YMMR120 es el mutante doble *eng1*Δ *gas1*Δ. (A) Esquema de los fragmentos esperados en la PCR de comprobación de las estirpes YMMR119 e YMMR120. El fragmento amplificado en el caso del alelo silvestre es de 2.665 pb, mientras que el alelo *gas1*Δ::*KanMX4* es de 3.667 pb. (B) PCR de comprobación de las cepas YMMR119 e YMMR120. En los carriles correspondientes a la cepa silvestre (wt) y a las cepas YMMR120-1 e YMMR120-2 aparece una banda de 2,6 Kb.

silvestre de *gas1*⁺ como en el alelo interrumpido, pero que, debido a la diferencia de tamaños entre el gen y el casete de interrupción, generaran fragmentos de diferente longitud y distinguibles mediante electroforesis. Como puede apreciarse en la Figura 41B, en las muestras correspondientes a las cepas YMMR106 e YMMR119 se amplifica una banda cuyo tamaño coincide con el casete de interrupción de *gas1*⁺, lo que indica que la delección de dicho gen es correcta en ambas estirpes. Sin embargo, en las muestras correspondientes a la cepa YMMR120, se amplifica también una banda de menor tamaño, indicativa de la presencia del alelo silvestre de *gas1*⁺, al igual que ocurre en la muestra de una cepa silvestre. Estos resultados indican que únicamente fue posible conseguir el mutante doble *eng1*Δ *gas1*Δ.

Según los mecanismos de la herencia, en el caso del cruce *agn1*Δ x *gas1*Δ, una cuarta parte de las esporas generadas debían contener la doble delección y germinar formando colonias *ura*⁺ y *Kan*^R. Se sembró un gran número de esporas resultantes de dicho cruce y se seleccionaron mediante cultivo en medios selectivos. Únicamente se obtuvieron 10 colonias *ura*⁺ y *Kan*^R, que, al

comprobarlas por PCR, mostraron poseer una copia del alelo silvestre. El escaso número de esporas con el genotipo deseado que habían germinado junto con el hecho de haber mantenido el gen silvestre, hacen pensar que la doble delección es letal para la célula.

Una vez confirmado que el doble mutante *eng1*Δ *gas1*Δ era correcto, se analizó su capacidad para crecer en medio sin estabilizador osmótico, lo cual sería indicativo de que la delección de *eng1*⁺ revertiría la lisis del mutante *gas1*Δ. Contrariamente a la hipótesis que se había planteado, el doble mutante presentaba defectos de crecimiento similares a los del mutante *gas1*Δ (Fig. 42). Ninguno de los distintos clones aislados era capaz de revertir el fenotipo de inviabilidad en estas condiciones (datos no mostrados). De este experimento se concluyó que la lisis no era debida a una degradación excesiva de la pared por las hidrolasas implicadas en la separación celular, al menos que no se debía únicamente a la acción de la endo-β-1,3-glucanasa *eng1p*. No puede descartarse que la lisis sea debida a la actividad de *agn1p* o a la acción concertada de varias actividades enzimáticas implicadas en la remodelación de la pared celular de *S. pombe* aún desconocidas o pobremente caracterizadas. Así, por ejemplo, la levadura de fisión posee 3 enzimas pertenecientes a la familia GH5 (*exg1p*, *exg2p* y *exg3p*) que se han descrito de modo preliminar como β-1,6- glucanasas (E. Dueñas, comunicación personal). Alternativamente, es posible que, si el septo secundario está debilitado, sea el cambio de presión osmótica en la pared del nuevo polo celular el responsable de la lisis del mutante *gas1*Δ (debido al paso de tener el contenido citoplasmático de la célula hermana ejerciendo presión osmótica sobre la pared que compartían a tener únicamente un medio líquido pobre en fuerza osmótica al otro lado de la pared del polo nuevo).

Por ello, todos estos resultados indican que *gas1*⁺ es necesario para mantener la viabilidad celular durante el crecimiento vegetativo y que *gas1p* está implicada en procesos de remodelación de la pared celular, pues la lisis celular ocurre en las regiones celulares donde se tiene lugar el crecimiento activo (polos y septos). Además, la

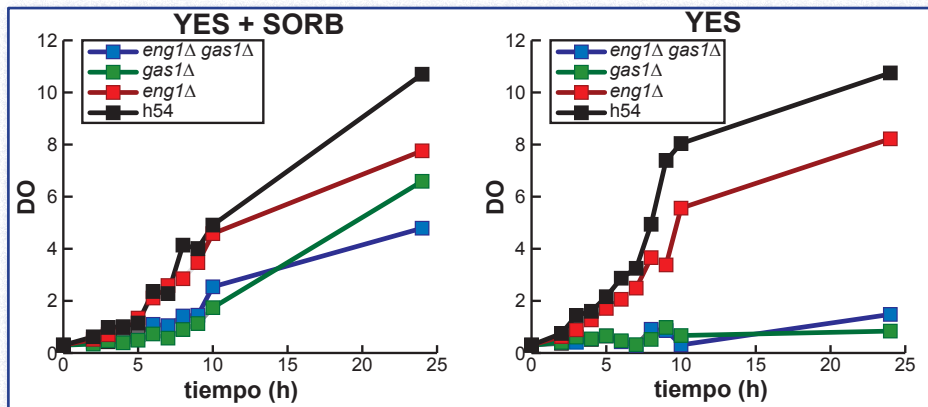


Figura 42. La delección de *eng1*⁺ no revierte la lisis celular del mutante *gas1Δ*. Curva de crecimiento de las cepas silvestre (■), YMMR106-1 (■), OL538 (■) e YMMR119-2 (■) en medio rico con sorbitol 1,2 M (izquierda) y sin estabilizador osmótico (derecha). El mutante doble se comporta de modo similar al mutante *gas1Δ*.

pérdida de polaridad en las células que no se lisan se manifiesta por un ensanchamiento en los polos de células que están elongándose o en la zona media, en aquellas que están comenzando a sintetizar el septo de división.

(IV)- 4. La proteína *gas1p* es necesaria para una correcta morfogénesis

Para analizar con más detalle la naturaleza del defecto de la pared celular del mutante *gas1Δ* y comprobar si los mutantes *gas2Δ* y *gas5Δ* y el mutante doble *gas2Δ gas5Δ* poseían algún defecto en la pared celular no detectable mediante microscopía óptica, se empleó la microscopía electrónica de transmisión para comparar la morfología de la pared celular entre las cepas silvestre y mutantes (Figs. 43 y 44). A partir de cultivos líquidos en medio rico (suplementado con un estabilizador osmótico para el mutante *gas1Δ*) en fase exponencial de crecimiento, se recogieron muestras que fueron fijadas con glutaraldehído al 3% y tratadas con tetróxido de osmio para su observación.

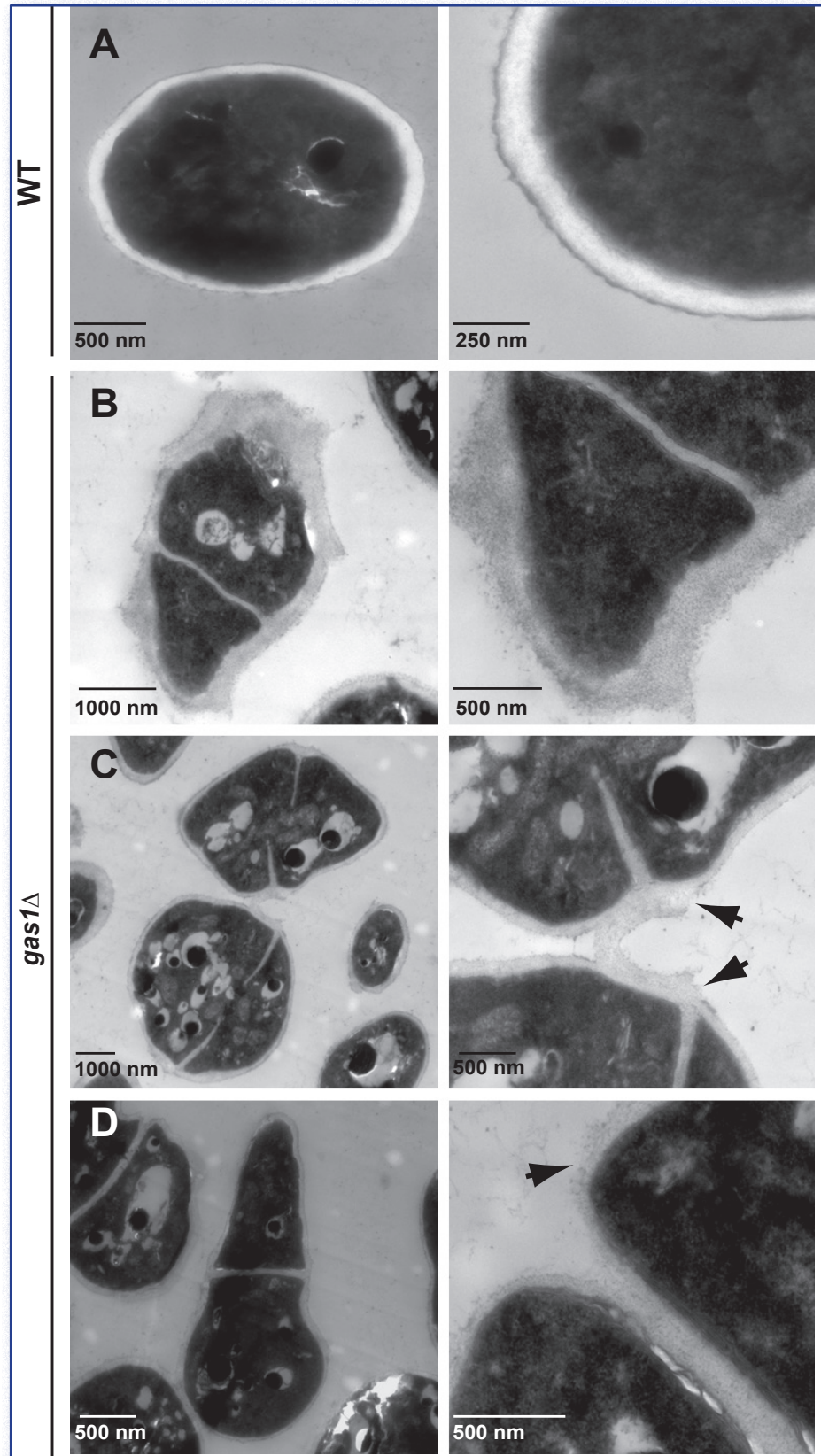
Las células silvestres incubadas en un medio con soporte osmótico presentaban la morfología cilíndrica característica de la levadura de fisión. Además, la pared presentaba un grosor uniforme a lo largo de todo el contorno celular, y en ella eran fácilmente distinguibles la capa interna transparente a los electrones (formada por glucanos) rodeada de una capa delgada más densa a los electrones en la zona más externa (constituida por galactomananos) (Fig. 43A). Por el contrario, las

células *gas1Δ* que habían crecido en las mismas condiciones mostraban un aspecto irregular en la forma y el tamaño (Fig. 43B-D). En concreto, la pared celular de células *gas1Δ* incubadas en las mismas condiciones era de un grosor no uniforme, siendo difícil distinguir las distintas capas, ya que toda ella presentaba un aspecto ligeramente granulado y amorfo (Fig. 43B). En aquellos casos en los que era visible, la capa electro-densa más externa parecía tener múltiples soluciones de continuidad, adoptando un aspecto ligeramente punteado (Fig. 43B-D, puntas de flecha). Además, otra zona en las que los defectos eran también evidentes era la zona media de las células, donde se estaba formando el septo de división (Fig. 43C y D). Llamaba especialmente la atención el hecho de que el septo de las células mutantes no mostrara la estructura trilaminar típica, en la cual la capa correspondiente al septo primario (formada por β -1,3-glucano lineal y más electro-transparente) está perfectamente delimitada y rodeada por dos láminas de septo secundario (formadas por β -1,3-glucano ramificado y ligeramente más densa a los electrones que la anterior) en las células silvestres, sino que parecía uniforme en estructura (Fig. 43D). Asimismo, la degradación del septo para generar células hijas independientes no se llevaba a cabo con normalidad. Como se observa en la Figura 43C, aún quedan fragmentos de la pared celular que rodeaba al septo que no se había degradado y que mantenían unidas a las células a pesar de que éstas se encontraban ya sintetizando un nuevo septo de división. Todos estos datos sugieren que la pared celular no se ensambla correctamente en ausencia de *gas1p*, presentando graves defectos en su estructura.

Se llevó a cabo un estudio similar con los mutantes de delección *gas2Δ*, *gas5Δ* y *gas2Δ gas5Δ*. En este caso, las distintas cepas mutantes y la cepa silvestre parental fueron incubados a 32°C en medio rico sin estabilizador osmótico. El análisis de la ultraestructura reveló que no existían

grandes diferencias entre la pared celular de la cepa silvestre y la de las cepas mutantes nulas (Fig. 44A-D). Este resultado concuerda con lo observado en los ensayos de tiempo de generación y los estudios fenotípicos al microscopio óptico.

Figura 43. La proteína *gas1p* es necesaria para una correcta morfogénesis. Microscopía electrónica de células silvestres y células mutantes *gas1Δ*. Se recogieron muestras de células silvestres y mutantes nulas incubadas en medio con estabilizador osmótico y se fijaron con tetróxido de osmio. (A) La pared celular de células silvestres posee una capa interna poco densa a los electrones y una capa externa y continua más electro-densa. La imagen de la derecha es una sección perpendicular de una célula silvestre. (B) El mutante *gas1Δ* presenta una pared celular de grosor irregular. En la electromicrografía se muestra una célula mutante y un detalle de su pared celular en la que se aprecia el grosor no uniforme de esta estructura. (C) El septo de los mutantes *gas1Δ* no se degrada correctamente. En el panel se muestran dos células aún unidas por material del septo que no se ha terminado de degradar correctamente, a pesar de que dichas células hijas han seguido progresando a lo largo del ciclo celular. (D) El septo en un mutante *gas1Δ* no posee la estructura trilaminar típica. Detalle de una célula carente de *gas1p* en la cual no se aprecia la capa media de β -1,3-glucano lineal. Dicho material suele presentarse como una capa transparente a los electrones. En C y D, las puntas de flecha indican zonas en las que la capa más externa no es continua.



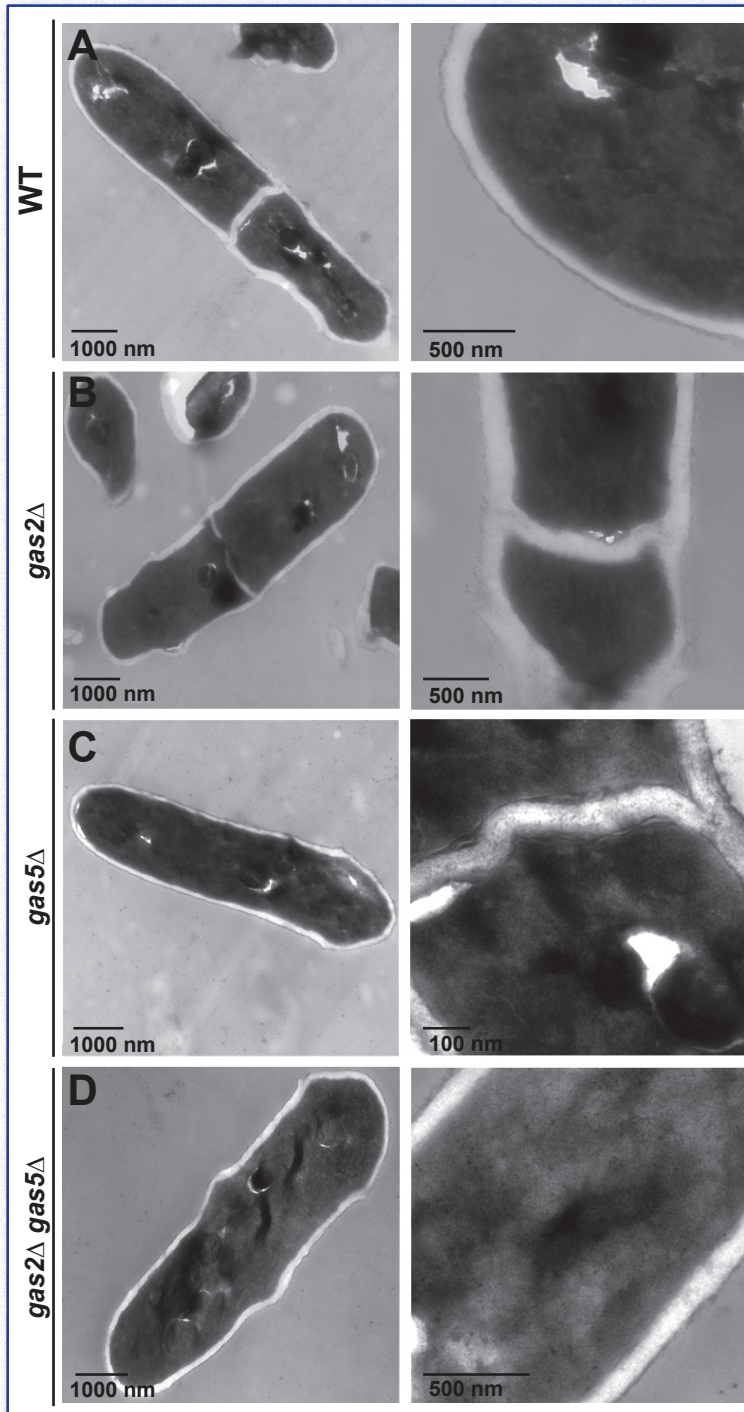


Figura 44. La ausencia de *gas2p* y/o *gas5p* no causa alteraciones graves en la estructura de la pared celular. Microscopía electrónica de células silvestres y células mutantes *gas2Δ*, *gas5Δ* y *gas2Δ gas5Δ*. Los mutantes nulos *gas2Δ*, *gas5Δ* o *gas2Δ gas5Δ* presentan una pared celular cuya estructura es muy similar a la de la cepa silvestre. Se recogieron muestras de dichas cepas incubadas en medio rico YES y se fijaron con tetróxido de osmio. (A) Cepa silvestre h20, con la capa interna transparente a los electrones y capa externa de manoproteínas densa a los mismos. (B) En la pared de la cepa mutante *gas2Δ*, la capa de manoproteínas es ligeramente más delgada que en la cepa mutante. (C) El mutante nulo *gas5Δ* presenta una pared celular indistinguible de la pared de células silvestres. (D) El mutante doble *gas2Δ gas5Δ* no presenta defectos en la pared celular.

vaban graves defectos estructurales. Para tratar de responder a esta pregunta, se fraccionaron y cuantificaron los polisacáridos de la pared celular de las distintas estirpes mutantes.

Células de las cepas silvestres y de los mutantes *gas1Δ*, *gas2Δ*, *gas5Δ* y *gas2Δ gas5Δ* que habían sido incubadas a 30°C en medio rico (con estabilizador osmótico, en el caso de *gas1Δ* y de la cepa silvestre utilizada como control) durante diez horas, fueron inoculadas en medio líquido (extracto de levadura más suplementos) en presencia de glucosa radiactiva ($U-^{14}C$, 1 μ Ci/mL) e incubadas a 30°C durante 6 horas adicionales. Durante este tiempo, la glucosa radiactiva se incorporó a todos los compuesto sintetizados *de novo*, incluidos los polímeros de la pared celular. Tras esta incubación, se extrajeron las paredes celulares y se sometieron a distintos tratamientos

enzimáticos, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Con el procedimiento empleado para el fraccionamiento de las paredes celulares, el contenido de α -glucano se calcula como el precipitado resultante de la digestión de las paredes con zimoliasa 100T (mezcla de enzimas con actividad β -1,3-glucanasa, proteasa y mananasa, pero que no hidrolizan β -1,6-glucano ni α -glucano). La cantidad de β -1,3-glucano se calcula a partir del sobrenadana-

(IV)- 5. Composición de la pared celular de los distintos mutantes *gasΔ* durante el crecimiento vegetativo

Ya que las proteínas de la familia GH72 están implicadas en el ensamblaje y maduración de la pared celular en otros microorganismos (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000; Popolo y Vai, 1999; Ragni *et al.*, 2007), quizás la composición de la pared estuviese alterada en los distintos mutantes, a pesar de que en algunos de ellos no se obser-

te obtenido tras la digestión de las paredes con Quantazyme®, una β -1,3-glucanasa recombinante. La cantidad de manano presente en las paredes celulares se obtiene restando los resultados obtenidos del sobrenadante de la Zimoliasa 100 T (β -1,3-glucano y manano) y de la Quantazyme® (β -1,3-glucano) (Pérez y Ribas, 2004). En células vegetativas, la cantidad de β -glucano es mayor que la de α -glucano (55% vs 28%) (García, 2006; Manners y Meyer, 1977).

Los resultados obtenidos revelaron que no existían diferencias significativas en la composición cuantitativa de las paredes celulares de las cepas mutantes *gas2 Δ* , *gas5 Δ* y *gas2 Δ gas5 Δ* en relación con la cepa silvestre control (Tabla 4). Este resultado no es sorprendente, pues en estos mutantes no se ha observado ningún defecto fenotípico en los distintos experimentos realizados. Sin embargo, cuando se analizó la composición de la pared celular del mutante *gas1 Δ* incubado en medio con sorbitol para mantener la integridad de las células aparecieron diferencias en la composición en relación con la cepa control incubado en las mismas condiciones. En primer lugar, existía una menor incorporación de radiactividad en la pared celular en la cepa silvestre en relación con el crecimiento en medio carente de sorbitol. Quizás esta diferencia sea debida a que el sorbitol produce un estrés osmótico en las células y su tasa de crecimiento en este medio es menor. Esta reducción también se observaba en la cepa *gas1 Δ* , pero el porcentaje de material in-

corporado en la pared era ligeramente superior al de la cepa silvestre control (15,6% frente a 12,6). Además, cuando se analizaron los distintos polímeros que componen la pared celular, se observó que existía una reducción en el contenido de β -glucano (49 % frente a 54%) que era compensado con un aumento en cantidad de α -glucano y manano (53% frente a 43 en la cepa silvestre). Este resultado podría indicar que existe un defecto en el entrecruzamiento de los β -glucanos con el resto de los componentes de la pared celular y que una parte se libere al medio de cultivo, como ocurre en el mutante *gas1 Δ* de *S. cerevisiae* (Ram *et al.*, 1998). En la levadura de gemación, el descenso en el contenido en β -1,3-glucano alcali-insoluble es compensado con un aumento en la cantidad de quitina en la pared (Popolo *et al.*, 1997; Valdivieso *et al.*, 2000), mientras que en la levadura de fisión ese aumento se produce en la fracción de α -glucano y manano, al carecer de quitina.

(IV)- 6. Las proteínas GH72 se localizan en la periferia celular durante el crecimiento vegetativo

Para determinar la localización subcelular de las proteínas *gas1p*, *gas2p* y *gas5p*, se etiquetaron con diferentes proteínas fluorescentes. Ya que las tres son presumiblemente proteínas de secreción destinadas a la pared celular o a la membrana plasmática, la secuencia señal del extremo amino y la posible señal para anclaje GPI pre-

CEPA	% Pared celular	% Manano	% α -glucano	% β -glucano
wt (YES)	39,9 \pm 5,8	16,2 \pm 6,5	33,6 \pm 1,2	45,8 \pm 6,5
<i>gas2Δ</i> (YES)	39,4 \pm 3,4	18,1 \pm 3,9	39,4 \pm 6	46,8 \pm 4,2
<i>gas5Δ</i> (YES)	36,9 \pm 0,6	19,0 \pm 1,5	34,6 \pm 4,3	51,1 \pm 5,1
<i>gas2Δ gas5Δ</i> (YES)	35,6 \pm 14,5	12,8 \pm 9	40,9 \pm 8,5	44,7 \pm 9,7
wt (YES + SORB)	12,6 \pm 1,4	7,3 \pm 3,8	35,7 \pm 4,5	54,8 \pm 4,4
<i>gas1Δ</i> (YES + SORB)	15,6 \pm 3,6	13,3 \pm 5,9	40,4 \pm 4,5	49,9 \pm 9,4

Tabla 4. Incorporación de radiactividad a partir de ^{14}C -glucosa en los polisacáridos de la pared celular de las cepas silvestre y los mutantes *gas1 Δ* , *gas2 Δ* , *gas5 Δ* y *gas2 Δ gas5 Δ* incubados a 30°C durante 6 horas. En la columna de pared celular, los valores indican el porcentaje de ^{14}C -glucosa incorporada en la pared celular respecto del total de incorporación en la célula. En las siguientes columnas, se indican los porcentajes de ^{14}C -glucosa incorporada en cada polisacárido respecto al total de pared celular y son la media y las desviaciones estándar de, al menos, tres experimentos independientes. Entre paréntesis se indica el medio de cultivo en el que fueron incubadas las distintas cepas.

sente en el extremo carboxilo pueden ser importantes para la correcta localización de las proteínas *in vivo*. Por ello, fue necesario diseñar varias estrategias en las que las proteínas fluorescentes se fusionaron en fase en distintas posiciones.

En el caso del gen *gas1⁺*, se procedió a la clonación de la región codificante junto con su promotor y terminador en un plásmido, insertando posteriormente la proteína amarilla fluorescente (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*) entre la secuencia señal predicha y el dominio GluTD mediante PCR recombinante (Fig. 45A). El plásmido resultante (pMMR18) fue introducido por transformación en una cepa silvestre. La observación con el microscopio de fluorescencia de células que llevaban la versión de *gas1p* marcada con YFP (YFP-*gas1p*) durante crecimiento vegetativo señaló que la proteína de fusión se localiza en la periferia celular en los puntos de crecimiento activo, es decir, en los polos y en el septo (Fig. 45B).

Por su parte, como el gen *gas2⁺* carece de una posible señal para anclaje a otros componentes de la periferia celular mediante un grupo GPI, se construyó una proteína fusionando la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) en el extremo carboxilo de la proteína, antes del codón de parada. Para ello, se empleó uno de los casetes descritos por Bähler y colaboradores (Bähler *et al.*, 1998). En este caso, la región codificante de la GFP se fusionó tras el último triplete de *gas2p*, respetando la fase de lectura (Fig. 45A), y se integró en el genoma de una estirpe silvestre, generando la cepa YMMR105. Cuando se analizó la disposición de la proteína *gas2p*-GFP, se comprobó que la proteína de fusión resultante se localizaba también en la periferia celular, con un patrón de distribución similar al de *gas1p*, es decir, se acumulaba preferentemente en los polos y en el septo de las células (Fig. 45C).

En lo referente a la localización de *gas5p*, como su estructura modular es similar a la de *gas1p* (secuencia señal en el extremo amino y señal para anclaje GPI en el extremo car-

boxilo), se empleó una estrategia similar a la de esta última para su localización (Fig. 45A). Cuando distintos transformantes portadores de la construcción YFP-*gas5p* fueron examinados al microscopio de fluorescencia, no se observó una localización concreta, puesto que la proteína de fusión parecía ser inestable y la señal fluorescente esta-

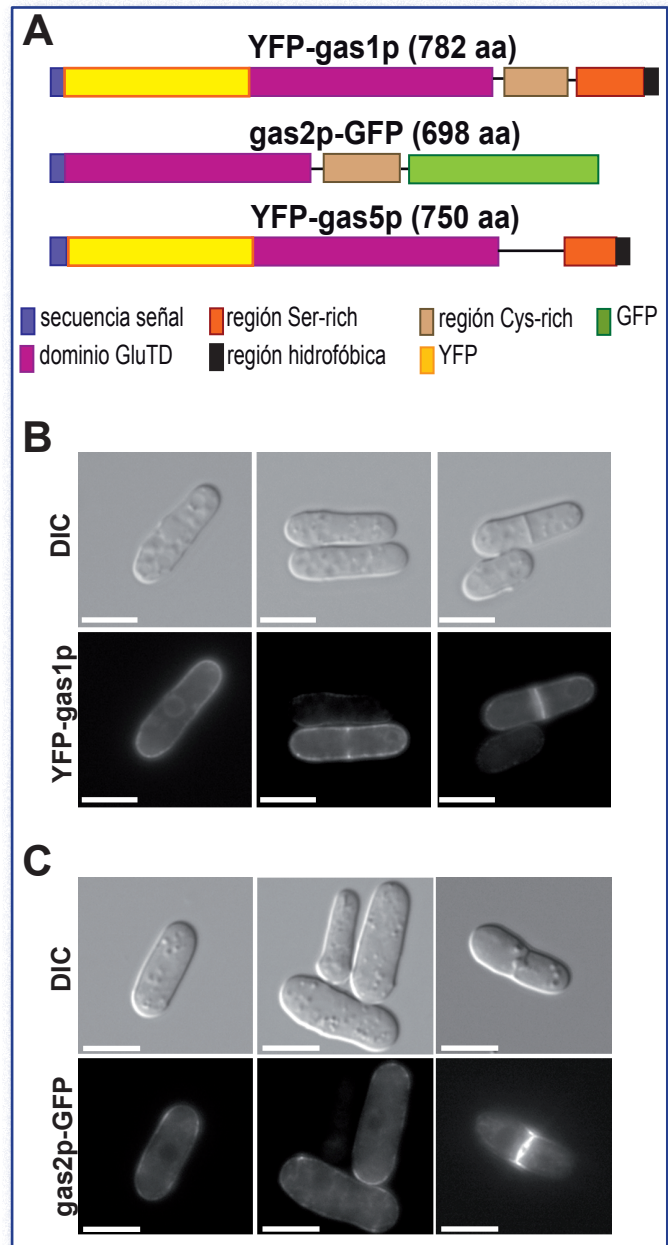


Figura 45. Las proteínas *gas1p* y *gas2p* se localizan en la periferia celular. (A) Construcciones YFP-*gas1p*, *gas2p*-GFP, YFP-*gas5p* y *gas5p*-YFP. (B) Localización de YFP-*gas1p* en una estirpe silvestre de *S. pombe*. Células silvestres portadoras de un plásmido con la construcción YFP-*gas1p* se incubaron hasta fase exponencial temprana antes de tomar las fotografías de contraste diferencial (DIC) y de fluorescencia de YFP (YFP-*gas1p*). (C) Localización de *gas2p*-GFP en una cepa silvestre. Células silvestres portadoras de la construcción *gas2p*-GFP en el locus *gas2⁺* se incubaron hasta fase exponencial temprana antes de tomar las fotografías de contraste diferencial (DIC) y de fluorescencia de GFP (*gas2p*-GFP). Barras de escala, 10 μ m.

ba confinada en grandes vesículas intracelulares (no se muestran datos). Una explicación podría ser que en este caso la inserción de la YFP cerca de la secuencia señal estuviera afectando el correcto procesamiento de la proteína durante su tránsito por la ruta secretora o estar interfiriendo con el plegamiento de la proteína. Por esta razón, se estudió más detalladamente la posible estructura globular de gas5p recurriendo al programa *Globplot* (<http://globplot.embl.de/>) que predice los posibles dominios globulares de las proteínas. De acuerdo con la distribución de los dominios globulares que esta aplicación bioinformática propone para gas5p (Fig. 46), la YFP se habría insertado antes del principal dominio globular de la proteína, por lo que no debería estar interfiriendo con el plegamiento de la proteína de fusión. Adicionalmente, existía otra región cerca del extremo carboxilo (nucleótidos 1170-1230) que podía ser buena candidata para colocar la proteína fluorescente. Dicha zona correspondía con la región rica en serinas y treoninas, así como en prolinas, que generalmente son regiones de las proteínas de secreción que suelen formar dominios lineales carentes de estructura secundaria (Stratford, 1994).

Por tanto, se diseñó una nueva construcción en la cual la YFP se insertó en fase de lectura tras los aminoácidos P405-G406-P407. Además, este motivo (que suele definir giros en las proteínas), se duplicaría tras la YFP antes de seguir la secuencia normal de gas5p. Al colocar la proteína fluorescente entre dos motivos de giro, se pretendía que gas5p y la YFP pudieran sufrir plegamientos independientes y lo más similares a las proteínas nativas. La construcción gas5p-YFP fue clonada en un plásmido (Fig. 46) y el plásmido resultante fue introducido en una cepa silvestre. Cuando se analizó la localización de esta nueva proteína de fusión, sólo se observó fluorescencia difusa en el citoplasma y en algunos pequeños puntos concretos, posiblemente correspondientes a vesículas de secreción, pero nunca en la periferia de la célula. En cualquier caso, era una distribución ligeramente distinta a la observada con la primera construcción (datos no mostrados). A pesar de que no ha sido posible determinar el destino final de la proteína gas5p, las observaciones realizadas parecen apuntar a que esta proteína también entra en la ruta secretora.

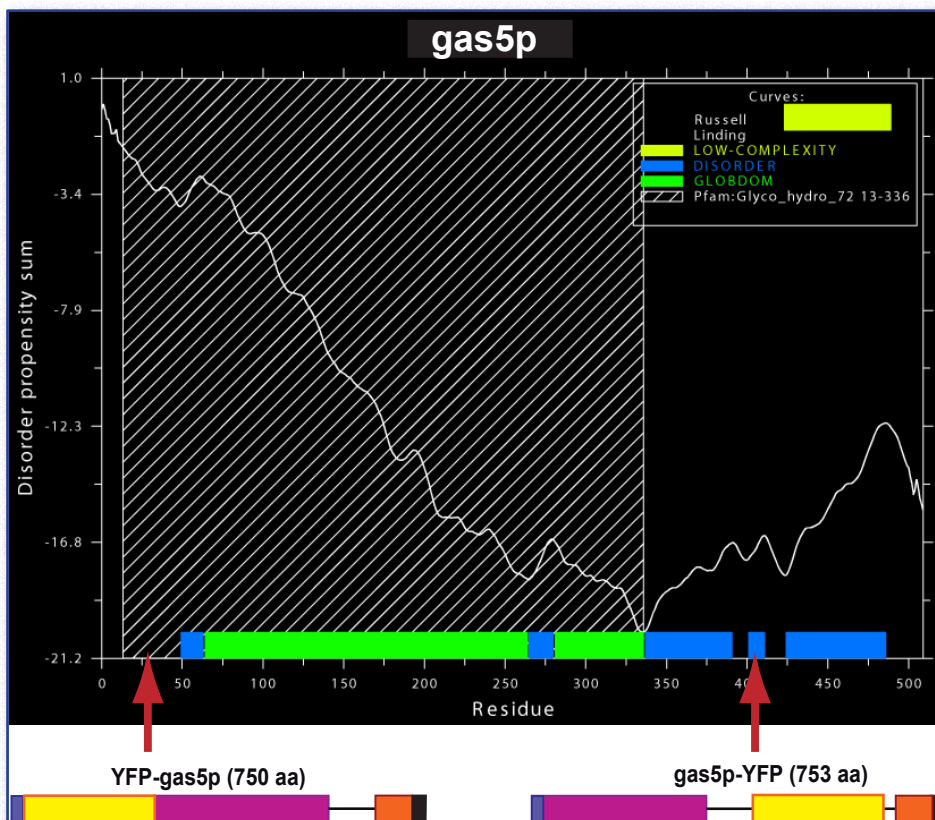


Figura 46. Dominios globulares de gas5p. La secuencia de gas5p fue analizada con el programa bioinformático *Globplot*. El resultado se muestra en la figura. Las flechas indican las posiciones en las cuales se insertó la proteína amarilla fluorescente (YFP) para cada una de las construcciones.

(V)- RESULTADOS

Caracterización funcional de los genes *gas*⁺ durante esporulación

(V)- RESULTADOS: Caracterización funcional de los genes *gas4*⁺ durante esporulación

(V)- 1. La expresión de *gas4*⁺ alcanza su máximo durante el proceso de esporulación

La ausencia de *gas4*⁺ no causa ningún defecto aparente en el crecimiento durante el ciclo mitótico. Por ello, se procedió a analizar si la proteína codificada (*gas4p*) desempeña algún papel relevante durante los procesos de diferenciación (meiosis y esporulación).

Para analizar la abundancia de *gas4p* durante el proceso de esporulación, se generaron anticuerpos anti-*gas4p* específicos frente a una forma recombinante de *gas4p* purificada en la levadura *Pichia pastoris* (ver Materiales y Métodos y Capítulo VI). En primer lugar, se comprobó que dichos anticuerpos eran específicos frente a *gas4p* y que no existía reacción cruzada con las otras proteínas *gasp* de la levadura de fisión. Para ello, se analizaron mediante un ensayo *Western-blot* los extractos proteicos de una cepa silvestre (S964, cuyo genotipo es *h/h pat1-114/pat1-114 ade6M210/ade6M216 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18*) y otra estirpe carente de *gas4*⁺ (YMMR122, de genotipo *h/h pat1-114/pat1-114 gas4Δ::KanMX4/gas4Δ::KanMX4 ade6M210/ade6M216 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18*) durante el proceso de esporulación. Para generar esta última cepa, *gas4*⁺ fue deletado en cepas haploides *h pat1-114*, a partir de las cuales se obtuvo la estirpe diploide por fusión de protoplastos. Las estirpes diploides silvestre y mutante fueron sometidas a condiciones de esporulación (eliminación del nitrógeno del medio de cultivo e inactivación térmica de la quinasa *pat1p*) durante 24h, para garantizar que la mayoría las células habían generado ascas maduras. Como se muestra en la Figura 47, los anticuerpos detectaban varias bandas en la cepa

silvestre. Sin embargo, la señal más intensa sólo aparecía en el carril correspondiente a la cepa silvestre, estando ausente en el mutante *gas4Δ*, lo que indicaba que esta banda de aproximadamente 59 kDa era *gas4p*. Los anticuerpos también reconocían otras dos bandas de menor intensidad y de mayor tamaño (menor velocidad de migración) que estaban presentes tanto en la cepa *gas4*⁺/*gas4*⁺ como en la *gas4Δ*/*gas4Δ*, lo que significaba que correspondían a bandas inespecíficas (utilizando distintos mutantes se ha comprobado que no corresponden a ninguno de las otras proteínas *gasp* presentes durante el crecimiento vegetativo, datos no mostrados). El tamaño de la proteína *gas4p* observado en los geles es ligeramente superior al tamaño calculado teóricamente según su secuencia aminoacídica (50.763 Da, según *EX-PASy ProtParam tool*). Esta diferencia podría ser debida a un procesamiento post-traducciona de la proteína durante el proceso de secreción, posiblemente por glicosilación, ya que la secuencia contiene varios sitios potenciales de O- y N-glicosilación (10 sitios potenciales de O-glicosilación según *NetOGlyc* y 3 sitios potenciales de N-glicosilación según *NetNGlyc*). Por todo ello, y dado que la banda más intensa sólo estaba presente en

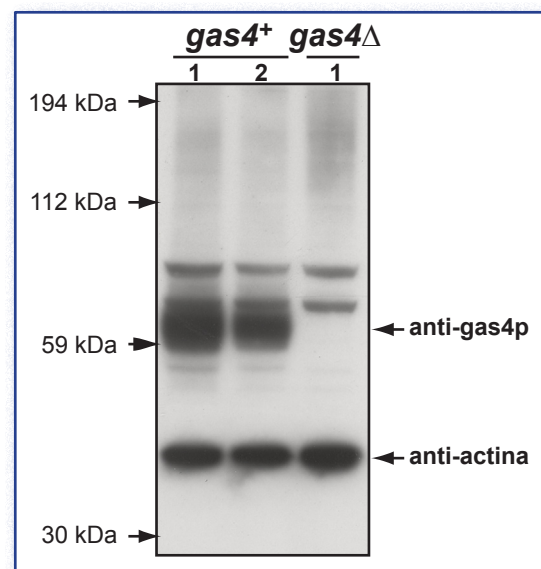


Figura 47. Los anticuerpos policlonales anti-*gas4p* son específicos. Extractos proteicos de una cepa *gas4*⁺ (S964, carriles 1 y 2) y de una cepa *gas4Δ* (YMMR122, carril 3) fueron analizados mediante ensayo *Western-blot*, incubándolos con los anticuerpos producidos frente a una versión recombinante de *gas4p*. La señal más intensa, únicamente presente en los carriles de la cepa silvestre, correspondería a la proteína *gas4p*. Los niveles de actina fueron analizados como control de carga.

las muestras de la cepa silvestre, se asumió que dicha señal era gas4p en su forma glicosilada y que los anticuerpos anti-gas4p generados eran lo suficientemente específicos.

Una vez realizada esta comprobación, los anticuerpos fueron empleados para analizar la abundancia de gas4p mediante un ensayo de tipo *Western-blot* en una meiosis sincrónica del mutante *pat1-114* (Fig. 48A). La cinética de producción de gas4p presentaba una buena correlación con lo observado previamente para el ARNm de *gas4+* (Fig. 48B); es decir, gas4p comenzaba a aparecer a las 4,5 horas después de que las células entraran en el proceso meiótico. Los niveles máximos de proteína se alcanzaban entre las 5,5 y 6 horas, cuando las células diploides habían ya completado la meiosis II y habían empezado el desarrollo de las ascosporas (esporogénesis). A partir de ese momento, la cantidad de gas4p disminuía gradualmente, aunque la proteína era aún detectable 12 horas después de la inducción de la meiosis, momento en el cual ya se observaban ascas completamente maduras. El perfil de la abundancia de la proteína concuerda perfectamente con un posible papel en la síntesis o remodelación de la pared de las ascosporas.

Un detalle interesante que llamó la atención fue la ausencia de la señal correspondiente a gas4p para los tiempos correspondientes al inicio de la meiosis. Si bien se demostró que *gas4+* se expresaba durante el crecimiento vegetativo, sus niveles de ARNm eran muy bajos y fue necesaria una exposición muy larga para poder detectarlos. De hecho, se asumió que también existía una expresión basal de *gas4+* al inicio de la meiosis, aunque no es visible en el *Northern-blot* de la Figura 29C (Capítulo III) ya que se emplearon tiempos cortos de exposición (para poner de relevancia los distintos niveles de ARNm en los momentos en los que la expresión de *gas4+* estaba inducida). Para comprobar si la proteína gas4p también estaba presente durante el crecimiento vegetativo, se analizaron extractos proteicos de células *gas4+* durante el crecimiento vegetativo mediante ensayos de *Western-blot* empleando anticuerpos anti-gas4p y tiempos largos de exposición. Sin embargo, no se observó ninguna banda correspondiente a gas4p

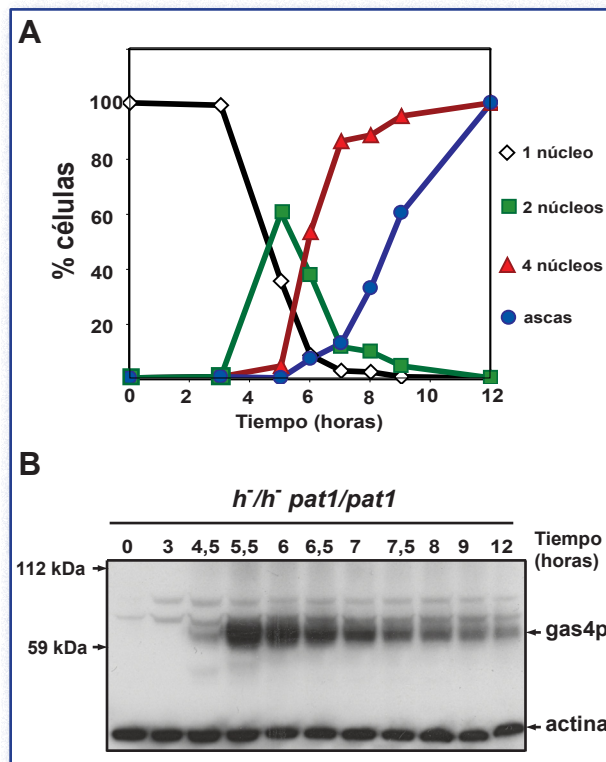


Figura 48. La proteína gas4p se acumula durante la esporogénesis. (A) Meiosis sincrónica de la estirpe S964. La progresión meiótica fue monitorizada mediante la tinción con DAPI de los núcleos y la esporulación fue comprobada mediante observación microscópica de las ascas. El porcentaje de células mononucleadas, binucleadas y tetranucleadas y de esporas para cada tiempo se halla representado. (B) Análisis *Western-blot* de la proteína gas4p durante la meiosis sincrónica de la cepa S964. Las muestras para la obtención de extractos proteicos fueron recogidas a los tiempos indicados tras la inducción de la esporulación. Se emplearon anticuerpos policlonales anti-gas4p. Los niveles de actina fueron analizados como control de carga.

(datos no mostrados). Este resultado parece indicar que la proteína gas4p no está presente durante el ciclo mitótico o su cantidad es muy baja y no es detectada por los anticuerpos generados.

(V)- 2. La proteína gas4p está implicada en la maduración de las ascosporas de *S. pombe*

El proceso de esporulación comporta dos procesos independientes: una meiosis que conduce a la formación de cuatro núcleos haploides a partir de un núcleo diploide y un proceso morfogenético posterior que resulta en la encapsulación de estos núcleos en cuatro esporas independientes. Los estudios anteriormente descritos indicaban que la expresión de *gas4+* se induce durante el programa

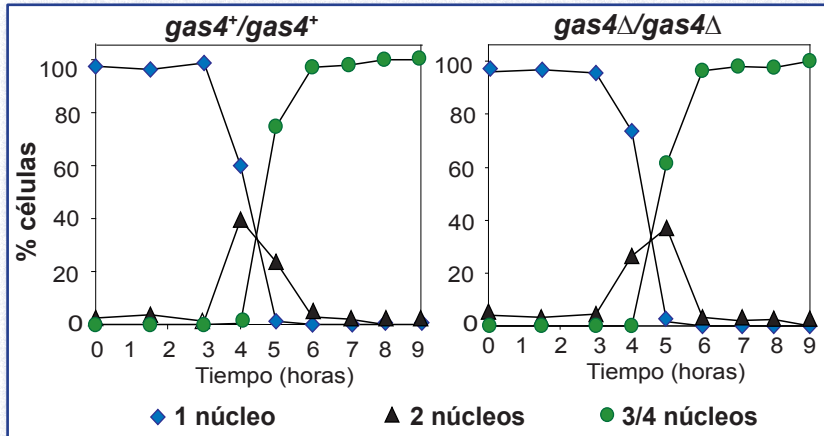


Figura 49. La proteína *gas4p* no está implicada en la progresión meiótica. Progresión meiótica de las estirpes *pat1-114/pat1-114 gas4⁺/gas4⁺* y *pat1-114/pat1-114 gas4^Δ/gas4^Δ*. Las muestras fueron recogidas a diferentes tiempos tras la inducción de la meiosis (mediante inactivación térmica de la kinasa) y se tiñeron con DAPI. En la figura se indica el porcentaje de células mono-, bi- y tetranucleadas en cada momento. En cada punto se analizó un mínimo de 200 células.

de esporulación y que la proteína codificada por dicho gen se acumula en un momento que coincide con la síntesis de la pared de la espora. A pesar de que inicialmente no cabría esperar que una proteína presumiblemente implicada en la síntesis de la pared celular afectara a la progresión meiótica, se decidió comprobar si la cinética de aparición de células binucleadas y tetranucleadas era similar en las cepas silvestre y mutante. Para ello, se indujo la meiosis en la cepa *pat1-114/pat1-114* y en el mutante homocigótico *pat1-114/pat1-114 gas4^Δ::KanMX4/gas4^Δ::KanMX4* (YMMR122) y se recogieron muestras a diferentes tiempos tras dicha inducción. Las muestras fueron teñidas con DAPI y se determinó el número de células mono-, bi- y tetranucleadas para cada tiempo. Como era esperable, no se apreciaron diferencias significativas en la progresión meiótica entre la cepa silvestre y la cepa mutante, ya que ambas alcanzaron un porcentaje similar de células tetranucleadas al mismo tiempo después de la inducción de la meiosis (Fig. 49).

A continuación, se decidió comprobar si *gas4p* estaba desempeñando alguna función durante el proceso morfogénico que tiene lugar tras la meiosis, ya fuese durante la síntesis propiamente dicha de la pared de la ascospora o en la maduración de la misma. Para ello, se analizó la morfología de las esporas generadas por cepas carentes de *gas4⁺*. Así, se deletionó dicho gen en dos cepas silvestres isogénicas de tipo sexual opuesto

(h54 y h116), obteniendo las cepas YMMR25 e YMMR30, respectivamente. Células de estas dos nuevas estirpes fueron incubadas juntas en placas de medio sólido YEPD (este medio induce la conjugación-esporulación en *S. pombe*). Las esporas mutantes poseían una morfología irregular y eran menos refringentes que las esporas silvestres (Fig. 50), lo cual sugería un defecto en la maduración de la pared de la ascospora. Estos experimentos permiten concluir que *gas4p* no es necesaria para la progresión meiótica, pero sí para la formación de esporas maduras.

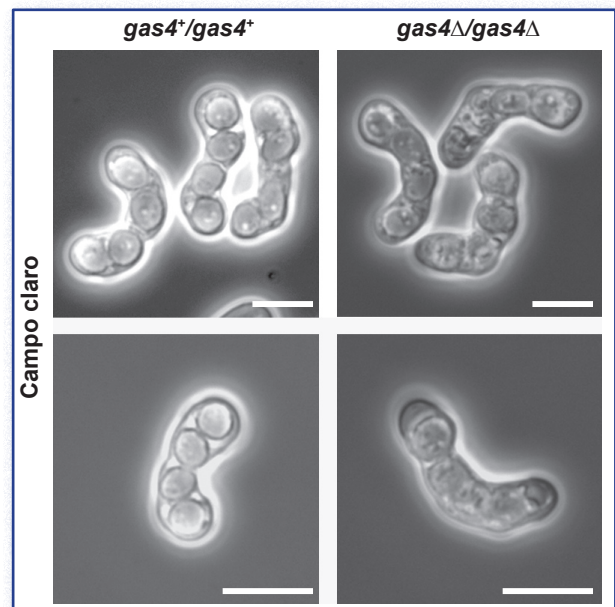


Figura 50. La proteína *gas4p* está relacionada con la maduración de las ascosporas de *S. pombe*. Aspecto de las ascas silvestres (*gas4⁺/gas4⁺*) y mutantes (*gas4^Δ/gas4^Δ*) al microscopio de contraste de fases tras 48 h de incubación en medio de esporulación. Barras de escala, 10 μm.

(V)- 3. Las esporas *gas4Δ* son inviables

Los defectos morfogénicos de las esporas *gas4Δ* sugerían la posibilidad de que también podía existir un defecto funcional en la pared de las esporas. Esta estructura es la que confiere la alta resistencia a condiciones de estrés, como el tratamiento con glucanasas o la exposición al calor, típica de las esporas. Por ello, un defecto en la estructura de la pared podría conducir a un defecto en la resistencia a estrés. Para responder esta cuestión, se procedió, en primer lugar, a analizar la capacidad de germinar de las esporas mutantes y su viabilidad comparándolas con esporas silvestres. Así, células haploides mutantes *gas4Δ* fueron cruzadas en placas de YEPD agar e incubadas a 25°C durante 2-4 días. Las cepas parentales haploides fueron empleadas como control de este experimento. Esporas provenientes de ambos cruces fueron separadas mediante micromanipulación en placas de medio sólido YES e incubadas durante 4 días a 32°C. Tras este periodo, alrededor del 80% de las esporas silvestres habían germinado y formado colonias visibles, mientras que menos del 1% de las esporas mutantes *gas4Δ* habían llegado a generar colonias (5 esporas de 511 esporas separadas). Para determinar si el defecto residía en la germinación propiamente dicha o si llegaban a formarse microcolonias a partir de las esporas mutantes, la morfología de las colonias fue analizada mediante microscopía óptica. Los resultados indicaron que las esporas mutantes *gas4Δ* eran incapaces de germinar (datos no mostrados). Las esporas se incubaron durante otros tres días adicionales (hasta una semana tras la disección), pero el resultado permaneció invariable, descartando así la posibilidad de un retraso en la germinación.

Para descartar que el defecto en germinación fuera debido a la incapacidad para mantener la integridad celular durante las primeras divisiones celulares, la separación de tétradas se repitió en medio rico con soporte osmótico (YES + 1,2 M sorbitol). En estas condiciones, el porcentaje de germinación de las esporas del mutante *gas4Δ/gas4Δ* fue similar al previamente observado en medio

sin sorbitol, no superando el 1% de las esporas analizadas. Adicionalmente, se quiso confirmar si las esporas estaban ya muertas y el defecto era anterior a la germinación propiamente dicha. Para ello, esporas silvestres y mutantes fueron teñidas con azul de metileno. Este colorante vital se utiliza normalmente para distinguir entre células vivas y muertas, ya que sólo tiñe el citoplasma de estas últimas (Kucsera *et al.*, 2000). Como puede observarse en la Figura 51, este colorante sólo fue incorporado en el epiplasma (material citoplasmático no encapsulado en las esporas) y en el citoplasma de las ascosporas de la estirpe mutante, pero no en las esporas *gas4+*, lo que indica que estas esporas han perdido la viabilidad.

Finalmente, se estudió la esporulación de cruces heterocigóticos (*gas4+* x *gas4Δ*) y se comprobó que se generaban ascas de aspecto normal (silvestre), con cuatro esporas refringentes y de viabilidad parecida a la de las esporas generadas en cruces homocigóticos silvestres. Este hecho indica que: a) la mutación *gas4Δ* es recesiva y b) que la proteína es sintetizada antes de que los núcleos haploides sean englobados en compartimentos independientes.

Resumiendo la información obtenida en estos ensayos, *gas4p* es imprescindible para la generación de ascosporas viables.

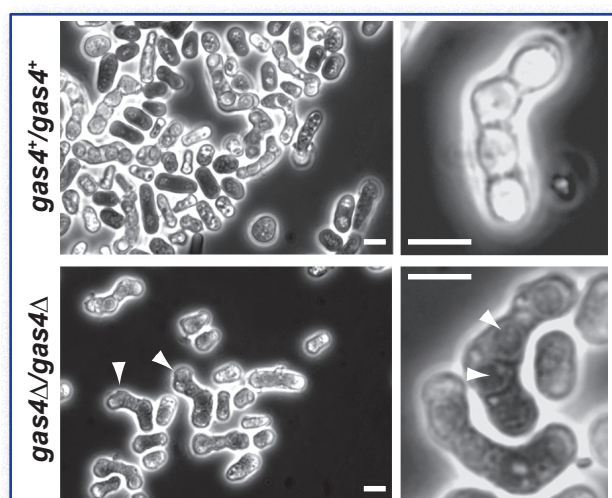


Figura 51. Las ascosporas *gas4Δ* son más permeables que las silvestres. Ascas de la cepa silvestre y del mutante *gas4Δ* fueron incubadas con azul de metileno 0,6% durante dos minutos antes de la captura de imágenes en el microscopio de contraste de fases. Las flechas señalan esporas *gas4Δ* teñidas con este colorante. Barras de escala, 10 μ m.

(V)- 4. La proteína *gas4p* es indispensable para la correcta formación de la pared de la espora

Para determinar con más detalle la naturaleza del defecto de los mutantes *gas4Δ*, se empleó también en este caso la microscopía electrónica de transmisión para comparar la morfología de la pared de la espora entre una cepa silvestre y una cepa mutante *gas4Δ*. Las cuatro esporas de un asca silvestre eran redondeadas y poseían una forma y un tamaño regular (Fig. 52A), mientras que las esporas de un asca *gas4Δ* eran de menor tamaño y más irregulares en cuanto a forma y tamaño (Fig. 52C). Además, el epiplasma parecía más oscuro que en las esporas *gas4+*. Cuando se observó con mayor aumento la pared de las esporas, en la cepa silvestre se distinguían claramente las dos capas que la componen (la capa más externa densa y la capa interna transparente a los electrones; Fig. 52B). El material electrotransparente está compuesto fundamentalmente por β -1,3-glucanos (flecha negra), mientras que

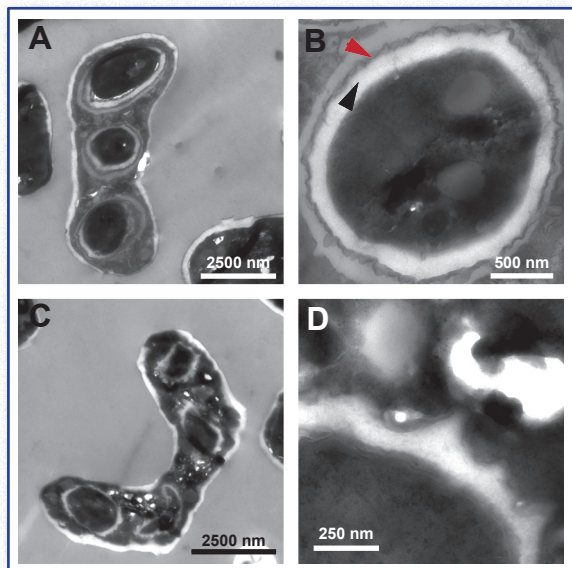


Figura 52. La proteína *gas4p* es imprescindible para una correcta síntesis de la pared de la espora. Ultraestructura al microscopio electrónico de transmisión de las esporas silvestres y mutantes *gas4Δ*. (A) En esta micrografía se observan tres de las cuatro ascosporas de un asca de tipo silvestre. El material opaco a los electrones forma una fina capa alrededor de la capa de β -1,3-glucano. (B) Detalle de la pared de una espora silvestre. La punta de flecha roja indica el material tipo amilosa en la capa más externa de la pared. La punta de flecha negra señala la capa interna de glucanos. (C) Asca mutante *gas4Δ* con cuatro esporas inmaduras. (D) Detalle de una ascospora mutante *gas4Δ*, donde la capa externa no está bien definida.

la capa electro-densa exterior está formada principalmente por material de tipo amilosa (glucosas unidas por enlaces α -1,4), galactomananos y proteínas propias de la pared celular (flecha roja). En las esporas mutantes *gas4Δ*, el grosor de la pared de la ascospora era irregular y la diferencia entre ambas capas no estaba bien definida. La capa externa no era claramente distinguible del epiplasma que la rodeaba, como si estuviese incorrectamente unida a la capa interna de la pared (Fig. 52D). Sin embargo, las ascas generadas a partir de células *gas4Δ* eran positivas al ensayo de tinción con yodo, indicando que el material tipo amilosa estaba presente (resultados no mostrados).

Estas observaciones permitieron concluir que las esporas de los mutantes *gas4Δ* poseen un grave defecto en la maduración de las ascosporas y que la pared de la espora no está ensamblada correctamente, lo que podría explicar su inviabilidad.

(V)- 5. La composición cuantitativa de la pared de las esporas *gas4Δ* es similar a la de las ascosporas silvestres

Ante los resultados obtenidos, surgió la pregunta de si la ausencia de *gas4p* podría estar suponiendo un desequilibrio entre los distintos componentes de la pared de las ascosporas. Existía la posibilidad de que una ramificación y elongación deficiente del β -1,3-glucano se tradujera en la liberación de este tipo de polímeros al medio de cultivo. De manera alternativa, un defecto en los procesos de ramificación del glucano no tendrían que suponer diferencias en las cantidades relativas de los polímeros de la pared de la ascospora, sino en un ensamblaje diferente entre los mismos.

Se procedió a realizar un fraccionamiento de los polímeros que constituyen la pared de las ascosporas procedentes cepas diploides silvestres para *gas4+* (*h/h- pat1-114/pat1-114*) y diploides mutantes nulos *gas4Δ* (*h/h- pat1-114/pat1-114 gas4Δ/gas4Δ*). Las cepas, procedentes de medio rico, se incubaron a 25°C durante 12 horas en medio mínimo con el fin de que se adaptaran a un medio pobre en nutrientes. Posteriormente, se

transfirieron a medio sin nitrógeno (MM-N) durante 15 horas para que las células quedaran en fase G0. Por último, los cultivos fueron transferidos a un incubador a 34°C, para inactivar la kinasa pat1p e inducir el proceso de esporulación. Al mismo tiempo, se añadió glucosa radiactiva ($U\text{-}^{14}\text{C}$, $1\mu\text{Ci/mL}$) y se incubaron así durante 20 horas. De este modo, se pretendía que la glucosa radiactiva que se incorporara fuera empleada en la síntesis proteica propia de la esporulación y en la síntesis *de novo* de las paredes de las ascosporas (no de las ascas).

Tras esta incubación, se extrajeron las paredes celulares y se sometieron a distintos tratamientos enzimáticos, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La cantidad de α -glucano en las ascosporas silvestres (48%) es mucho mayor que en las células vegetativas (28-30%) (García *et al.*, 2006). Así, la composición de la pared de células vegetativas difiere de la pared de las esporas: el β -glucano es predominante durante el ciclo mitótico, mientras que en las ascosporas predomina el α -glucano.

El protocolo empleado para fraccionar los polímeros de la pared de las esporas es similar al descrito en el Capítulo anterior, siendo la diferencia más destacable que únicamente se calculó el contenido de α -glucano + α -manano, por un lado, y el contenido de β -glucano, por otro. Los resultados obtenidos mostraron que las esporas silvestres y mutantes contenían una cantidad similar de β -1,3-glucano (15-20% del total de los polímeros de la pared) y de α -glucano + manano (70%). Estos valores difieren de los calculados por el Dr. I. García y colaboradores (2006), pero continúa siendo mayoritario el α -glucano. Los datos indican que la ausencia de *gas4p* no implica un desequilibrio entre los componentes de la pared de las esporas. Sin embargo, dados los defectos estructurales observados mediante microscopía óptica y electrónica y los defectos funcionales (manifestados como inviabilidad de las esporas), y debido a la naturaleza del ensayo de fraccionamiento, no se puede descartar que dichos componentes, aun estando presentes en las proporciones adecuadas, estén ensamblados de un modo anómalo en las paredes de las ascosporas mutantes.

(V)- 6. Los probables residuos catalíticos de *gas4p* son importantes para su función biológica

El alineamiento de las proteínas pertenecientes a la familia GH72 había mostrado previamente la existencia de dos ácidos glutámicos (indicados por asteriscos) perfectamente conservados en todas las proteínas de la familia, presentes en las secuencias (A/S)GNE*(V/I) y SE*(Y/F)GC (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000b; Papaleo *et al.*, 2006). Ambos aminoácidos están separados unos 100 residuos en las proteínas estudiadas y se ha propuesto que podrían formar el par catalítico implicado en la reacción de transferencia descrita para algunas proteínas de esta familia. De hecho, la sustitución de E160 y E261 por leucina (Leu) y fenilalanina (Phe), respectivamente, elimina la actividad catalítica *in vitro* de *AfGel1p* (Mouyna *et al.*, 2000b), y el reemplazo de E161 y E262 por dos residuos de glutamina (Gln) destruye completamente la actividad catalítica *in vitro* de *ScGas1p* (Carotti *et al.*, 2004). En *gas4p*, los ácidos glutámicos que constituirían el posible par catalítico ocupan las posiciones 157 y 257.

Para analizar la importancia de estos dos aminoácidos en la función biológica de *gas4p*, se diseñaron dos formas mutantes de esta proteína: *gas4p*-E157Q y *gas4p*-E257Q. En ellas se sustituía uno de los aminoácidos conservados por un residuo estructuralmente análogo, la glutamina. Con la finalidad de estudiar la morfología de las esporas y su viabilidad, estos alelos mutantes fueron clonados en plásmidos bajo el control de su propio promotor y los plásmidos resultantes fueron introducidos en cepas *gas4Δ* h^+ y h^- . La morfología de las esporas generadas por estas cepas se analizó mediante microscopía de contraste de fases y se comparó con la de esporas del mutante *gas4Δ* transformadas con el vector (control negativo) o con el gen silvestre *gas4+*. Además, las cepas parentales haploides fueron empleadas para estudiar la eficiencia de esporulación de las cepas portadoras de los distintos plásmidos. Los resultados de este ensayo indicaron que únicamente las esporas portadoras de la forma nativa de *gas4p*

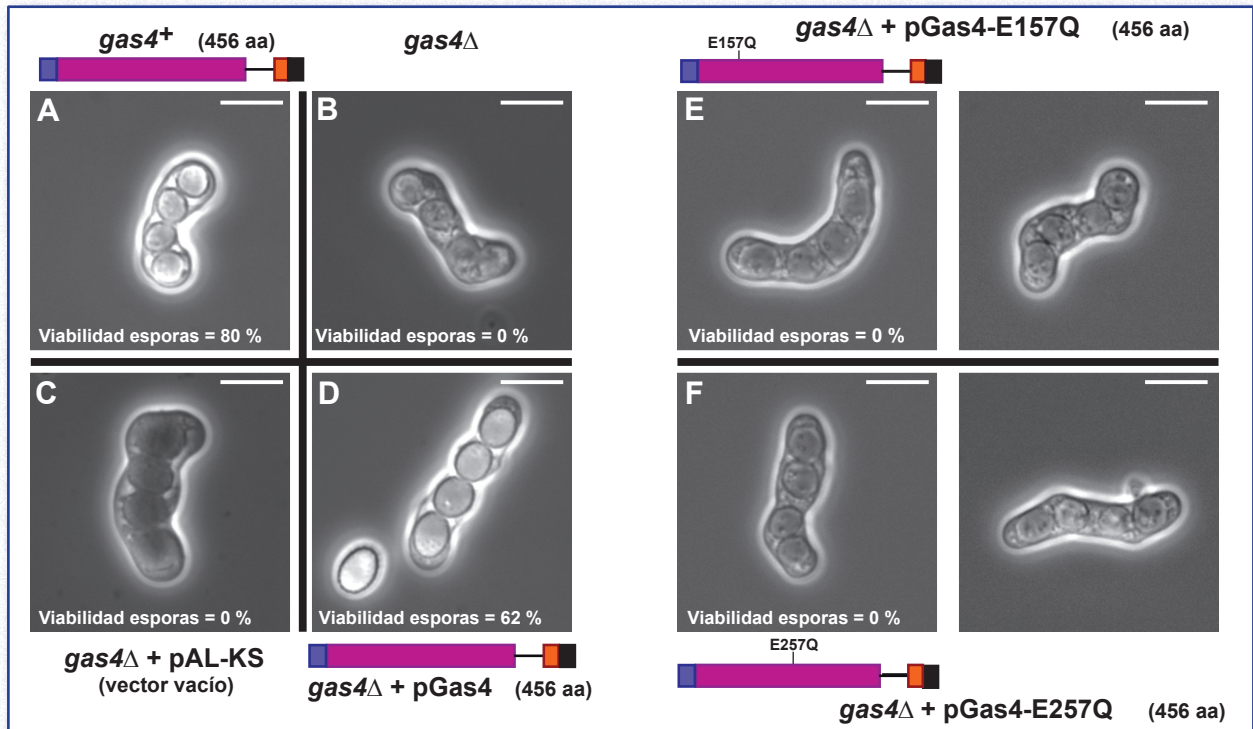


Figura 53. Los residuos de glutámico E157 y E257 son necesarios para la función biológica de gas4p. La cepa silvestre (A), el mutante nulo (C) y la cepa *gas4Δ* portando el vector pAL-KS (C) o los plásmidos pMMR14 (D), pMMR30 (E) y pMMR29 (F) fueron sometidas a esporulación en placas de medio sólido MEA. Se muestran imágenes de microscopía de contraste de fases. La viabilidad de las esporas de cada cepa está indicada sobre cada imagen. La leyenda de los dominios de gas4p es la misma de la Figura 25 (Capítulo III). Barras de escala, 10 μ m.

eran capaces de formar esporas silvestres, con su refringencia característica (Fig. 53A y D). La morfología de las esporas que contenían los alelos *gas4p*-E157Q y *gas4p*-E257Q (Fig. 53E y F) era similar a la observada en el mutante (Fig. 53B y C), carentes de refringencia. Más aún, las esporas producidas por las estirpes que expresaban las formas *gas4p*-E157Q y *gas4p*-E257Q eran incapaces de germinar, y su viabilidad era similar a la del mutante *gas4Δ* (Fig. 53). Ambos resultados (morfología anormal y esporas inviables) indican que los dos glutámicos conservados son importantes para la función biológica de *gas4p* durante la esporulación de *S. pombe*. Además, puesto que estos aminoácidos forman parte del par catalítico en otros miembros de esta familia de proteínas, es muy probable que también lo sean en *gas4p*, de modo que la actividad catalítica de *gas4p* sea esencial en la síntesis y maduración de la pared de la espora.

(V)- 7. La proteína *gas4p* se localiza en la periferia de las ascosporas

Para determinar la localización subcelular de *gas4p* durante la esporulación, se decidió marcar esta proteína con la proteína amarilla fluorescente (YFP). Al igual que se explicó en el Capítulo anterior para *gas1p* y *gas5p*, tanto la secuencia señal N-terminal como la secuencia hidrofóbica C-terminal para anclaje mediante GPI podrían ser importantes para una correcta localización de *gas4p*. Por ello, *gas4+* fue clonado en un plásmido y la región codificante de la YFP se insertó entre la secuencia señal y el dominio GluTD mediante PCR recombinante (Fig. 54A). El plásmido resultante (pMMR19) se introdujo en dos cepas haploides silvestres de tipo sexual opuesto, que fueron sometidas a condiciones de conjugación-esporulación. Las células en esporulación se observaron al microscopio y se observó que la proteína de fusión YFP-*gas4p* se localizaba en la periferia de las ascosporas (Fig. 54B). Dicha localización podría corresponder tanto a la membrana como a la pared de la espora, ya que son lugares desde donde

gas4p podría ejercer la función de transglicosidasa que se le atribuye en las bases de datos por su parecido a ScGas1p.

La proteína gas4p contiene una posible secuencia para la adición de un grupo GPI en su extremo carboxilo. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en ScGas1p, esta señal no posee un motivo dibásico inmediatamente antes del punto de corte predicho (ver figura 25C en el Capítulo III). Se admite que dicho motivo dibásico es el responsable de dirigir el anclaje de la proteína a la membrana plasmática (Caro *et al.*, 1997; Frieman y Cormack, 2003). Por ello, ScGas1p se localiza predominantemente en la membrana plasmática; adicionalmente, una pequeña parte del contenido total de ScGas1p de la célula está unida covalentemente a la pared celular. La explicación para la localización secundaria de esta proteína de la levadura de gemación radica en que ScGas1p presente una región rica en serinas que solapa parcialmente con el motivo dibásico (Frieman y Cormack, 2004). Estos datos sugieren que gas4p (sin motivo dibásico y con una pequeña zona rica

en serinas cercana al extremo Ct) podría estar dirigida hacia la pared celular, donde se uniría al β -1,6-glucano a través del grupo GPI. En cualquier caso, dicha asunción está basada en los conocimientos proporcionados por las proteínas de *S. cerevisiae* y queda por confirmar que la presencia de un motivo dibásico y de una zona rica en serinas próximas al sitio de corte ejercen la misma influencia en el caso de las proteínas de la levadura de fisión.

(V)- 8. El motivo de anclaje GPI es importante para la localización de gas4p y su funcionalidad in vivo

A continuación, se decidió estudiar el papel que el anclaje a través del grupo GPI podía tener en la función biológica de gas4p. Para otros miembros de la familia de proteínas GH72, había sido demostrado con anterioridad que formas recombinantes carentes de la señal GPI poseían la misma actividad catalítica *in vitro* que las formas nativas de dichas proteínas. Así, AfGel1p y AfGel1p- Δ GPI poseían actividad β -1,3-glucanosil-transferasa *in vitro* (Mouyna *et al.*, 2000a). De la misma manera, la actividad catalítica de gas4p no se ve afectada si se deleta la señal de anclaje mediante GPI, como se comentará con más detalle en el Capítulo VI de esta Memoria. Sin embargo, esta truncación podría interferir con la localización o funcionalidad de la proteína *in vivo*, y esto era lo que se pretendía analizar en esta etapa del desarrollo del trabajo experimental.

Partiendo de esta asunción, se construyó una forma truncada de gas4p (gas4p- Δ GPI, Fig. 55A) -en la cual la secuencia hidrofóbica C-terminal había sido deletada-, se clonó en un plásmido bajo el control del promotor nativo de *gas4*⁺ (pMMR26) y se transformó en dos estirpes haploides mutantes *gas4* Δ de tipo sexual opuesto. Posteriormente, se indujo la conjugación y esporulación de las cepas resultantes en medio sólido y se analizó la morfología y viabilidad de las esporas generadas. Al igual que en el análisis de las mutaciones en los aminoácidos catalíticos, se com-

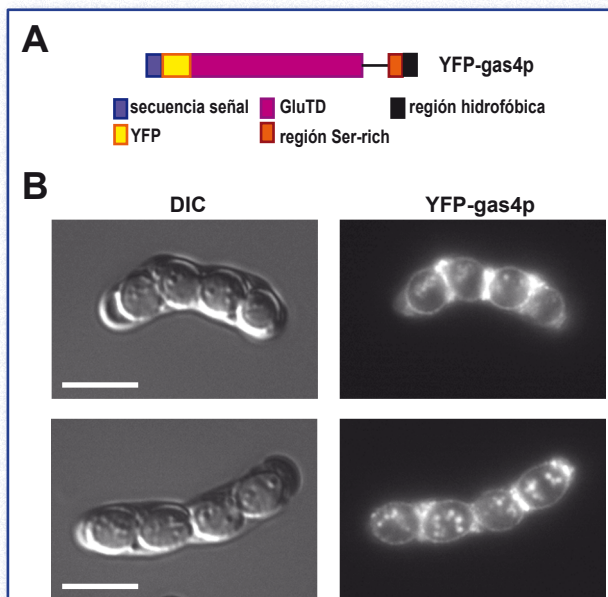


Figura 54. La proteína gas4p se localiza en la periferia de la espora. (A) Representación esquemática de la proteína de fusión YFP-gas4p presente en el plásmido pMMR19. (B) Localización de la proteína YFP-gas4p en esporas silvestres. Células silvestres haploides de tipo sexual opuesto que portaban el plásmido pMMR19 fueron incubadas en medio líquido hasta la fase de crecimiento exponencial temprana y posteriormente se indujo su esporulación en placas de medio sólido MEA. Las placas fueron incubadas a 25°C durante dos días antes de la captura de imágenes de microscopía de contraste diferencial (DIC) y de fluorescencia YFP (YFP-gas4p). Barras de escala, 10 μ m.

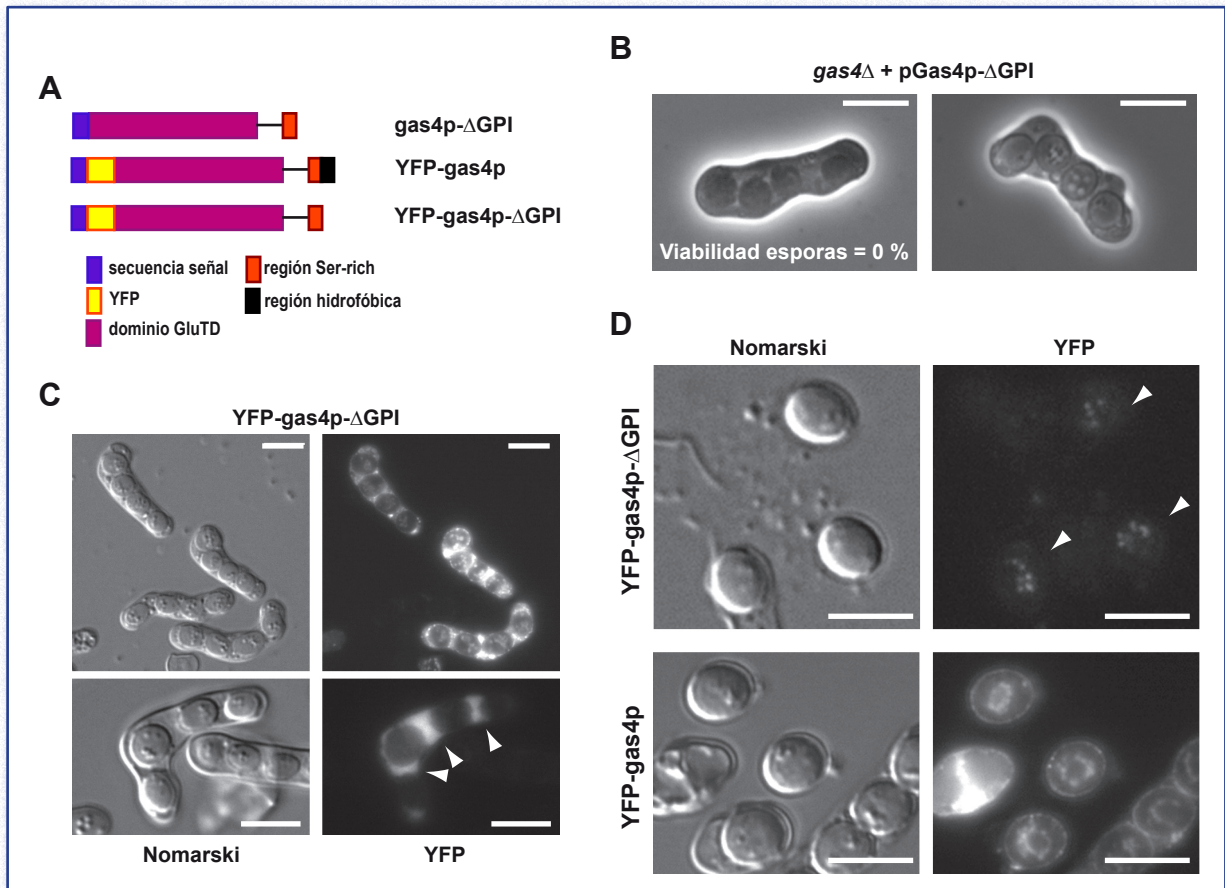


Figura 55. El anclaje GPI es necesario para la funcionalidad de *gas4p* in vivo. (A) Representación esquemática de las construcciones truncadas de *gas4p* empleadas en el ensayo. (B) Se indujo la esporulación en la cepa mutante *gas4Δ* que llevaba el plásmido pMMR26 (*gas4p-ΔGPI*) mediante incubación en placas de MEA. Se muestran fotografías de las esporas tras dos días de esporulación obtenidas en un microscopio de contraste de fases. Los controles de este experimento son los mismos que en la Figura 53. (C) El motivo GPI es responsable de la localización de *gas4p* en el contorno de la espora. La cepa silvestre portadora de la versión *YFP-gas4p-ΔGPI* fue sometida a condiciones de esporulación en placas de MEA durante dos días. En la figura se muestran fotografías de contraste diferencial de interferencia (DIC) y de fluorescencia YFP (YFP). Barras de escala, 10 μm. (D) Fotografías de esporas liberadas generadas a partir de la cepa silvestre que expresaba *YFP-gas4p-ΔGPI* (panel superior) o *YFP-gas4p* (panel inferior) tras incubación de dos días en medio de esporulación. Las cabezas de flecha indican la periferia de las esporas. Barras de escala, 10 μm.

paró el fenotipo de las ascas producidas por una cepa silvestre con el de aquéllas generadas por una cepa mutante que portaba el vector, el gen *gas4⁺* nativo o el alelo *gas4-ΔGPI*. Los resultados obtenidos indicaron que las esporas producidas por las células portadoras de la forma truncada de *gas4p* eran similares a las del mutante nulo, carentes de refringencia (Fig. 53 y 55B). Además, la proteína *gas4p-ΔGPI* era incapaz de complementar la ausencia de viabilidad de las esporas mutantes *gas4Δ*, puesto que ninguna de las ascosporas carentes del GPI fue capaz de germinar. Estos resultados, junto con lo que ya se había determinado para *AfGel1p* y con lo que se describirá en el Capítulo VI, sugieren que el motivo GPI no es necesario para la actividad catalítica, pero que dicho anclaje de la proteína (ya sea a la membrana

plasmática o a la pared celular) parece de extrema importancia para su funcionalidad *in vivo*.

Una de las hipótesis para explicar la ausencia de complementación de los defectos de las cepas mutantes *gas4Δ* podría ser que el motivo de anclaje GPI fuese necesario para retener a la proteína en la periferia de la espora (Nuoffer *et al.*, 1991; Vanoni *et al.*, 1994). Para comprobarla, se construyó una versión marcada con YFP de la proteína *gas4p-ΔGPI* y se introdujo en cepas haploides *gas4Δ* de tipo sexual opuesto, en las que se indujeron los procesos de conjugación y esporulación en placas de medio MEA durante 48 horas. Los resultados de este experimento mostraron que la proteína truncada no era retenida en la periferia de las ascosporas, al contrario de lo que ocurría con la forma nativa *YFP-gas4p*, y que la mayo-

ría de la proteína YFP-gas4p-ΔGPI se acumulaba en el epiplasma que rodea las esporas (Fig. 55C, flechas). Es más, cuando la pared del asca sufría endolisis para liberar las ascosporas, la fluorescencia era fácilmente detectable en el contorno de las esporas que expresaban YFP-gas4p (Fig. 55D, panel inferior), mientras que la fluorescencia nunca aparecía asociada con las ascosporas portadoras de YFP-gas4p-ΔGPI (Fig. 55D, panel superior).

En conjunto, estos experimentos permiten concluir que el anclaje GPI no es necesario para su actividad catalítica, pero sí para retener la proteína en la periferia de las ascosporas, siendo la localización adecuada de gas4p en el contorno de las esporas imprescindible para el ensamblaje correcto de una pared de la ascospora funcional. Además, teniendo en cuenta que la única diferencia entre YFP-gas4p e YFP-gas4p-ΔGPI era la presencia o ausencia de dicho motivo, y que ambas construcciones tenían localizaciones diferentes, se asumió que dichos destinos subcelulares eran fruto de la estructura modular de gas4p (en concreto, de la secuencia señal y del GPI).

(V). 9. La proteína gas4p complementa el defecto de esporulación del mutante gas2Δ gas4Δ de *S. cerevisiae*

Como se apuntó ya en la Introducción de esta Memoria, recientemente se ha publicado un trabajo en el que se demuestra el papel que desempeñan dos genes de la familia GH72 durante el proceso de esporulación en la levadura de gemación (Ragni *et al.*, 2007a). De los cinco genes presentes en *S. cerevisiae* que codifican proteínas pertenecientes de la familia GH72, se ha comprobado que dos de ellos, *GAS2* y *GAS4*, se expresan específicamente durante el proceso de esporulación. Los mutantes nulos *gas2Δ* o *gas4Δ* no presentan ningún tipo de defecto durante el crecimiento vegetativo ni durante el proceso de esporulación. Sin embargo, el mutante doble *gas2Δ gas4Δ* apenas produce esporas maduras y éstas son más permeables y más sensibles a estrés enzimático

(tratamiento con Zimoliasa) que las esporas generadas a partir de una estirpe diploide silvestre.

Puesto que *gas4+* parece desempeñar su papel en la construcción de la pared celular específica de la spora y la estructura modular de las proteínas gas4p y ScGas4p es bastante similar, además de presentar un alto porcentaje de identidad cuando se comparan sus secuencias de aminoácidos, podría ocurrir que la proteína gas4p de *S. pombe* fuera capaz de reemplazar la función de las proteínas ScGas2p o ScGas4p durante el proceso de esporulación de la levadura de gemación. Para responder a este interrogante, se procedió a la expresión heteróloga de gas4p en el mutante *gas2Δ gas4Δ* de *S. cerevisiae*. Para conseguir que el gen *gas4+* se expresara como un gen de esporulación en *S. cerevisiae*, se clonó la región codificante bajo el control del promotor del gen *SPO20* (P_{SPO20}) de *S. cerevisiae*, contenido en el vector pRS424- P_{SPO20} . El gen *SPO20* es un gen específico de esporulación en la levadura de gemación, cuya expresión se induce con una cinética similar a la de los genes medios (Chu *et al.*, 1998). Por ello, esta estrategia permite inducir la expresión durante la esporulación de genes que, de otro modo, no se expresarían en este momento ni en este sistema (existen diferencias entre los promotores de *S. cerevisiae* y de *S. pombe*, por lo que no siempre son intercambiables). El plásmido con la construcción resultante (P_{SPO20} -*gas4+*) se denominó pMMR38. A continuación, la cepa ER309 (*gas2Δ gas4Δ/gas2Δ gas4Δ*) se transformó con dicho plásmido para estudiar la capacidad del gen de *S. pombe* para rescatar los defectos de esporulación. Este transformante se denominó YMMR129 (Fig. 56). Como controles del experimento se utilizaron la estirpe mutante ER309 y la estirpe silvestre isogénica AN120 transformadas con el vector pRS424- P_{SPO20} , para poder incubarlo en el mismo medio selectivo que la cepa YMMR129 antes de transferirlas a medio de esporulación y descartar cualquier influencia debida a crecimiento en medios diferentes. Estas dos últimas cepas se denominaron YMMR128 e YMMR127, respectivamente (Fig. 56).

Una vez obtenidos los transformantes, se transfirieron a medio de esporulación y se incubaron en

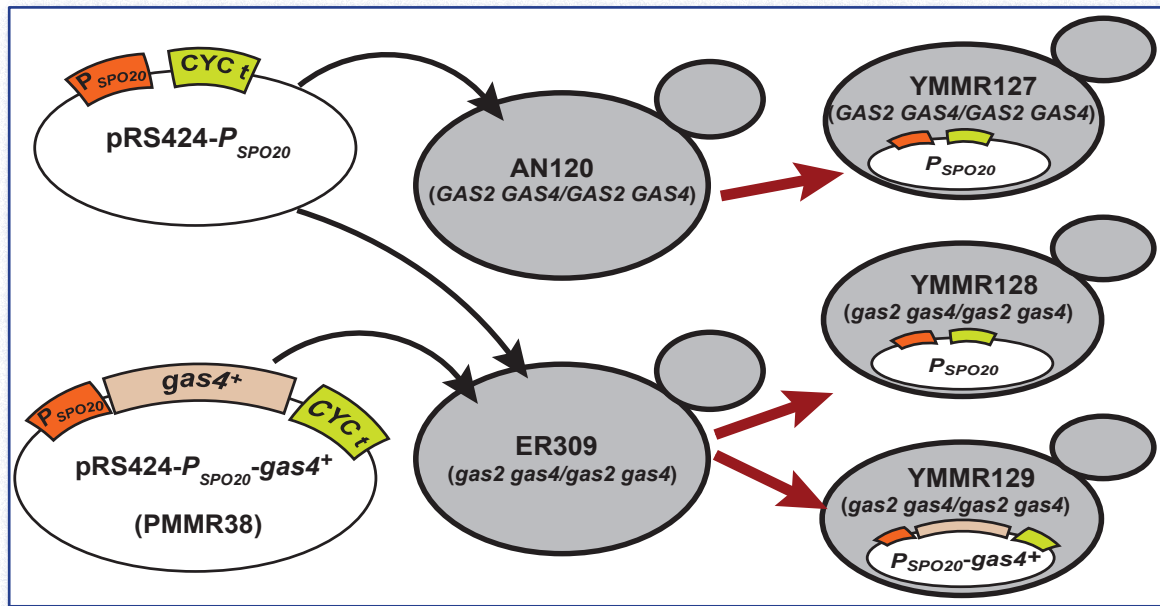


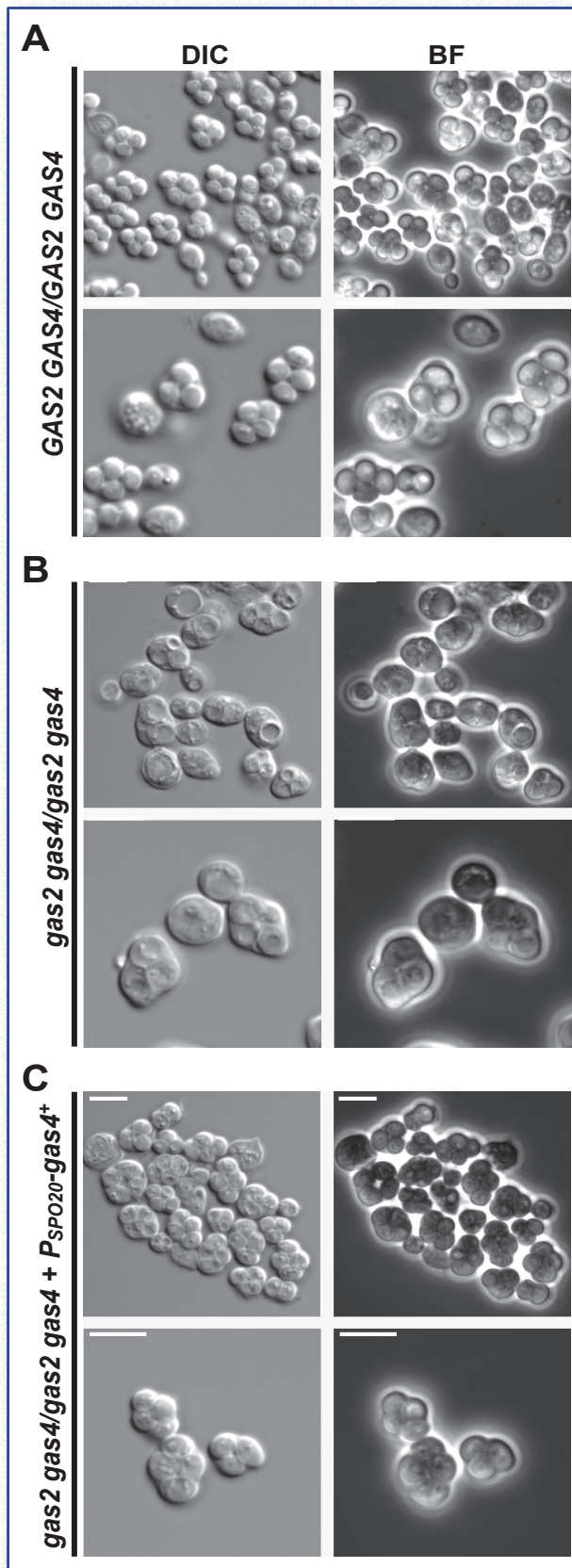
Figura 56. Diseño experimental del ensayo de complementación de los defectos del mutante doble *gas2 gas4/gas2 gas4* de la levadura de gemación por la proteína *gas4p* de *S. pombe*. El gen *gas4+* fue clonado bajo el control del promotor P_{SPO20} en el vector pRS424- P_{SPO20} , generando el plásmido pMMR38. Ambos plásmidos fueron transformados en el mutante doble *gas2 gas4/gas2 gas4* (estirpe ER309) de *S. cerevisiae*, generando las cepas YMMR128 e YMMR129, respectivamente. Asimismo, el vector pRS424- P_{SPO20} se introdujo en la cepa silvestre (AN120), obteniendo la estirpe YMMR127.

estas condiciones durante 24 horas, transcurridas las cuales se observaron en el microscopio óptico mediante contraste de fases y contraste interferencial. Los resultados obtenidos mostraron que las esporas de la cepa silvestre YMMR127 presentaban un aspecto normal, es decir, las ascas contenían esporas de un tamaño uniforme, con la típica disposición en diamante y, además, presentaban la refringencia característica cuando se observaban mediante contraste de fases (Fig. 57A, DIC). Por el contrario, el mutante ER309 transformado con vector era incapaz de formar esporas maduras, las ascas generadas poseían una apariencia irregular, similar a lo descrito previamente (Ragni *et al.*, 2007a), y las ascas perdían la forma en diamante (Fig. 57B, DIC). Además, en muchos casos era difícil distinguir las esporas dentro del asca como resultado de los defectos en la maduración de la pared de la espora. Por último, cuando el mutante homocigótico *Sc gas2Δ gas4Δ* expresaba el gen *Spgas4+*, las esporas recuperaban la disposición romboidal característica de la cepa silvestre así como la refringencia (Fig. 57C, DIC). También se observaba que el grado de madurez de las esporas era superior a las del mutante, aunque no llegaban a ser completamente silvestres. Para cuantificar el grado de complementación, se hizo un recuento del número de las ascas con, al

menos, una ascospora de aspecto maduro (en la que claramente se podía identificar el borde de la espora) en cultivos de las tres cepas tras 24 h de esporulación. Los resultados se recogen en la Figura 58A. La eficiencia de esporulación publicada para las cepas silvestre AN120 y el mutante homocigótico *gas2 gas4* ER309 son del 73% y del 30%, respectivamente (Ragni *et al.*, 2007a). En nuestro laboratorio, las eficiencias de esporulación obtenidas para dichas estirpes portando el vector, fueron similares: 71% y 21%, respectivamente. Como se observa en la Figura 58A, la expresión heteróloga de *gas4+* rescataba la baja eficiencia de esporulación del doble mutante *gas2Δ gas4Δ/gas2Δ gas4Δ* hasta niveles similares a los de la cepa silvestre. Estos resultados indican que el gen *gas4+* es capaz de complementar, en gran parte, los defectos morfológicos en la maduración de las esporas de la cepa *gas2Δ gas4Δ* de *S. cerevisiae*.

Para confirmar si la complementación del defecto era completamente funcional, se realizaron dos experimentos con las estirpes YMMR127, YMMR128 e YMMR129. En primer lugar, se tiñeron las esporas con azul de metileno que, como se ha comentado anteriormente, es un indicador de los defectos en permeabilidad y en la viabilidad celular, permitiendo distinguir células vivas de

Figura 57. La proteína gas4p complementa parcialmente los defectos fenotípicos del mutante *gas2 gas4* de *S. cerevisiae*. Las tres cepas descritas en la Figura 56 fueron incubadas en acetato potásico para inducir la esporulación. Tras 24 horas, se recogieron las muestras, se trataron con azul de metileno al 0,6 % y se observaron en el microscopio óptico utilizando la técnica Nomarski (DIC) o mediante contraste de fases (Bright Field, BF) (para detectar diferencias de permeabilidad al azul de metileno). (A) Las esporas de la cepa silvestre AN120 de *S. cerevisiae* transformadas con vector pRS424-P_{SPO20} presentan una morfología normal, con ascosporas refringentes y no permeables al azul de metileno. (B) Las esporas del mutante *gas2 gas4/gas2 gas4* presentan un escaso grado de maduración de la pared celular y elevada permeabilidad al azul de metileno. (C) La proteína gas4p de *S. pombe* rescata parcialmente los defectos de la cepa ER309 (*gas2 gas4/gas2 gas4*). Barras de escala, 10 μ m.



muertas. En el análisis microscópico, se comprobó que las esporas del mutante doble *gas2 Δ gas4 Δ /gas2 Δ gas4 Δ* portadoras del vector presentaban un aspecto más oscuro que las esporas mutantes que expresaban *gas4⁺* (Fig. 57B-C, BF). Este resultado indica que en las ascas del mutante *gas2 Δ gas4 Δ /gas2 Δ gas4 Δ* existen defectos importantes en permeabilidad o, incluso, esporas muertas, que se corrigen cuando las células contienen *gas4⁺*. En segundo lugar, se ha descrito que las esporas del mutante *gas2 Δ gas4 Δ* poseen una viabilidad reducida en comparación con la cepa silvestre y una mayor sensibilidad al tratamiento con Zimoliasa como consecuencia de los defectos en maduración de la pared celular (Ragni *et al.*, 2007a). Para comprobar si el mayor grado de madurez de las esporas de la cepa YMMR129 se correspondía también con un mayor aumento en la viabilidad de las mismas, se analizó la viabilidad de las esporas de las distintas estirpes tras 24 h de incubación en medio de esporulación sembrándolas en medio rico el mismo número de células de cada cepa e incubando posteriormente las placas 24 h a 28°C. Los resultados mostraron que las esporas del mutante *gas2 Δ gas4 Δ* tenían una viabilidad muy reducida en comparación con la de la cepa silvestre isogénica (2% frente al 81%, respectivamente), y que la introducción de *gas4⁺* restauraba parcialmente la viabilidad (37%) (Fig. 58B, tiempo 0). Adicionalmente, el tratamiento con Zimoliasa confirmó estos resultados. La Zimoliasa es un preparado enzimático capaz de hidrolizar la pared celular de las ascas y liberar las esporas de *S. cerevisiae*, pero no es capaz de atacar la capa de glucano de la pared de la espora, ya que el chitosán y la capa de ditirosina limitan su accesibilidad. Por ello, la pérdida de la capacidad de formar colonias después de un tratamiento con Zimoliasa es un indicador de un aumento de la permeabilidad de la pared de la espora a dicho preparado enzimático. Así, se realizó un ensayo cuantitativo de

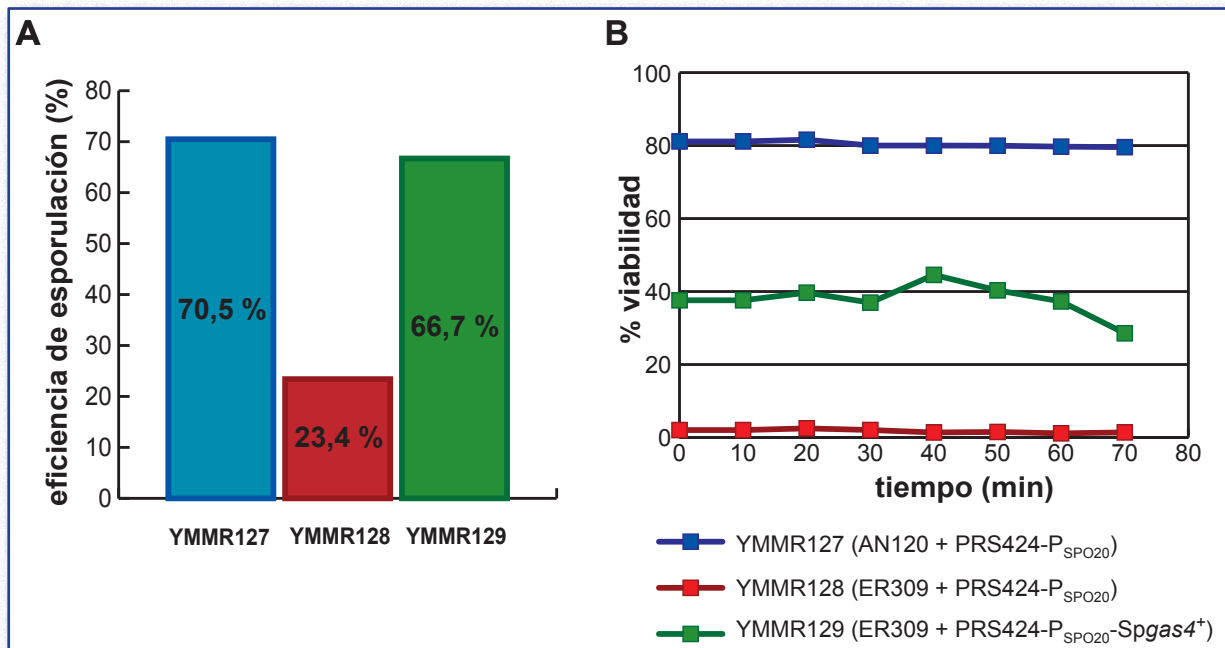


Figura 58. La proteína gas4p complementa parcialmente el defecto en esporulación y la viabilidad de las esporas gas2 gas4/gas2 gas4 de *S. cerevisiae*. (A) La expresión heteróloga de gas4p en el mutante doble consigue eficiencias de esporulación similares a las de la cepa silvestre parental AN120. Las cepas YMMR127, YMMR128 e YMMR129 fueron sometidas a condiciones de esporulación en acetato potásico al 2%. Tras 24 horas, se realizó un recuento de las ascas generadas (considerando como tales aquellas que presentaran, al menos, una espora madura). (B) Ensayo de sensibilidad a Zimoliasa. Células de las distintas estirpes fueron expuestas a Zimoliasa durante los tiempos indicados y, posteriormente, sembradas en placas de medio rico para titular el número de células viables. Para cada cepa, la viabilidad se expresó como el porcentaje de colonias viables respecto al total de células sembradas en cada caso (5.000 células por placa).

la sensibilidad a Zimoliasa de células incubadas durante 24 horas en medio de esporulación. Una alícuota de cada cultivo fue sometida a tratamiento con la mencionada enzima lítica. Se retiraron muestras a distintos tiempos del tratamiento para inocular placas de medio rico YEPD con el mismo número de células por placa, que se incubaron durante dos días a 28°C. Transcurrido este tiempo, se contó el número de colonias viables en cada placa. Los valores de UFC (unidades formadoras de colonias) a distintos tiempos después de la exposición a Zimoliasa fueron comparados con el número de células plaqueadas en cada tiempo y la viabilidad se expresó como el porcentaje respecto a las células inoculadas. Los resultados mostraron que la cepa silvestre era resistente a la Zimoliasa y mantenía una viabilidad en torno al 80% a lo largo del experimento (Fig. 58B). Por el contrario, el mutante *gas2 gas4* presentaba una viabilidad muy reducida (en torno al 1-2%), en la que era difícil evaluar el efecto del tratamiento enzimático. En el caso del mutante *gas2Δ gas4Δ* que expresaba el gen *gas4⁺* de *S. pombe*, presentaba unos valores de viabilidad intermedios entre las dos cepas con-

rol (en torno al 40%), como se había comprobado anteriormente. Sin embargo, a partir de los 40-50 minutos de incubación con Zimoliasa comenzaba a detectarse una caída en el número de colonias viables, lo que indicaba que la pared celular de la espora no estaba perfectamente ensamblada y no era completamente funcional (Fig. 58B).

Todos los resultados obtenidos en estos ensayos de complementación permiten concluir que la proteína gas4p de la levadura de fisión es capaz de rescatar parcialmente los defectos morfológicos y la permeabilidad de las esporas *gas2 gas4* de *S. cerevisiae*, aunque las esporas producidas no son completamente funcionales. Ello indica que no sólo existe una conservación entre la secuencia primaria y la estructura modular de las proteínas GH72 de ambas levaduras, sino que existe un cierto grado de conservación en la función biológica. Es muy probable que tanto gas4p como ScGas4p se localicen de forma semejante y se unan a sustratos similares para realizar su actividad catalítica.

(VI)- RESULTADOS

**Caracterización de la actividad catalítica de
las proteínas GH72 de *S. pombe***

(VI)- RESULTADOS: Caracterización de la actividad catalítica de las proteínas GH72 de *S. pombe*

(VI)- 1. Elección del sistema de expresión proteica

La similitud de secuencia entre *gas1p*, *gas2p*, *gas4p* y *gas5p* con otras proteínas de la familia GH72 y la conservación de la secuencia alrededor de los dos glutámicos que constituyen el par catalítico –FF(A/S)GNE*V (el donador ácido-base) y F(F/L)SE*(Y/F)GCN (el residuo nucleofílico) (Mouyna *et al.*, 2000b; Papaleo *et al.*, 2006)- sugería que las proteínas objeto de este estudio podrían también poseer una actividad de tipo β -1,3-glucanosiltransferasa. En esta parte del trabajo experimental se procedió a caracterizar la actividad enzimática de las proteínas de la familia GH72 de *S. pombe*.

Como norma general, para caracterizar bioquímicamente una proteína es necesario disponer de ella en cantidad suficiente, por un lado, y con un cierto grado de pureza, por otro. No siendo una excepción nuestro caso, era necesario diseñar una aproximación que permitiera la producción de las proteínas en estudio en gran cantidad, lo que se traduciría en muestra suficiente para realizar todos los ensayos necesarios. Asimismo, las proteínas producidas debían obtenerse lo más puras posibles o, en caso contrario, idear un proceso de purificación sencillo y con buenos rendimientos.

Para la elección del organismo como sistema de expresión proteica, la primera consideración se refiere a la facilidad de trabajar con dicho organismo. Así, habitualmente se vienen empleando bacterias, como *E. coli*, o levaduras, como es el caso de *S. cerevisiae*. Ambos son organismos cuyos requerimientos de crecimiento y simplicidad

de manipulación son ampliamente conocidos y sus costes, aceptables. La segunda reflexión que hay que tener en cuenta es la posibilidad de que el organismo elegido produzca la proteína problema de un modo muy similar a como dicha proteína se sintetiza, se pliega y se modifica en condiciones naturales. En nuestro caso, estudiamos proteínas de la levadura de fisión, un organismo eucariota. Por tanto, la primera elección debería ser también una levadura como *S. cerevisiae*, ya que tiene mecanismos de procesamiento proteico, plegamiento y modificación post-traduccionales propios de eucariotas. Así, la opción de utilizar una bacteria como sistema de expresión quedó descartada. Ahora bien, dentro de las levaduras, *S. pombe* es más próximo a eucariotas superiores que la levadura de gemación, y las modificaciones post-traduccionales de sus proteínas podrían ser más complejas que las que puede ofrecer *S. cerevisiae*. Así, a pesar de que esta última podía servir bien a nuestros propósitos, consideramos la posibilidad de utilizar otra levadura, *Pichia pastoris*.

P. pastoris posee muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de eucariotas superiores, como el procesamiento y el plegamiento proteicos y las modificaciones post-traduccionales. A la vez, es tan cómodo de manipular como *E. coli* o *S. cerevisiae*. Además, respecto a los sistemas de expresión de eucariotas superiores, es más rápido, fácil y menos costoso en su empleo, y generalmente proporciona niveles de expresión más elevados. Como levadura que es, comparte las ventajas de manipulaciones genéticas y moleculares del género *Saccharomyces*, produciendo niveles de expresión heteróloga de proteínas de 10 a 100 veces superiores. Teniendo en cuenta todo lo anterior, decidimos idear nuestra estrategia de producción proteica y posterior purificación empleando *P. pastoris*. En la Figura 59 se muestra el diseño experimental para la expresión, purificación y análisis de las proteínas de interés. A continuación, se detallan algunas características de esta levadura que han sido aprovechadas para su desarrollo como *kit* de expresión proteica (*Easy-Select™ Pichia Expression Kit*, de Invitrogen).

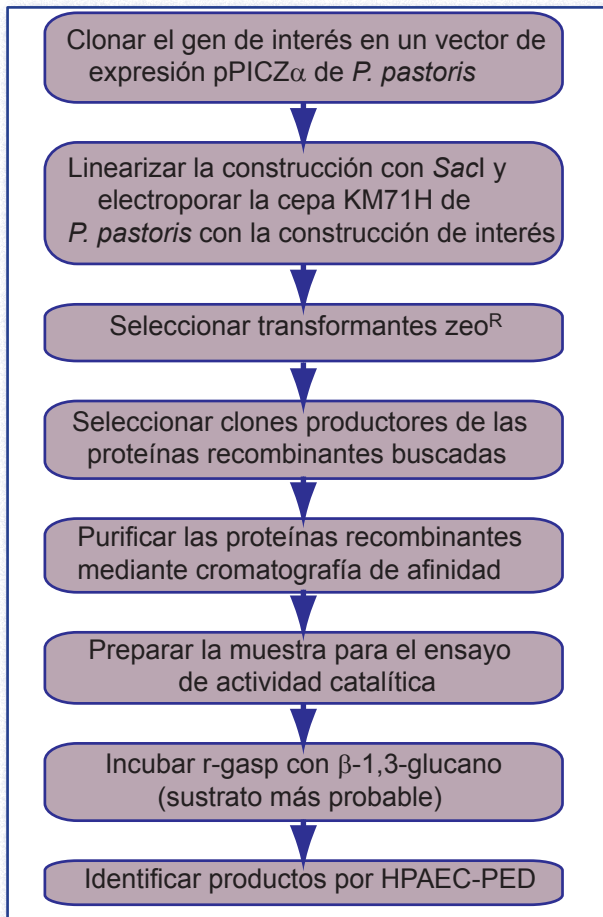


Figura 59. Diseño experimental para la expresión heteróloga y purificación de las proteínas gasp de *S. pombe* y la determinación de su actividad catalítica. Se representa el proceso experimental seguido en este Capítulo.

(VI)- 1.1. *P. pastoris* es una levadura metilotrófica

P. pastoris es una levadura metilotrófica, capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono. El primer paso en el metabolismo del metanol es la oxidación de metanol a formaldehído empleando oxígeno molecular mediante la enzima alcohol oxidasa. Además de formaldehído, esta reacción genera peróxido de hidrógeno. Para evitar la toxicidad de este subproducto, el metabolismo del metanol tiene lugar en una organela especializada llamada peroxisoma. La alcohol oxidasa tiene muy baja afinidad por O_2 , así que *P. pastoris* debe compensar esta limitación produciendo grandes cantidades de enzima. Por esta razón, el promotor que regula la producción de la alcohol oxidasa se emplea para dirigir la expresión heteróloga de proteínas en esta levadura.

(VI)- 1.2. Dos proteínas con actividad alcohol oxidasa

En *P. pastoris*, existen dos genes que codifican la alcohol oxidasa: *AOX1* y *AOX2*. La mayor parte de la actividad alcohol oxidasa en la célula se debe al producto del gen *AOX1*. La expresión de este gen está estrechamente regulada e inducida por metanol hasta tal punto que, cuando las células son incubadas en presencia de metanol, la alcohol oxidasa producida por *AOX1* llega a ser $\geq 30\%$ del total de proteínas solubles de la levadura. Por esta razón, el promotor del gen *AOX1* se emplea para dirigir la expresión del gen de interés que codifica la proteína heteróloga deseada (Ellis *et al.*, 1985; Koutz *et al.*, 1989; Tschopp *et al.*, 1987a).

(VI)- 1.3. Expresión del gen *AOX1*

La expresión de este gen está controlada a nivel de la transcripción. En las células que crecen en metanol, aproximadamente el 5% de los ARNm provienen del gen *AOX1*. La regulación de este gen se realiza en dos pasos: a) existe un mecanismo de represión-desrepresión y b) un mecanismo de inducción, como el gen *GAL1* de *Saccharomyces* (Johnston, 1987). De modo resumido, el crecimiento en glucosa reprime la transcripción, incluso en presencia del inductor (metanol). Por esta razón, se recomienda una etapa previa de crecimiento en glicerol para una inducción óptima con metanol. El crecimiento en glicerol supone condiciones de desrepresión, pero no la inducción propiamente dicha. Así, el metanol es necesario para la obtención de niveles de expresión detectables de *AOX1* (Ellis *et al.*, 1985; Koutz *et al.*, 1989; Tschopp *et al.*, 1987a).

(VI)- 1.4. Expresión de proteínas intracelulares y secretadas

La expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* puede ser tanto de proteínas intracelulares como de proteínas secretadas (extracelulares). La secreción requiere la presencia de una secuencia señal en la proteína expresada para dirigirla hacia la vía secretora. Existen varias secuencias señal de secreción diferentes, pero la que ha dado me-

jores resultados es la del factor α de *S. cerevisiae* (Cregg *et al.*, 1993; Scorer *et al.*, 1993).

La ventaja más importante de expresar las proteínas heterólogas como proteínas de secreción es que *P. pastoris* secreta muy poca cantidad de proteínas propias. Este hecho, combinado con la baja concentración de proteína en el medio mínimo de *P. pastoris*, hace que la proteína heteróloga secretada constituya la mayoría de proteína total del medio extracelular. Esto supone el primer paso en el proceso de purificación de la proteína (Barr *et al.*, 1994).

(VI)- 1.5. Modificaciones post-traduccionales

En comparación con *S. cerevisiae*, *P. pastoris* posee una ventaja en la glicosilación de las proteínas secretadas, porque no las hiperglicosila. Tanto una como otra levaduras realizan N-glicosilación. Sin embargo, mientras que la longitud de los oligosacáridos añadidos por la levadura de gemación es grande (de 50 a 150 residuos de manosa), *P. pastoris* genera cadenas mucho más cortas (una media de 8-14 residuos de manosa por cadena lateral) (Grinna y Tschopp, 1989; Tschopp *et al.*, 1987b). Además, en este último organismo se ha observado muy poca O-glicosilación.

(VI)- 2. Clonación de los genes *gas1+*, *gas2+*, *gas4+* y *gas5+* en el vector *pPICZ α*

El *EasySelect™ Expression Kit (Invitrogen)* proporciona dos vectores para la expresión de proteínas de interés bajo el control del promotor inducible P_{AOX1} . La serie pPICZ se utiliza para la expresión de proteínas intracelulares, mientras que los vectores pPICZ α se emplean para proteínas de secreción, puesto que contienen la secuencia señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae* (Fig. 60). Ambos vectores poseen tras el sitio de clonación múltiple secuencias de epítomos para la detección de las proteínas (*c-myc*) y su purificación (6-His), lo que permite fusionar ambos epítomos al extremo carboxilo de la proteína que se desea expresar.

Para la correcta expresión de los genes objeto de estudio, se tuvieron en cuenta dos cuestiones a la hora de diseñar su clonación. La primera de ellas es que los genes GH72 de *S. pombe* poseen su propia secuencia señal. Si bien se ha constatado que muchas secuencias señales pueden funcionar como tales en *P. pastoris*, hasta el momento la más eficiente ha resultado ser la del factor α de la levadura de gemación. Por ello, se prescindió de las secuencias señal de *S. pombe* y los genes se clonaron eliminando los nucleótidos correspondientes a dicha región, colocando en fase la secuencia nucleotídica del péptido señal del factor α y el dominio GluTD de cada uno de los genes.

La segunda consideración es la presencia de una secuencia hidrofóbica en el extremo carboxilo de *gas1p*, *gas4p* y *gas5p* que es una posible señal para la unión de un grupo GPI, lo que ancla a las proteínas en la membrana o pared celular. Ya que el objetivo era obtener proteínas en el medio de cultivo para facilitar su posterior purificación, parecía necesario eliminar también dicha secuencia hidrofóbica. *A priori* no se puede saber si la presencia de dicha secuencia hidrofóbica o del mismo grupo GPI es importante para la actividad catalítica. Como se demostró en el Capítulo anterior, la proteína truncada *gas4p*- Δ GPI no es funcional y este hecho podría deberse, en parte o completamente, a que no se localizaba correctamente.

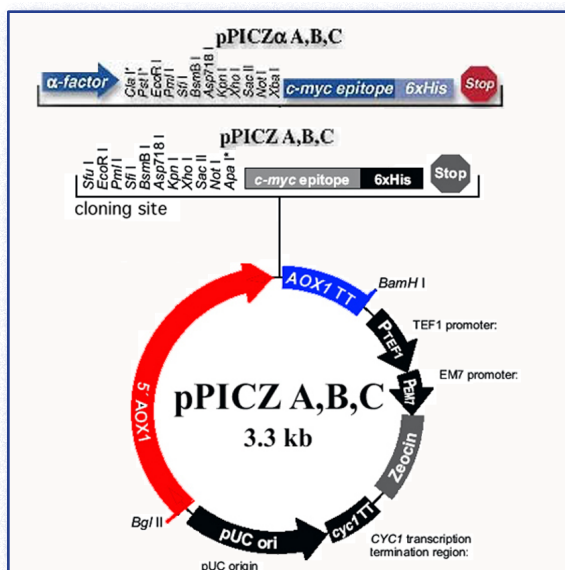


Figura 60. Vectores pPICZ y pPICZ α . Mapa de los vectores disponibles en el *EasySelect™ Expression Kit (Invitrogen)*. Ambos poseen las secuencias necesarias para su recombinación en la región 5'AOX1. El vector pPICZ α contiene, además, la secuencia codificante del péptido señal del factor α . Figura adaptada del manual de usuario.

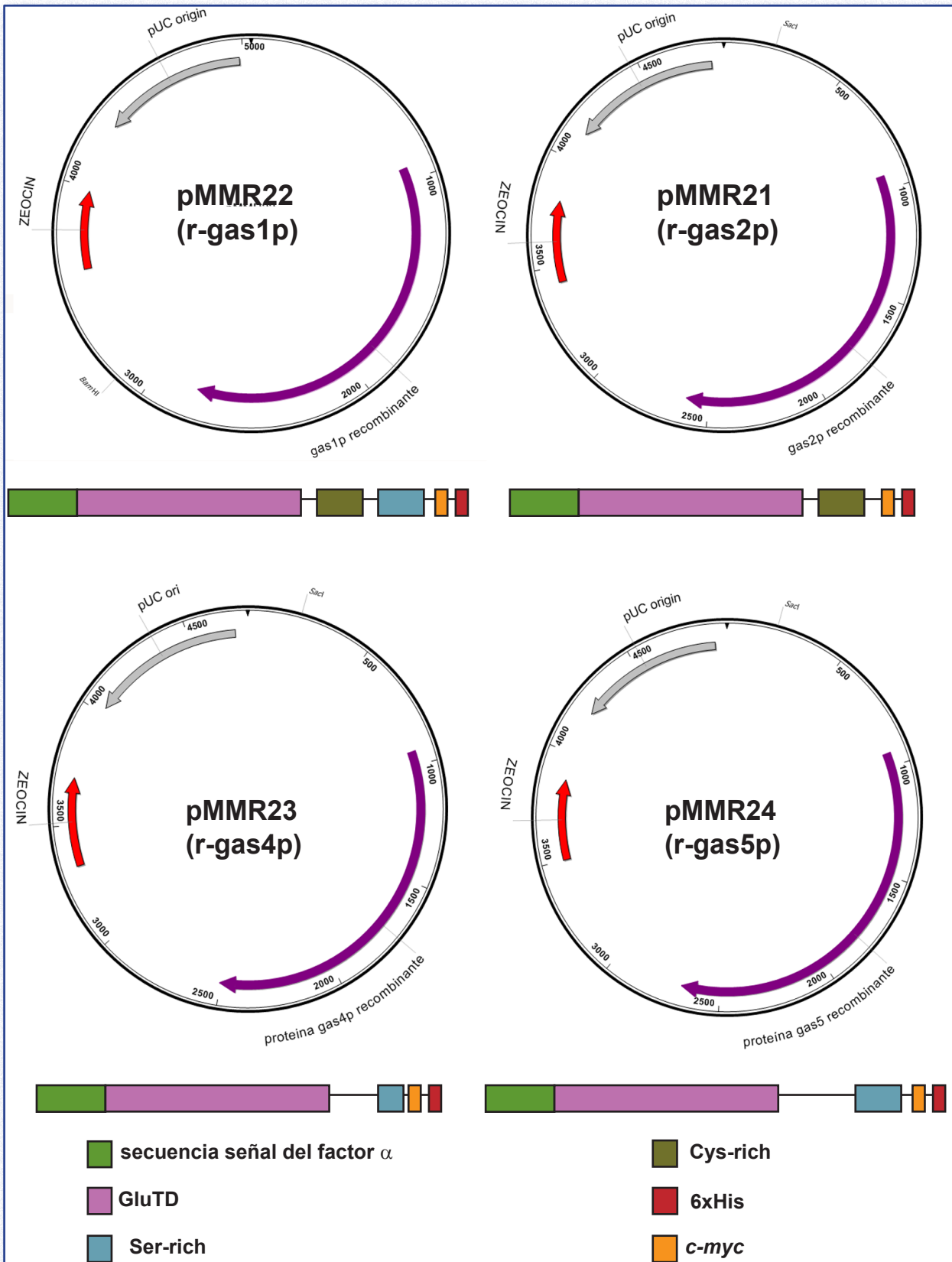


Figura 61. Plásmidos pMMR22, pMMR21, pMMR23 y pMMR24. Representación esquemática de los plásmidos construidos para la expresión de las proteínas recombinantes r-gas2p, r-gas1p, r-gas4p y r-gas5p en *P. pastoris*. Debajo de los mismos se indica de forma esquemática la proteína recombinante que codifican, usando el código de colores descrito en la parte inferior de la Figura.

Los datos de dicho experimento no permitieron llegar a ninguna conclusión acerca del efecto sobre la actividad enzimática. Sin embargo, se ha descrito que una forma de la proteína Gel1p de *A. fumigatus* carente de la señal para GPI posee la misma actividad β -1,3-glucanosil-transferasa que la proteína completa (Mouyna *et al.*, 2000a), por lo cual se decidió expresar las formas truncadas de las proteínas GH72 de *S. pombe*. En el caso de *gas1*⁺, *gas4*⁺ y *gas5*⁺, fueron clonados sin los nucleótidos correspondientes a la secuencia hidrofóbica del extremo carboxilo, y en fase con los epítomos *c-myc* (EQKLISEEDL) y poli-histidina (6xHis). En el caso de *gas2*⁺, se eliminó únicamente el codon de parada de la traducción (Fig. 61). Se utilizó el vector pPICZ α A para todos los casos, excepto para *gas5*⁺, donde, y debido a los sitios de restricción presentes en su región codificante, hubo que emplear la variante pPICZ α B. Los plásmidos resultantes se secuenciaron con los cebadores 911 (anilla en la zona del péptido señal) y 912 (anilla en la 3'AOX1) para comprobar la correcta clonación en fase. Se denominaron pMMR21, pMMR22, pMMR23 y pMMR24 según contuvieran *gas2*⁺, *gas1*⁺, *gas4*⁺ o *gas5*⁺.

Los cuatro plásmidos y los vectores pPICZ α A y pPICZ α B fueron linearizados por digestión con la enzima de restricción *SacI* y con ellos se transformó la cepa KM71 de *P. pastoris* mediante electroporación. Como medio de selección se empleó un medio rico que contenía zeocina (ya que los plásmidos pPICZ α contienen el gen que confiere resistencia a este antibiótico como marcador de selección). Para comprobar la correcta integración de los distintos plásmidos, se realizó una PCR con los oligonucleótidos 911 y 912. En el caso de los vectores, de haber recombinado en el *locus* diana, deberían amplificar una banda de 300 nucleótidos, mientras que en el caso de los plásmidos con las construcciones heterólogas los fragmentos esperados eran de aproximadamente 1.500 pb. Se consiguieron varios clones con cada una de las construcciones de interés (Fig. 62). Dichas estirpes de *P. pastoris* que habían integrado las construcciones heterólogas r-*gas1p*, r-*gas2p*, r-*gas4p* y r-*gas5p* recibieron el nombre de YMMR62, YMMR55, YMMR57 e YMMR58, respectivamente. Los transformantes que habían integrado los vectores pPICZ α A y pPICZ α B, que servirían de controles, se denominaron YMMR53 e YMMR54.

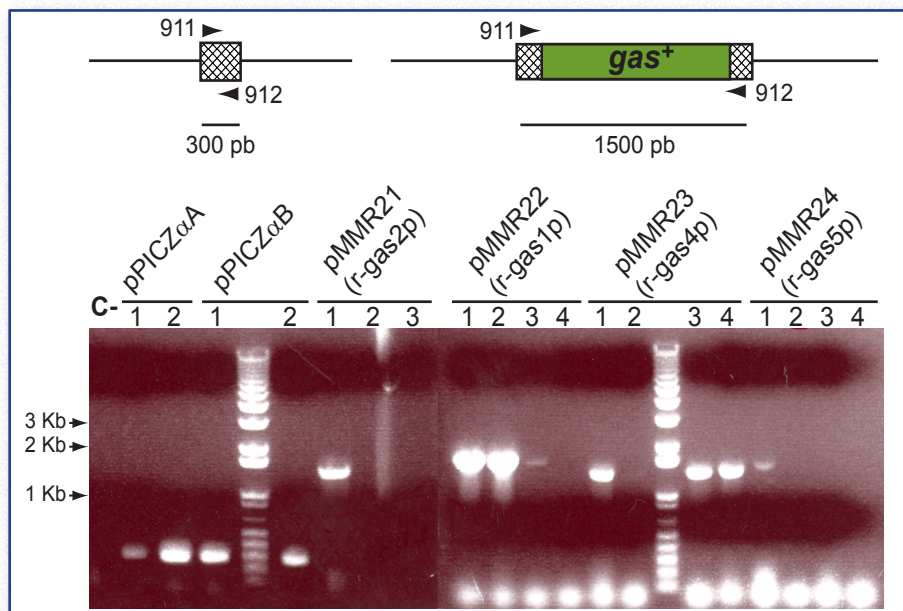


Figura 62. Comprobación de los transformantes de *P. pastoris* mediante PCR. Los transformantes obtenidos a partir de la cepa KM71H de *P. pastoris* con cada uno de los vectores y de los plásmidos fueron analizados por PCR con la pareja de oligonucleótidos 911-912. En los transformantes que habían integrado en su genoma el vector, se produjo la amplificación de una banda de 300 pb, mientras que en los que se habían integrado las construcciones recombinantes se generaron bandas de 1,5 Kb. La cepa original se empleó como control negativo. En la Figura se indica el vector o el plásmido que debería llevar integrado cada transformante.

(VI)- 3. Selección de los clones de *P. pastoris* productores de las proteínas recombinantes *gasp* de *S. pombe*

La integración de las construcciones creadas en el genoma de *P. pastoris* no garantiza por sí misma la expresión de la proteína que codifican. Por tanto, el siguiente paso consistió en la inducción de la producción de las proteínas de interés a pequeña escala en distintos transformantes y su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida seguida bien de tinción con AgNO_3 , bien de un ensayo tipo *Western-blot*.

Con este fin, se tomaron varios clones positivos de cada una de las cepas problema (YMMR55, YMMR62, YMMR57 e YMMR58) y los transformantes control (YMMR53 e YMMR54) y se inocularon en un medio cuya fuente de carbono era el glicerol. A continuación, las células se pasaron a un medio donde la única fuente de carbono presente era metanol al 1% para inducir la expresión de los genes regulados por P_{AOX1} , y en condiciones de agitación vigorosa (250 rpm) y 25°C. Se mantuvieron en estas condiciones durante tres días, añadiendo metanol cada 24 horas para contrarrestar

la evaporación del mismo. Tras este período, se recogieron los cultivos y se recuperaron, mediante centrifugación, los sobrenadantes de cultivo conteniendo las proteínas secretadas por cada una de las estirpes, que se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción con nitrato de plata para visualizar las proteínas presentes en cada uno de los sobrenadantes (Fig. 63). Para poder discernir si los clones problema habían producido las proteínas de interés, se comparó el patrón de bandas de cada muestra con el de las cepas control YMMR53 e YMMR54. Como ya mencionó, en condiciones de inducción, el promotor P_{AOX1} es responsable de la producción

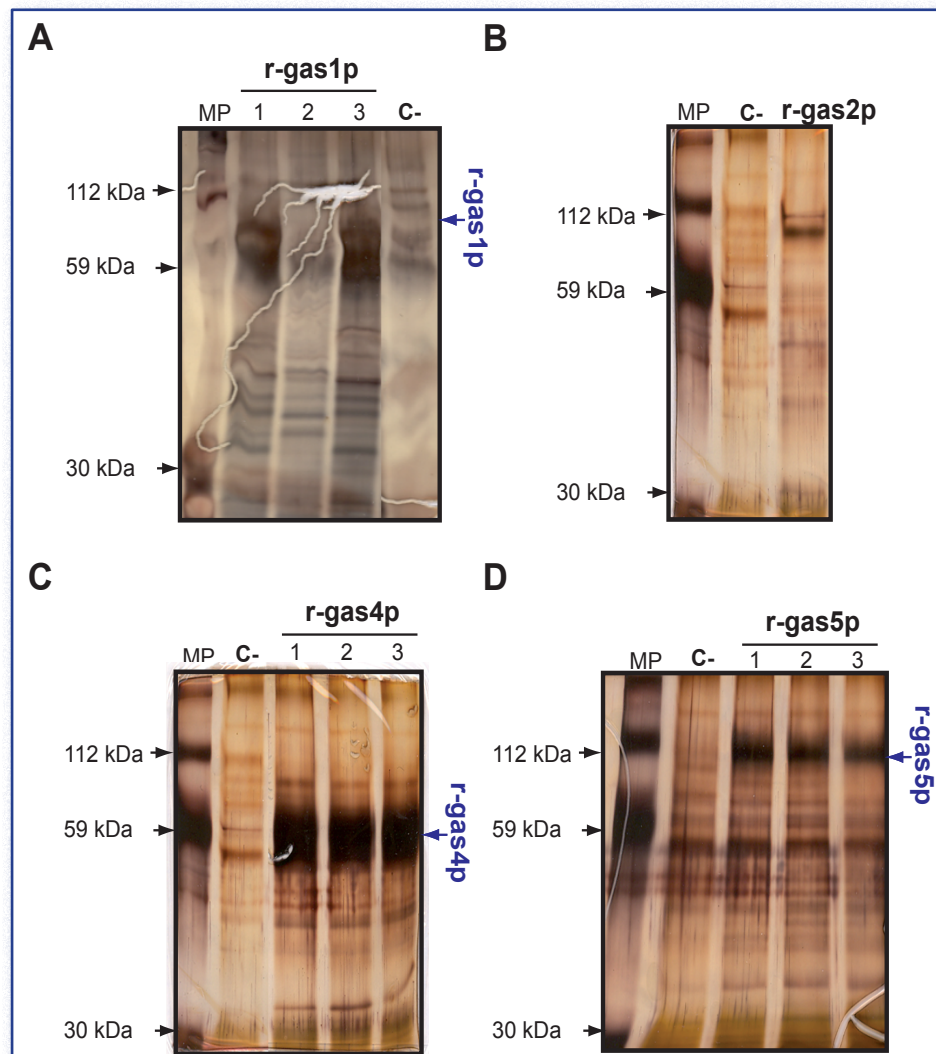


Figura 63. Búsqueda de clones productores de las proteínas recombinantes. Distintos transformantes que habían integrado correctamente cada una de las construcciones fueron incubados en presencia de metanol para inducir la expresión de las proteínas recombinantes durante tres días. A continuación, se recuperaron los sobrenadantes de cultivo por centrifugación y se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, que posteriormente se tiñó con nitrato de plata para visualizar las proteínas de cada muestra. Los caldos de cultivo de la cepa KM71H que había integrado el vector vacío fueron empleados como control negativo (C-). (A) La proteína *r-gas1p* se acumula en los sobrenadantes de cultivo de la cepa YMMR62. (B) No se detecta proteína recombinante *r-gas2p* en el medio de cultivo de la cepa YMMR55. (C) Los caldos de cultivo de la cepa YMMR57 son ricos en *r-gas4p*. (D) *r-gas5p* está presente en el medio de cultivo de la cepa YMMR58.

del 30% del contenido total de proteína de la célula. Por tanto, en el caso de que se estuvieran produciendo las proteínas recombinantes, éstas deberían aparecer como bandas de gran intensidad que deberían estar ausentes en los carriles correspondientes a los controles negativos. De esta manera, se constató la existencia de clones productores de r-gas1p, r-gas4p, y r-gas5p (Fig. 63A, C y D). Sin embargo, no se detectó ninguna banda específica en los clones de YMMR55 analizados que hiciera pensar que r-gas2p se estuviera produciendo (Fig. 63B).

Por otra parte, el tamaño de las bandas de las proteínas recombinantes no coincidía exactamente con el predicho teóricamente a partir de la secuencia de proteínas de gas1p, gas4p o gas5p. No se debe olvidar que las proteínas expresadas en *P. pastoris* difieren de las proteínas silvestres ya que carecen del anclaje GPI, lo cual podría explicar un tamaño experimental menor que el teórico. Sin embargo, lo que se observaba eran proteínas de mayor tamaño al anotado en las bases de datos (de 58,1, 50,7 y 53,6 kDa para gas1p, gas4p y gas5p, respectivamente). Las proteínas GH72 de *S. pombe* contienen varios sitios posibles de N-glicosilación, que podrían ser glicosilados durante la secreción en la levadura metilotrófica empleada. Por tanto, a pesar de que las bandas detectadas en el primer ensayo tenían una movilidad electroforética menor a la esperada según los datos teóricos, era muy posible que dichas bandas se correspondieran con las construcciones de interés. Como todas las construcciones llevaban en su extremo carboxilo el epítipo *c-myc* y una cola de seis histidinas, la identidad de las proteínas se comprobó mediante un ensayo *Western-blot* en el cual se empleó un anticuerpo anti-*myc* (Fig. 64). De esta manera, se confirmó que las bandas mayoritarias detectadas en la tinción con AgNO_3 sí eran realmente las proteínas recombinantes deseadas. Este ensayo también mostró otro dato importante: el tamaño aparente de r-gas5p era muy superior al tamaño de r-gas1p, a pesar de tener un número similar de aminoácidos (r-gas1p consta de 614 aminoácidos y r-gas5p de 578). Esto parece sugerir que el grado de glicosilación de r-gas5p es también mayor que en el caso de r-gas1p.

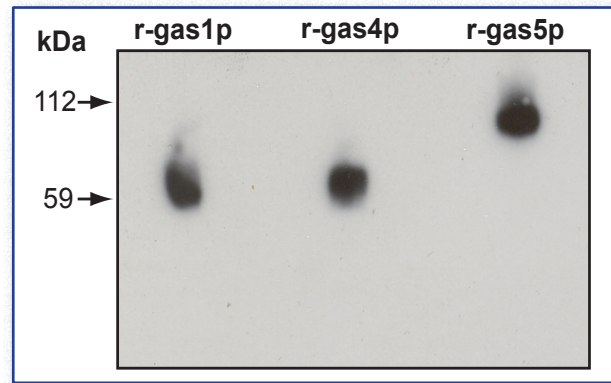


Figura 64. Ensayo *Western-blot* para confirmar la identidad de las proteínas r-gas1p, r-gas4p y r-gas5p. Los sobrenadantes de cultivo de las cepas YMMR62, YMMR57 e YMMR58 fueron analizados en un ensayo *Western-blot*, con un anticuerpo anti-*myc*. En los tres casos se detectó la presencia de una proteína del mismo tamaño que la proteína mayoritaria presente en los sobrenadantes visualizada mediante tinción con nitrato de plata.

(VI)- 4. Purificación de r-gas1p, r-gas4p y r-gas5p

Puesto que las cepas YMMR61, YMMR57 e YMMR58 producían las proteínas recombinantes r-gas1p, r-gas4p y r-gas5p cuando se cultivaban en un medio donde la fuente de carbono era el metanol, se procedió a purificar dichas proteínas a partir de los sobrenadantes de cultivo para realizar los ensayos de actividad catalítica. A pesar del escaso número de proteínas propias de la levadura metilotrófica que son secretadas al medio de cultivo, el proceso de purificación era necesario ya que las actividades endógenas 1,3- β -glucanasa y 1,3/1,6- β -glucanosil-transferasa (Goldman *et al.*, 1995; Mouyna *et al.*, 1998) son siempre secretadas en el medio de cultivo por la levadura *P. pastoris*. Dichas proteínas serían capaces de actuar sobre los mismos sustratos que las proteínas gasp de *S. pombe*, interfiriendo con los resultados de los ensayos para determinar la actividad catalítica. Para ello, se aprovechó la presencia de la cola de seis histidinas (6xHis) para purificar las proteínas de interés.

Los sobrenadantes de cultivo de los distintos clones de *P. pastoris* fueron concentrados en primer lugar mediante ultrafiltración y dializados frente a tampón de unión, para ajustar las muestras a las condiciones necesarias para la purificación. Seguidamente, se realizó una cromatografía de afinidad en columna empleando la resina *Ni-NTA*

His-Bind[®] Resin, que contiene cationes Ni²⁺ que reaccionan con las colas de 6xHis de las proteínas recombinantes en condiciones de baja fuerza iónica, lo que permite su retención en la columna. Las

muestras se lavaron dos veces con el tampón de lavado (con baja concentración de imidazol) para eliminar las proteínas retenidas inespecíficamente por los cationes Ni²⁺. Por último, las proteínas de interés fueron eluidas con tampón de elución (con alto contenido en imidazol), que desplaza las colas de histidinas de las uniones a los cationes de níquel. Las fracciones eluidas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con AgNO₃ para comprobar el grado de purificación de las tres proteínas recombinantes (*r-gas1p*, *r-gas4p* y *r-gas5p*) (Fig. 65). A pesar de que en los tres casos las proteínas no estaban completamente puras, se había conseguido una purificación sustancial, ya que las proteínas de interés eran más abundantes y estaban menos contaminadas en las fracciones 2 y 3 que en el material de partida, lo que permitía su empleo para los ensayos de actividad enzimática. Una vez purificadas, las muestras fueron dializadas de nuevo frente a tampón acético-acetato para eliminar el imidazol presente en el tampón de elución.

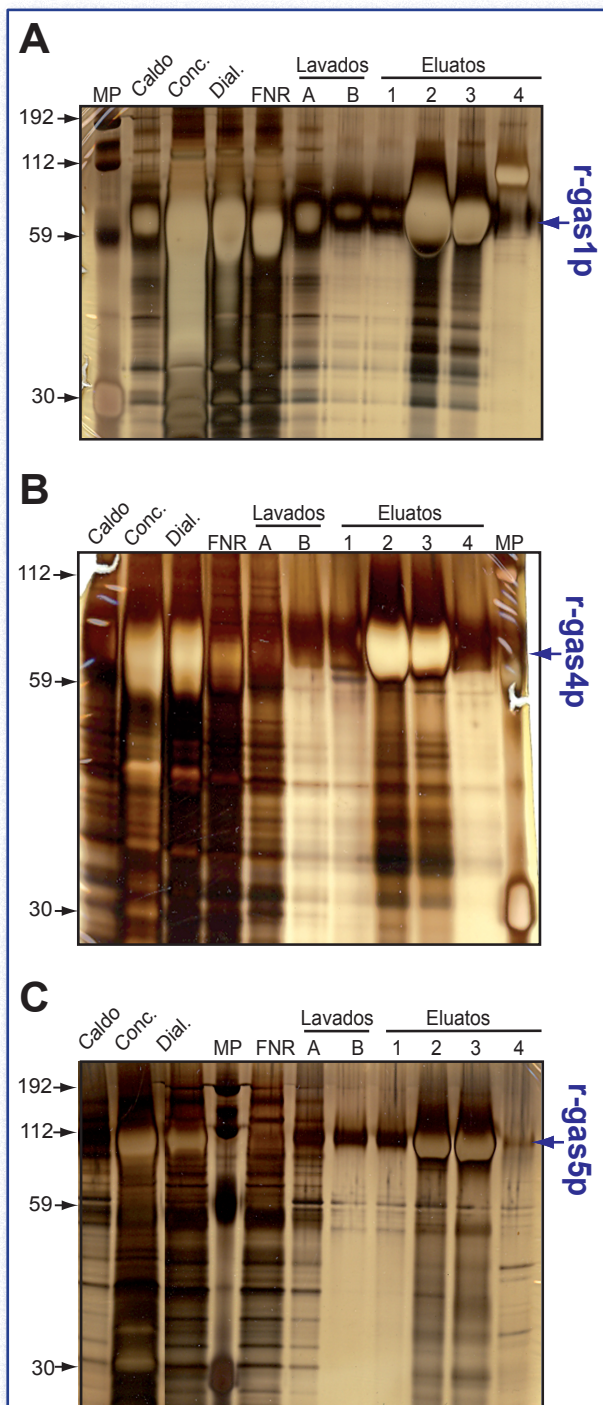


Figura 65. Análisis del proceso de purificación de las proteínas recombinantes mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y tinción con AgNO₃. Durante el proceso de purificación, se separaron alícuotas de 5 µl en cada una de las etapas: sobrenadantes de cultivo (Caldo), sobrenadantes concentrados (Conc.), muestra dializada (Dial.), fracción no retenida (FNR), lavados A y B, y eluciones 1, 2, 3 y 4. Las proteínas presentes en cada una de esas alícuotas fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y visualizadas mediante tinción con AgNO₃. Purificación de *r-gas1p* (A), *r-gas4p* (B) y *r-gas5p* (C).

(VI)- 5. Obtención de un clon productor de *r-gas2p*

El hecho de no haber encontrado ningún clon que expresara *r-gas2p* entre los transformantes YMMR55 que habían integrado el plásmido pMMR21, obligó a repasar los pasos de la clonación de *gas2+* y a comprobar los transformantes. En primer lugar, podría haberse producido algún error en el proceso de clonación de la región codificante que alterara la fase de lectura en el gen clonado. En este caso, el plásmido linearizado se integraría correctamente en el genoma de la cepa receptora, generando las bandas esperadas en la comprobación mediante PCR, pero no se sintetizaría la proteína de interés. Por ello, el plásmido pMMR21 fue secuenciado con los oligos 912 y 1284, anillando este último en la zona 5' de *AOX1* y permitiendo secuenciar la unión entre el vector y la región codificante de *gas2+*. Igual que la vez anterior, el resultado de la secuenciación mostró que la construcción era la correcta según el diseño proyectado.

Otra posibilidad para explicar la ausencia de la proteína en el sobrenadante de cultivo podía ser que el extremo carboxilo de la proteína estuviera implicado en su unión a la membrana o la pared celular, a pesar de carecer de la región hidrofóbica consenso descrita para la unión del grupo GPI, como se apuntó en el Capítulo III. De hecho, la fusión de la región codificante de la GFP tras el último codón de *gas2*⁺ resulta en una proteína que se localiza en la periferia celular (como se describió en el Capítulo IV), lo que podría indicar que la región carboxilo de *gas2p* está implicada en la retención de alguna manera de dicha proteína en la membrana o pared celular, mediante un mecanismo distinto del anclaje GPI. Un ejemplo de esta posibilidad es la β -1,3-endoglucanasa *eng1p*, necesaria para la degradación del septo primario durante la separación celular. La proteína se localiza en la región del septo a pesar de no poseer dominios transmembranales que la anclan a la membrana plasmática, ni grupo GPI que la unan a los componentes del septo (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005). Sin embargo, *eng1p* posee en la región carboxilo un dominio de unión a carbohidratos que es necesario para retener esta enzima en la zona del septo, puesto que, en ausencia del extremo carboxilo, *eng1p* se deslocaliza por las paredes laterales (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008a).

Por esa razón, se planteó la posibilidad de que la región carboxilo de *gas2p*, presente en la proteína recombinante, estuviese anclándola a la pared celular, y por esa razón no se detectara en el medio de cultivo. Para comprobar esta posibilidad, se rompieron células de la cepa YMMR55 que habían sido cultivadas en presencia de metanol al 1% y se analizaron los extractos celulares mediante un ensayo *Western-blot*. Sin embargo, los resultados indicaron que esta hipótesis no era correcta, ya que no se detectó ninguna proteína en los extractos celulares. Podría ser que la proteína recombinante diseñada no se estuviera expresando por alguna razón o que quedara retenida fuertemente en las paredes celulares de *P. pastoris* y no llegara a solubilizarse. En cualquier caso, se hacía necesario realizar una nueva construcción para tratar de purificar *gas2p*.

(VI)- 5.1. Diseño de una nueva construcción para r-*gas2p*

Dado que en el caso de las proteínas r-*gas1p*, r-*gas4p* y r-*gas5p* se había conseguido la expresión eliminando la región carboxilo de las mismas, se decidió intentar una nueva construcción en la se prescindía de los últimos aminoácidos de *gas2p*. Teniendo en cuenta que *gas4p* posee una región rica en cisteínas incompleta y que carece de la región *Ser-rich*, se pensó que la eliminación de los últimos aminoácidos de *gas2p* quizás no resultara en la pérdida de actividad catalítica. Por ello, se diseñó una nueva construcción en la cual la proteína r-*gas2p* contenía los aminoácidos Y20-S450, esto es, carecería de los últimos 9 residuos (Fig. 66A). Así, se amplificó la secuencia nucleotídica correspondiente con los oligonucleótidos 1257 y 1386 y el fragmento resultante se clonó entre los sitios *EcoRI* y *XbaI* del vector pPICZ α A, obteniéndose el plásmido pMMR34. Dicho plásmido fue linealizado y con él se transformó la cepa KM71H de *P. pastoris*. Los transformantes obtenidos, denominados YMMR110, se comprobaron mediante PCR (Fig. 66B), confirmándose la correcta integración de la construcción.

A continuación, se procedió a comprobar si la cepa YMMR110 producía y secretaba la proteína recombinante r-*gas2p*' al medio de cultivo, induciendo la expresión en medio con metanol al 1% y analizando las proteínas presentes en el sobrenadante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de tinción con AgNO₃. Los resultados obtenidos indicaron que en el carril correspondiente al sobrenadante de los transformantes YMMR110 aparecía una banda de proteína mayoritaria que no estaba presente en la cepa control (YMMR53) (Fig. 66C). Para confirmar que esta proteína era realmente r-*gas2p*', se realizó un ensayo *Western-blot* utilizando anticuerpos anti-*myc* (Fig. 66D), poniéndose de manifiesto la presencia de la proteína recombinante buscada en los caldos de cultivo de YMMR110.

(VI)- 6. Purificación de la proteína *r-gas2p'*

Puesto que la cepa YMMR110 producía y secretaba *r-gas2p'* al medio de cultivo, se procedió a su purificación de la misma manera descrita para *r-gas1p*, *r-gas4p* y *r-gas5p*, ya que también portaba la cola de seis histidinas en el extremo carboxilo. Es decir, el sobrenadante de cultivo se concentró y se dializó, se cargó en una columna con la resina *Ni-NTA*. Tras lavar las proteínas retenidas inespecíficamente, *r-gas2p'* se eluyó de

la columna en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Al analizar las proteínas presentes en cada una de las fracciones (no retenida, lavados y eluatos) mediante electroforesis en gel, se encontró que *r-gas2p'*, a diferencia de las otras tres proteínas recombinantes, no se unía a la resina en las condiciones utilizadas, sino que mayoritariamente aparecía en la fracción no retenida (Fig. 67). Para intentar resolver este problema, se utilizaron tampones de unión y de lavado carentes de imidazol;

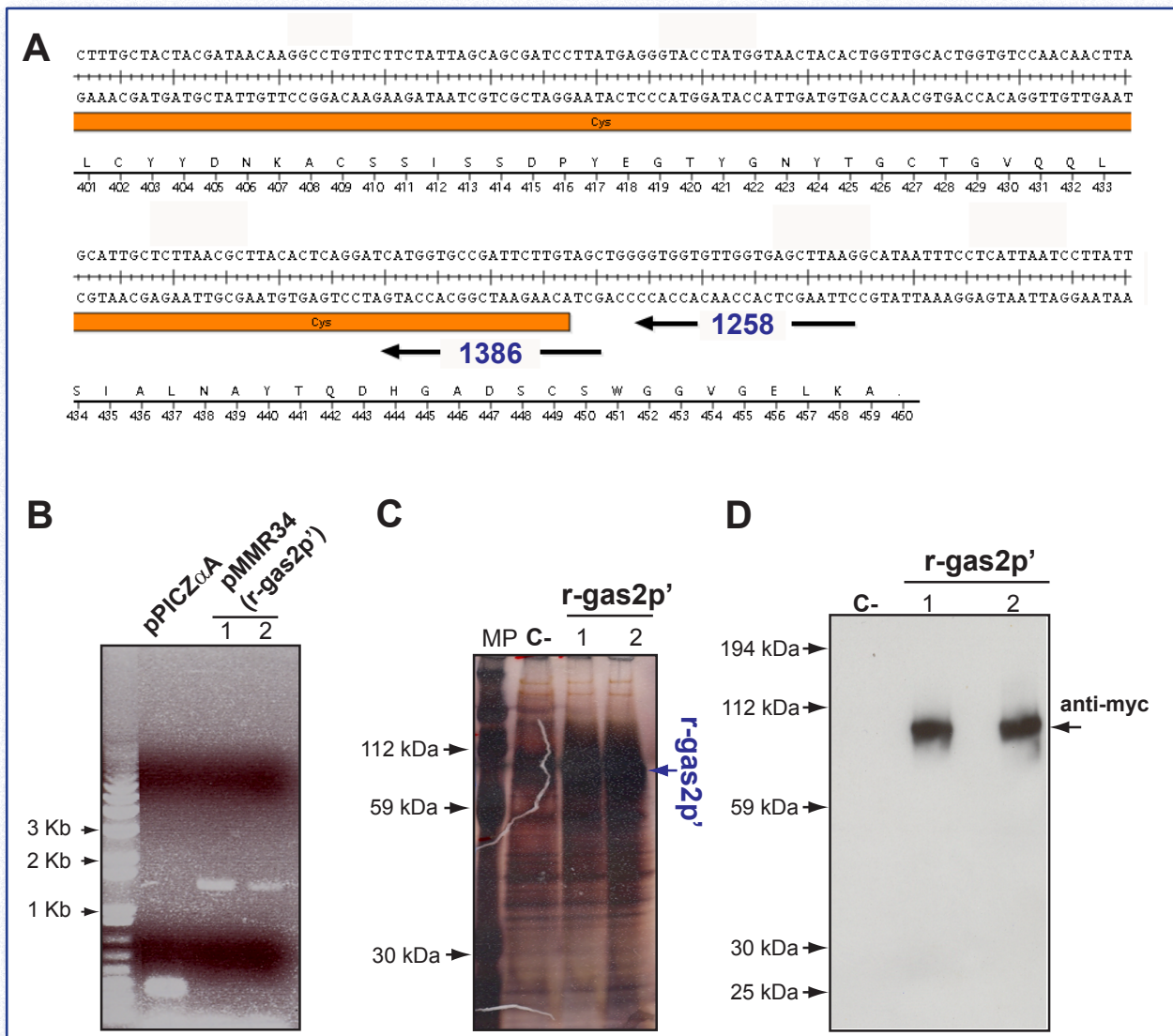


Figura 66. La cepa YMMR110 expresa una forma recombinante de *gas2p*. (A) Posición de los oligonucleótidos de la región 3' empleados para la construcción de *r-gas2p* y *r-gas2p'*. Para la construcción *r-gas2p* en pPICZαA se empleó la pareja de cebadores 1257-1258, mientras que para la construcción *r-gas2p'*, se utilizaron 1257-1386. Se muestra la región de *gas2p'* en la que hibridan los oligonucleótidos 1258 y 1386. (B) Comprobación por PCR de la integración de pMMR34 (*r-gas2p'*) en el genoma de YMMR110. Se emplearon los cebadores 911-912 y se observó la amplificación de una banda de aproximadamente 1,5 Kb indicativa de que la integración del plásmido linealizado había sido correcta. (C) La cepa YMMR110 secretaba *r-gas2p'* al medio de cultivo. Los sobrenadantes de cultivo de la cepa YMMR110 que había sido incubada en presencia de metanol se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción con nitrato de plata. Se observó la presencia de una banda que se hallaba ausente en los caldos de cultivo de la cepa control. (D) Los caldos de cultivo fueron analizados mediante *Western-blot* empleando un anticuerpo anti-*myc* para verificar que la proteína purificada era *r-gas2p'*.

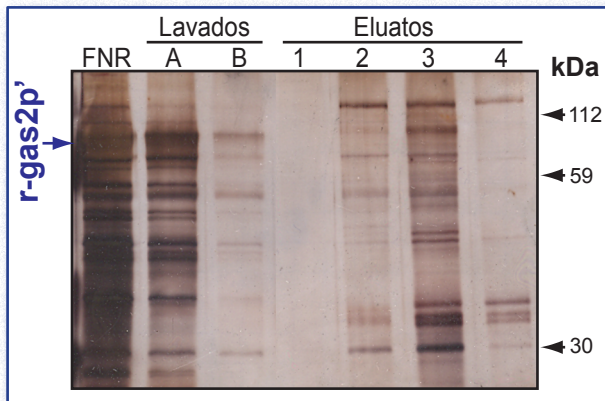


Figura 67. r-gas2p' no presenta afinidad por la resina Ni-NTA en su estado nativo. Los caldos de cultivo fueron concentrados, dializados frente al tampón de unión e incubados con la resina Ni-NTA. Posteriormente, la mezcla fue sometida a cromatografía y se recogieron las fracciones no retenida (FNR), las correspondientes a los lavados A y B, y las correspondientes a las eluciones 1, 2, 3 y 4. La mayor parte de la proteína de interés aparece en las fracciones no retenida y lavado A.

se pretendía así favorecer la interacción del motivo 6xHis con los cationes de Ni^{2+} de la resina, evitando la competencia del imidazol, aunque esto supusiera una mayor contaminación con proteínas inespecíficas. Sin embargo, este intento resultó infructuoso y r-gas2p' era también incapaz de unirse a la resina en estas condiciones (datos no mostrados).

Una posible razón para que r-gas2p' no se uniera a la resina Ni-NTA podía ser que la cola de 6xHis (que normalmente debía interactuar con los cationes Ni^{2+}) no estuviera expuesta en la superficie del polipéptido, quizás debido al plegamiento de la proteína recombinante. En los casos en los que el epítipo 6xHis no muestre afinidad por la fase inmóvil de la cromatografía de afinidad, es posible tratar de purificar las proteínas en condiciones no nativas o desnaturizantes. En estas condiciones, las proteínas pierden su plegamiento original y los motivos que en condiciones nativas están escondidos en el núcleo de las proteínas quedan expuestos hacia el exterior. Por ello, los sobrenadantes de cultivo que contenían r-gas2p' fueron dializados frente a un tampón de unión que contenía urea 8 M, a pH 8. Esta concentración de urea es, por sí sola, suficiente para lograr la desnaturización de las proteínas. Una vez que se había preparado la muestra, se incubó con la resina Ni-NTA y la mezcla se cargó en la columna cromatográfica. Se dejó fluir la fracción no retenida

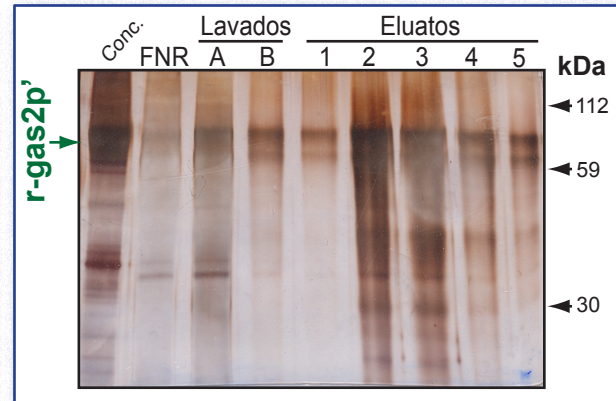


Figura 68. La resina Ni-NTA retiene r-gas2p' en condiciones desnaturizantes. Los caldos de cultivo de YMMR110 fueron concentrados, dializados frente a un tampón que contenía urea 8 M e incubados con la resina Ni-NTA. Posteriormente, la mezcla fue cargada en una columna cromatográfica y se recogió la fracción no retenida (FNR), los lavados A y B y las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5. La mayor parte de r-gas2p' aparece en los eluatos 2 y 3.

da y la columna se lavó dos veces con un tampón de elución, cuatro veces con una primera solución de elución y, finalmente, una vez con una segunda solución de elución. Estas dos soluciones también contenían urea 8 M, pero el pH de las mismas era cada vez más ácido (desde 8 en el tampón de unión a 4,5 en el tampón 2 de elución) con el fin de debilitar la interacción 6xHis- Ni^{2+} . Cada una de las fracciones recogidas fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de tinción con nitrato de plata. Se pudo comprobar que en condiciones desnaturizantes, r-gas2p' quedaba retenida en la columna y eluía principalmente en las fracciones 2 y 3 del primer tampón de elución (Fig. 68).

(VI)- 6.1. Renaturalización de r-gas2p'

Para poder estudiar la actividad catalítica de un enzima, es necesario que se encuentre en la forma nativa. Por tanto, era necesario volver a renaturalizar la proteína r-gas2p' tras su elución de la columna y comprobar si tras este proceso la proteína recombinante recobraba su plegamiento original y poseía actividad enzimática. La renaturalización de proteínas está basada en un estudio llevado a cabo por Rudolph y Lilie (1996). Según estos autores, la renaturalización puede conseguirse bien haciendo una dilución de la muestra en un tampón renaturalizante o bien, mediante diálisis frente al mismo tampón. La elección del tampón debe ha-

cerse en función del pH. Es necesario elegir un pH alejado del pI de la proteína que se pretende renaturalizar para evitar su precipitación. Además, en el caso de proteínas que puedan tener puentes disulfuro en su conformación nativa, el pH del tampón debe ser alcalino para favorecer la formación de este tipo de enlaces. Por último, es necesario tener en cuenta que la presencia de determinados aditivos, como el EDTA o el par glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GS-SG), facilita aún más el plegamiento o el establecimiento de puentes disulfuro (el glutatión).

Ya que la proteína gas2p podría contener puentes disulfuro entre las distintas Cys, se intentó la renaturalización de la proteína recombinante r-gas2p' mediante diálisis frente a una solución renaturalizante (TrisHCl 0,4 M pH 8, EDTA 5 mM, GSH 5 mM y GS-SG 1 mM) durante 26 horas. Tras este tiempo, se recuperó la muestra y se sometió a una nueva diálisis para dejarla en una solución de acético-acetato 50 mM, pH 5.

(VI)- 6.2. Comprobación de la actividad enzimática de r-gas2p'

Antes de realizar el ensayo para estudiar la posible actividad glucanosil-transferasa de r-gas2p (dada su similitud con otros miembros de la familia GH72), se decidió hacer una prueba enzimática más sencilla que permitiese confirmar si la proteína se había renaturalizado correctamente. Esta prueba se basa en observaciones realizadas por la Dra. Laura Popolo (comunicación personal), quien ha trabajado en profundidad con las proteínas de la familia GH72 presentes en la levadura de gemación. Según dichas observaciones, ScGas1p y sus ortólogos presentan actividad β -1,3-glucanosil-transferasa, esto es, transfieren fragmentos de β -1,3-oligosacáridos entre cadenas de β -1,3-glucano, manteniéndose constante el número de extremos reductores de los azúcares libres. Sin embargo, cuando las cadenas de glucano que actúan como aceptoras en esta reacción escasean, las enzimas son capaces de actuar como hidrolasas, cortando un β -1,3-oligosacárido de la cadena donadora y, al no poder transferirlo sobre la molécula receptora, liberándolo al medio de reacción.

La implicación práctica de este fenómeno es que el número de extremos reductores libres no se mantiene constante, sino que aumenta. Así, este hecho puede aprovecharse para comprobar de forma rápida si la forma recombinante de una proteína (perteneciente a la familia GH72) posee o no actividad enzimática y, por tanto, si se encuentra en su estado nativo.

Para realizar esta comprobación, se prepararon varias reacciones en las que se incubó la misma cantidad de laminarina reducida (4 mg/mL) con muestras de los distintos pasos de purificación. Así, se utilizó un alícuota de los sobrenadantes de cultivo antes de la desnaturalización, de r-gas2p' desnaturalizada después de la purificación y de r-gas2p' tras su renaturalización. Como control del experimento se utilizó la proteína r-gas1p, que se había purificado en condiciones nativas y debería haber conservado la actividad enzimática. Las distintas mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 48 horas antes de determinar la cantidad de azúcares con extremos reductores liberados en cada caso usando PAHBA (ver Materiales y Métodos). Los valores de densidad óptica a 415 nm obtenidos para el control positivo (r-gas1p) y la muestra de caldos de cultivo fueron cuatro veces superiores a los del control negativo. Sin embargo, las muestras con r-gas2p' desnaturalizada y con r-gas2p' tras el intento de renaturalización presentaban valores muy similares a los del control negativo, que contenía laminarina únicamente. Este resultado indicó que el proceso de renaturalización utilizado no había sido adecuado para devolver a la proteína a su conformación original, por lo que era necesario diseñar otro procedimiento distinto para purificar gas2p.

(VI)- 7. Diseño de dos nuevas formas recombinantes de gas2p

Los experimentos anteriores pusieron de manifiesto que era posible conseguir la expresión de gas2p eliminando los últimos 9 aminoácidos de la región codificante, aunque la adición del epítipo 6xHis en esta zona no permitía su purificación en condiciones nativas. Por ello, se decidió diseñar

dos variantes de la misma en un último intento de purificar la proteína *gas2p* para analizar su actividad enzimática. Las dos nuevas construcciones contendrían la región codificante correspondiente a Y20-S450, igual que *r-gas2p'*, pero introducirían también nuevas características en el epítipo 6xHis un intento de favorecer la purificación de la proteína recombinante.

(VI)- 7.1. Construcciones *r-6xHis-gas2p* y *r-gas2p-ES-6xHisp*

En la primera variante, se decidió colocar una cola adicional de seis histidinas en el extremo amino de la proteína recombinante madura, esto es: la secuencia nucleotídica que codifica las seis histidinas debía estar entre la región codificante del péptido señal del factor α y la región codificante correspondiente a *gas2p*. Con esta finalidad, se amplificó *gas2+* con los cebadores 1395 (portador de la información para introducir las 6 histidinas) y 1386, y se clonó entre los sitios *EcoRI* y *XbaI* del vector pPICZ α A. Dicha construcción se denominó "*r-6xHis-gas2p*" (por llevar la construcción con las 6 histidinas adicionales en el extremo amino-terminal) y el plásmido resultante de su clonación,

una vez confirmado mediante su secuenciación, pMMR35 (Fig. 69A).

En la segunda variante, se decidió introducir un espaciador entre la última serina de *gas2p* (S450) y el primer aminoácido del epítipo *c-myc*. Dicho espaciador estaría formado por aminoácidos de pequeño volumen (Ala) y que posibilitaran la introducción de giros en la cadena polipeptídica (Gly) con el objetivo de que la región 6xHis quedara expuesta al exterior. Por ello, se eligió la secuencia Ala-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Ala y se amplificó la región codificante de *gas2+* con los oligonucleótidos 1257 y 1396 (que introducía la secuencia de la región espaciadora) y se clonó entre los sitios *EcoRI* y *XbaI* del vector pPICZ α A. El plásmido resultante fue confirmado mediante secuenciación y se denominó pMMR36. Esta nueva construcción recibió en nombre de "*r-gas2-ES-6xHisp*", por llevar la secuencia espaciadora de aminoácidos en el extremo carboxilo de *r-gas2p* (Fig. 69B).

Ambos plásmidos pMMR35 y pMMR36 fueron linearizados y con ellos se transformó el fondo genético KM71H de *P. pastoris*. Los transformantes obtenidos fueron confirmados por PCR con los oligonucleótidos 911 y 912 (tamaño esperado de

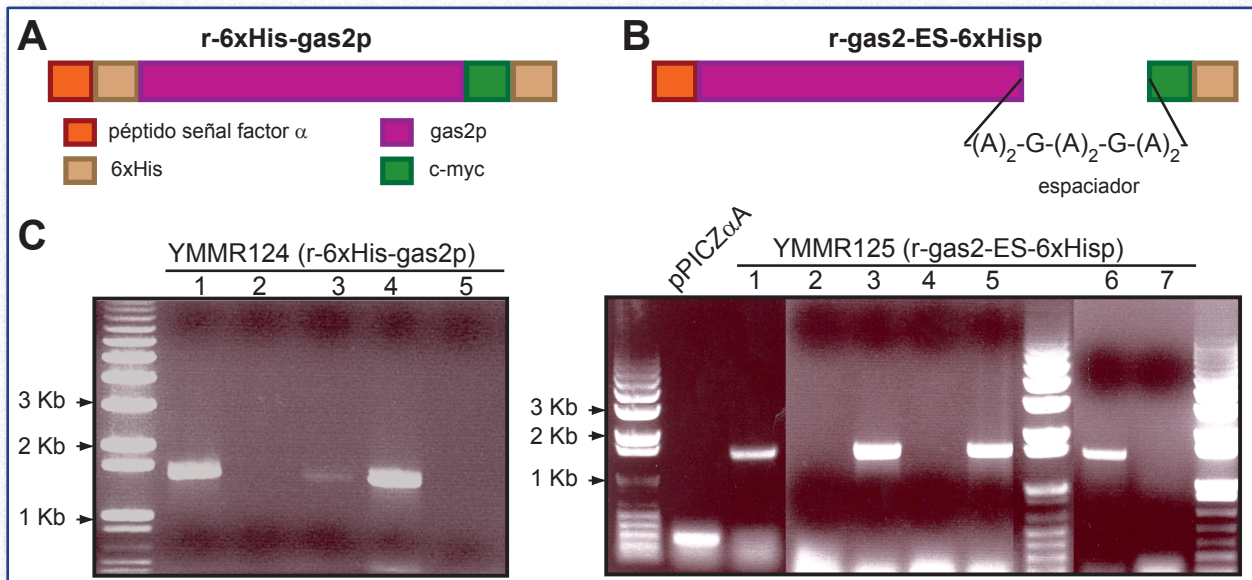


Figura 69. Nuevas formas recombinantes de *gas2p*. (A) Construcción *r-6xHis-gas2p*. Representación esquemática de la estructura modular de una variante de *r-gas2p* en la que se ha colocado un motivo extra de 6xHis entre el péptido señal del factor α y el dominio GluTD de *gas2p*. Se clonó en pMMR35. (B) Construcción *r-gas2-ES-6xHisp*. Representación de la estructura modular de una variante de *r-gas2p* en la que se introdujo una secuencia de ocho aminoácidos que actuaran como separador entre los motivos correspondientes a *gas2p* y la cola de histidinas. Dicha secuencia era $(Ala)_2-Gly-(Ala)_2-Gly-(Ala)_2$. Se clonó en pMMR36. La clave de colores es la misma que en (A). (C) Las cepas YMMR124 e YMMR125 contienen las construcciones correspondientes a *r-6xHis-gas2p* y *r-gas2-ES-6xHisp*, respectivamente. pMMR35 y pMMR36 fueron linearizados y se emplearon para transformar la cepa KM71H. Los transformantes así obtenidos fueron comprobados mediante PCR. La aparición de una banda de 1,5 Kb indicó que habían integrado las construcciones de interés y se denominaron YMMR124 e YMMR125, respectivamente.

banda: 1.500 pb) (Fig. 69C). Así, se obtuvieron las cepas YMMR124 (construcción r-6xHis-gas2p) e YMMR125 (construcción r-gas2-ES-6xHis).

(VI)- 7.2. Selección de clones productores de r-6xHis-gas2p y r-gas2-ES-6xHis

Como en los casos anteriores, en primer lugar se procedió a comprobar si las cepas obtenidas expresaban y secretaban las proteínas recombinantes al medio de cultivo. Para ello, distintos clones de las cepas YMMR124 e YMMR125 y la cepa YMMR53 (control negativo) fueron incubados en un medio donde la única fuente de carbono era metanol durante tres días con agitación vigorosa. Posteriormente, se analizó la presencia de las proteínas recombinantes mediante un ensayo *Western-blot* con anticuerpos anti-*myc*. Como se observa en la Figura 70, las dos nuevas versiones producían la proteína recombinante, ya que en todos los casos se detectaba una única banda en cada carril. Además, este ensayo también permitió comprobar que ambas formas recombinantes no se expresaban al mismo nivel, siendo la primera de ellas más abundante en los caldos de cultivo que la segunda. Como la versión que llevaba un epítipo adicional de 6xHis en el extremo amino se acumulaba en mayor cuantía, se decidió utilizar la cepa YMMR124 para inducir su síntesis y posterior purificación.

(VI)- 7.3. Purificación de r-6xHis-gas2p

Llegados a este punto, quedaba por comprobar si esta nueva versión de r-gas2p quedaba retenida en la resina en condiciones nativas para proceder a su purificación. Por ello, los sobrenadantes de cultivo de la cepa YMMR124, que contenían r-6xHis-gas2p fueron concentrados y se dializaron frente al tampón de unión a la resina *Ni-NTA His-Bind® Resin* (con baja concentración de imidazol). Posteriormente, la muestra se incubó con la resina y la mezcla de ambas fue cargada dentro de una columna cromatográfica. Se recogió la fracción no retenida, el contenido de la columna se lavó dos veces con el tampón de lavado y, finalmente, se procedió a la elución con el tampón de elución en cuatro pasos.

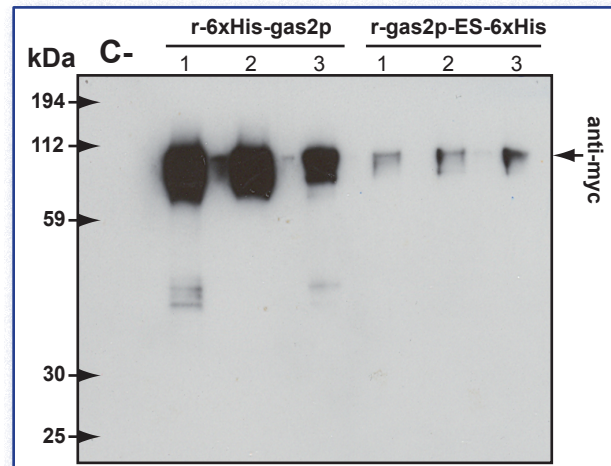


Figura. 70. YMMR124 e YMMR125 expresan las nuevas formas recombinantes de r-gas2p. Las cepas YMMR124 e YMMR125 fueron incubadas durante tres días en presencia de metanol al 1% para inducir la expresión de r-6xHis-gas2p y r-gas2-ES-6xHis. Tras este tiempo, se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y se analizaron mediante un ensayo *Western-blot*, empleando un anticuerpo anti-*myc*. Los tres clones analizados de cada cepa producían proteínas recombinantes, aunque con distinta abundancia. Los caldos de cultivo de la cepa KM71H que había integrado el vector vacío fueron empleados como control negativo (C-)

Las distintas fracciones fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción de los geles con nitrato de plata. A diferencia de lo que ocurrió durante la purificación de r-gas2p', la proteína r-6xHis-gas2p se retenía de forma eficiente en la columna y era posible eluirla mediante la alta concentración de imidazol presente en la solución de elución (Fig. 71). Si bien es cierto que parte de la proteína de interés aparecía en la fracción no retenida y en los distintos lavados, este hecho se interpretó como que la alta concentración de r-6xHis-gas2p en la muestra había saturado la capacidad de unión de la resina. Este mismo fenómeno ya fue observado durante la purificación de r-gas1p, r-gas4p y r-gas5p. Una diferencia importante con la purificación de estas tres proteínas radicaba en que r-6xHis-gas2p se eluía preferentemente en las fracciones de elución 1 y 2, mientras que las otras tres proteínas recombinantes eluían preferentemente en las fracciones 2 y 3 (Fig. 65). Este hecho indicó que, aunque la nueva variante de gas2p mostraba afinidad por la resina Ni-NTA, en ningún caso dicha interacción era tan fuerte como la mostrada por r-gas1p, r-gas4p y r-gas5p. Cabe la posibilidad de que alguna característica de gas2p esté interfiriendo en la unión 6xHis-Ni²⁺. Las fracciones 1 y 2 fueron dializadas

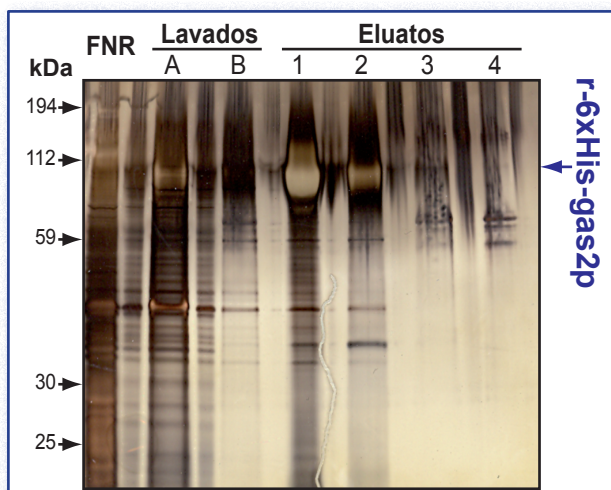


Figura 71. La proteína r-6xHis-gas2p posee afinidad por la resina Ni-NTA en condiciones nativas. Los caldos de cultivo de YMMR124 fueron concentrados, dializados frente al tampón de unión en condiciones nativas e incubados con la resina Ni-NTA. A continuación, la mezcla fue introducida en una columna cromatográfica y se recogió la fracción no retenida (FNR), los lavados A y B, y las eluciones 1, 2, 3 y 4. La mayor parte de la proteína se recuperaba en los eluatos 1 y 2.

frente a tampón acético-acetato 50 mM pH5, con la intención de colocar la muestra en las condiciones óptimas para el ensayo de actividad catalítica.

(VI)- 8. Las proteínas *gas1p*, *gas2p*, *gas4p* y *gas5p* son β -1,3-glucanosil-transferasas

La actividad catalítica de otros miembros de la familia GH72 ha sido determinada con anterioridad y dichas enzimas han sido calificadas como β -1,3-glucanosil-transferasas (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007b). Estos antecedentes sugerían la necesidad de utilizar un ensayo enzimático que permitiera diferenciar entre una actividad hidrolítica, como la de las glucanasas, de la actividad transferasa, como la de las proteínas GH72.

Para valorar la actividad enzimática de enzimas glicosil-hidrolasas, se aprovecha su capacidad para aumentar el número de extremos reductores libres en la mezcla de reacción. Así, la actividad β -1,3-endoglucanasa de *Speng1p*, *ScEng1p* y *ScEng2p* se comprobó incubando dichas enzimas con laminarioligosacáridos reducidos (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-

Cuadrado *et al.*, 2008b). Debido al modo de acción endohidrolítico, estas proteínas rompen una cadena larga de glucano en fragmentos de menor longitud, generando nuevo extremos reductores libres. La cantidad de producto formado se pone de manifiesto mediante una reacción colorimétrica (utilizando PAHBA), en la que la cantidad de color desarrollado guarda relación directa con el número de extremos reductores generados.

Sin embargo, las enzimas que actúan como β -1,3-glucanosil-transferasas (como *AfGel1p*, *AfGel2p* o las proteínas *Gasp* de la levadura de gemación) cortan un oligosacárido de una cadena de glucano donadora y lo transfieren a la cadena aceptora, por lo que el número de extremos reductores en la mezcla de reacción no cambia sustancialmente. Por ello, para valorar la actividad de este tipo de enzimas se utiliza un método que permite la separación y detección de los productos de reacción, basado en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), acoplada a un detector de pulso eléctrico (PED, del inglés *Pulse Electric Detector*). Este método permite analizar los tamaños de los productos de la reacción, ya que los distintos oligosacáridos quedan retenidos en la columna y van siendo eluidos progresivamente en función de su tamaño al utilizar un gradiente. Es decir, las moléculas de menor tamaño se separan de la resina antes que las mayores y son detectadas por un detector y un integrador que transforman la señal en un cromatograma con una serie de picos de área determinada (para una explicación más detallada, ver Anexo B).

Para estudiar la actividad enzimática de las proteínas de la familia GH72 de *S. pombe*, las distintas proteínas purificadas fueron incubadas con laminarioligosacáridos reducidos constituidos por 13 residuos de glucosa (G_{13r}) durante distintos tiempos y los productos de reacción fueron analizados mediante cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico (HPAEC). La incubación de *r-gas1p*, *r-gas4p* y *r-gas5p* con G_{13r} generó un conjunto de productos de distinto tamaño ya observables tras 30 minutos de incubación. Además, la cantidad de los productos aumentaba a medida que los tiempos de incubación eran más

largos (Fig. 72). Los productos resultantes eran de menor y mayor longitud que el sustrato inicial de la reacción, indicando que las proteínas estaban catalizando una reacción de transferencia.

El perfil de productos obtenidos con r-gas1p y r-gas4p era muy similar a los productos generados por ScGas1p, ScGas4p, AfGel1p y AfGel2p (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007b) (Fig. 72A y

B). Los cromatogramas mostraron que ambas enzimas (r-gas1p y r-gas4p) liberaban preferentemente un oligosacárido de 6 ó 7 unidades de glucosa desde el extremo no reductor de la molécula donadora para posteriormente transferirlo sobre el laminarioligosacárido aceptor. Por tanto, los productos iniciales mayoritarios eran G_{7r} , G_{8r} y G_{19r} , de acuerdo con el esquema de reacción en dos pasos descrito con anterioridad por Hartland y colaboradores (1996) (Fig. 75).

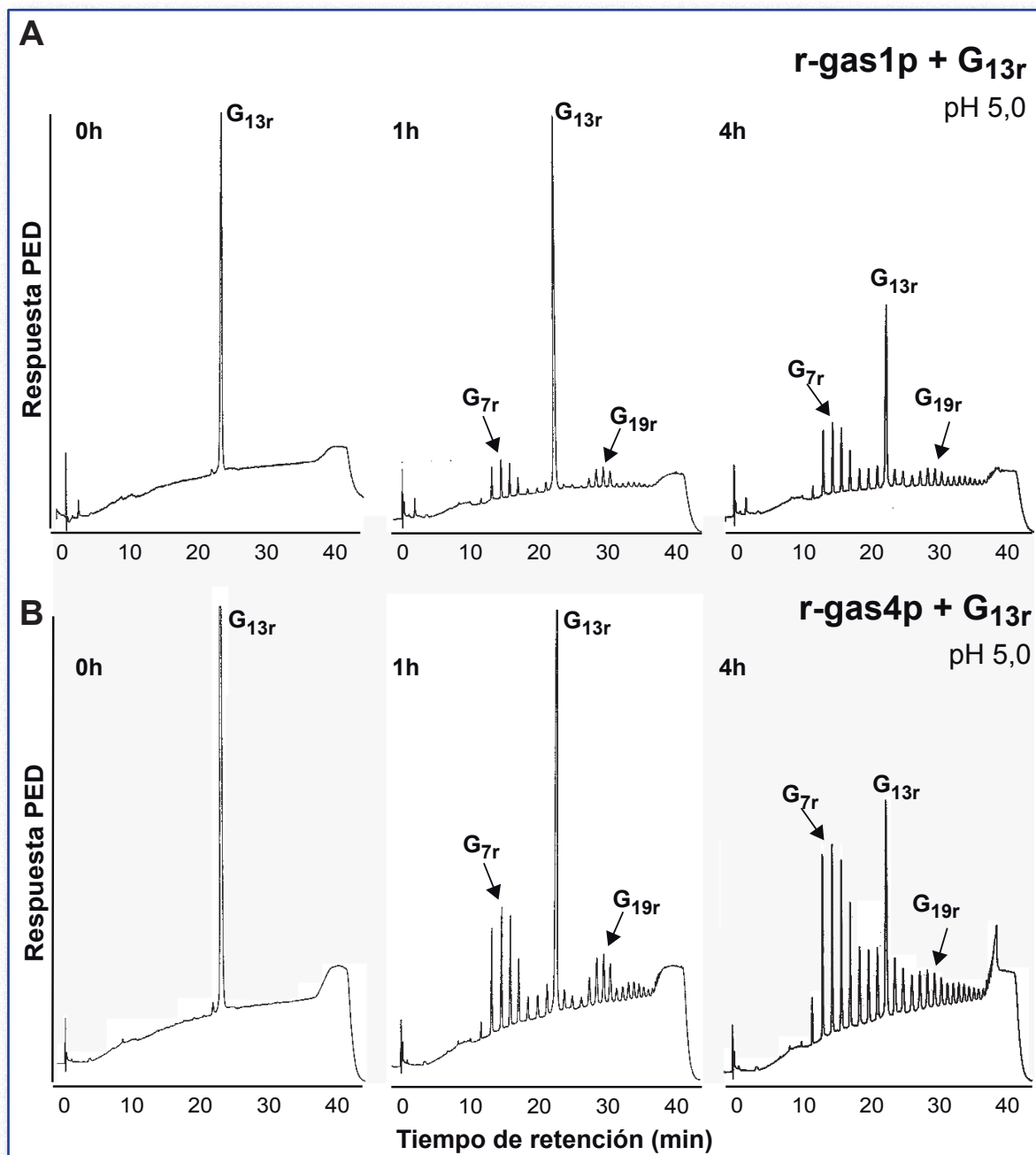


Figura 72. Las proteínas gas1p y gas4p poseen actividad β -1,3-glucanosil-transferasas *in vitro*. Las proteínas recombinantes r-gas1p (A) y r-gas4p (B) fueron incubadas con un laminarioligosacárido reducido de 13 monómeros de glucosa (G_{13r}), en tampón acético 100 mM (pH 5,0) durante el tiempo indicado. Los productos de reacción fueron analizados por HPAEC. En la Figura se indican los productos de reacción mayoritarios.

Como se muestra en la Figura 73A, r-gas5p también era capaz de utilizar G_{13r} como sustrato de reacción, pero el perfil de los productos generados difería ligeramente de los arriba descritos para r-gas1p y r-gas4p. Las tres proteínas transferían oligosacáridos desde el extremo no reductor del laminarioligosacárido donador hacia el extremo no reductor de la molécula de glucano aceptora. Sin embargo, los productos iniciales mayoritarios de la reacción catalizada por r-gas5p eran G_{9r} y G_{17r} , lo que indicaba que esta proteína media pre-

ferentemente la transferencia de moléculas con 4 unidades de glucosa (Fig. 75). Es interesante destacar que este patrón es similar al descrito previamente para ScGas5p, el homólogo más cercano de Spgas5p (Ragni *et al.*, 2007b).

En cuanto a la reacción catalizada por r-gas2p utilizando G_{13r} como sustrato, se obtuvieron varios resultados de interés. En primer lugar, fue necesario utilizar mayores cantidades de enzima que con las otras proteínas para que la reacción enzimática tuviera lugar (20 mg/mL de r-gas2p vs 0,06

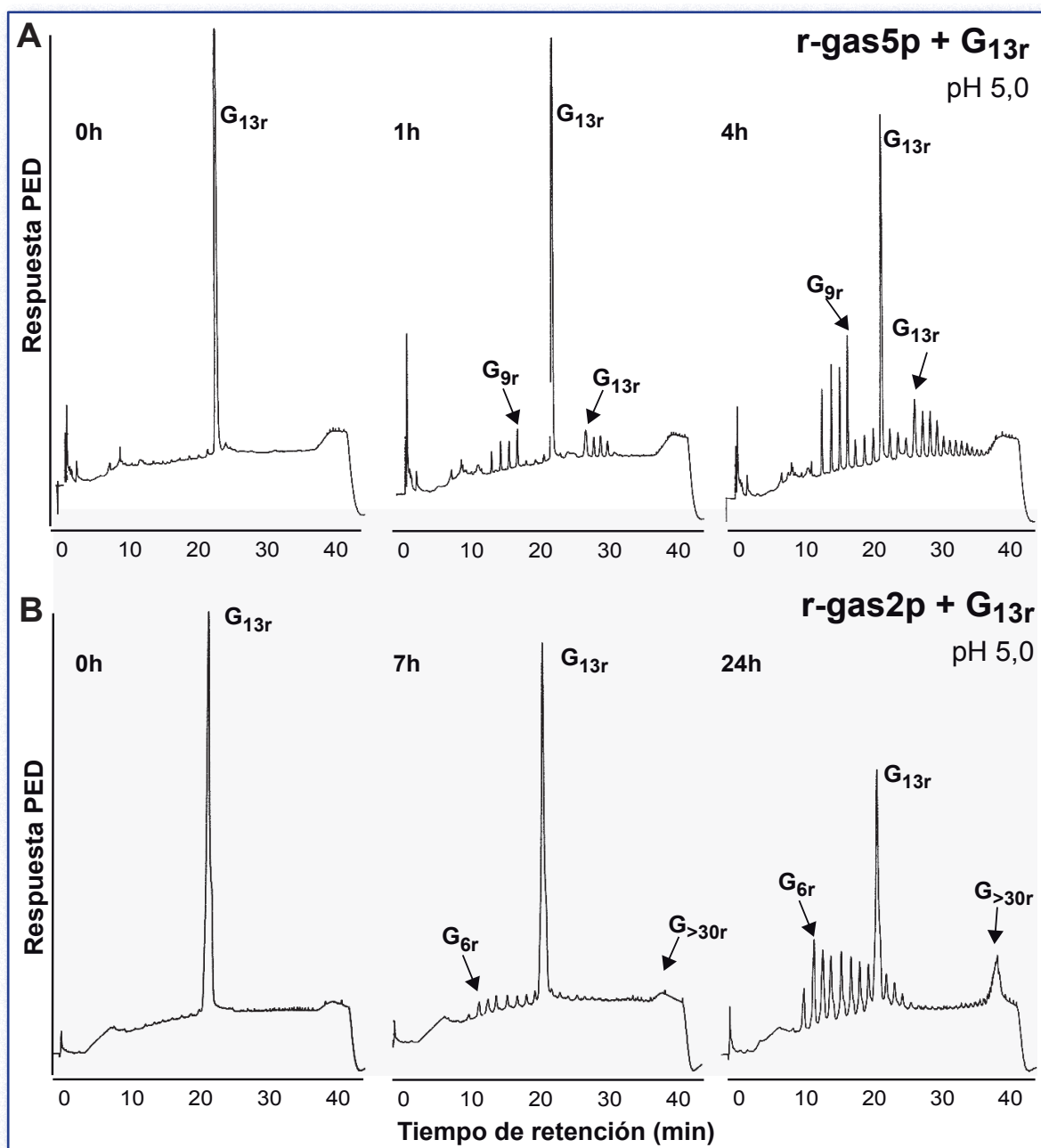


Figura 73. Las proteínas gas5p y gas2p poseen actividad β -1,3-glucanosil-transferasas *in vitro*. Las proteínas recombinantes r-gas5p (A) y r-gas2p (B) fueron incubadas con un laminarioligosacárido reducido de 13 monómeros de glucosa (G_{13r}), en tampón acético 100 mM (pH 5,0) durante el tiempo indicado. Los productos de reacción fueron analizados por HPAEC. En la Figura se indican los productos de reacción mayoritarios.

mg/mL de r-gas1p, r-gas4p o r-gas5p). En segundo lugar, también fue necesario emplear tiempos de incubación mayores antes de observar la aparición de productos de reacción. En último lugar, pero no por ello menos importante, la incubación de r-gas2p con G_{13r} generó un perfil de productos muy diferente de los obtenidos con cualquiera de los otros miembros de la familia GH72 estudiados hasta el momento. Los primeros productos observados eran de menor longitud que la molécula de G_{13r} empleada como sustrato de la reacción, teniendo un grado de polimerización desde 6 a 9 monómeros de glucosa, y parecía resultar de la escisión del sustrato (Fig. 73B). Sin embargo, sus correspondientes productos de transferencia esperados (oligosacáridos de 17 a 19 glucosas) no aparecían en el cromatograma. Tras 24 horas de reacción fue posible detectar la presencia de productos de transferencia, aunque eran mucho mayores (grado de polimerización > 30) que los esperados según los productos de escisión observados inicialmente. Estos resultados sugerían que quizás G_{13r} no era un sustrato apropiado para gas2p y que dicha enzima podría necesitar un aceptor de mayor longitud para funcionar eficientemente. Esto explicaría por qué la reacción

ocurría tan lentamente y por qué no se acumulaban productos de transferencia de tamaño intermedio (en torno a 17-19 glucosas); la enzima quizás tuviese mayor afinidad por dichos productos y actuase sobre ellos antes que sobre el sustrato más abundante (G_{13r}).

Para comprobar esta hipótesis, r-gas2p fue incubada con laminarioligosacáridos reducidos de 19 glucosas (G_{19r}) durante distintos tiempos y los productos de la reacción enzimática también fueron analizados mediante HPAEC. En esta ocasión, se obtuvo un perfil simétrico de productos de escisión y transferencia (Fig. 74), validando nuestra hipótesis. Como puede deducirse del cromatograma, gas2p transfería un oligosacárido de 11 unidades de glucosa desde el extremo no reductor de la molécula donadora hasta otra molécula que actuaba como aceptor, ya que los productos iniciales más abundantes eran G_{8r} y G_{31r} (Fig. 75).

El complejo perfil de HPAEC observado para todas las proteínas tras tiempos prolongados de incubación indicaba que los productos iniciales de transferencia podían ser posteriormente reutilizados como moléculas donadoras o aceptoras, resultando un amplio rango de productos de trans-

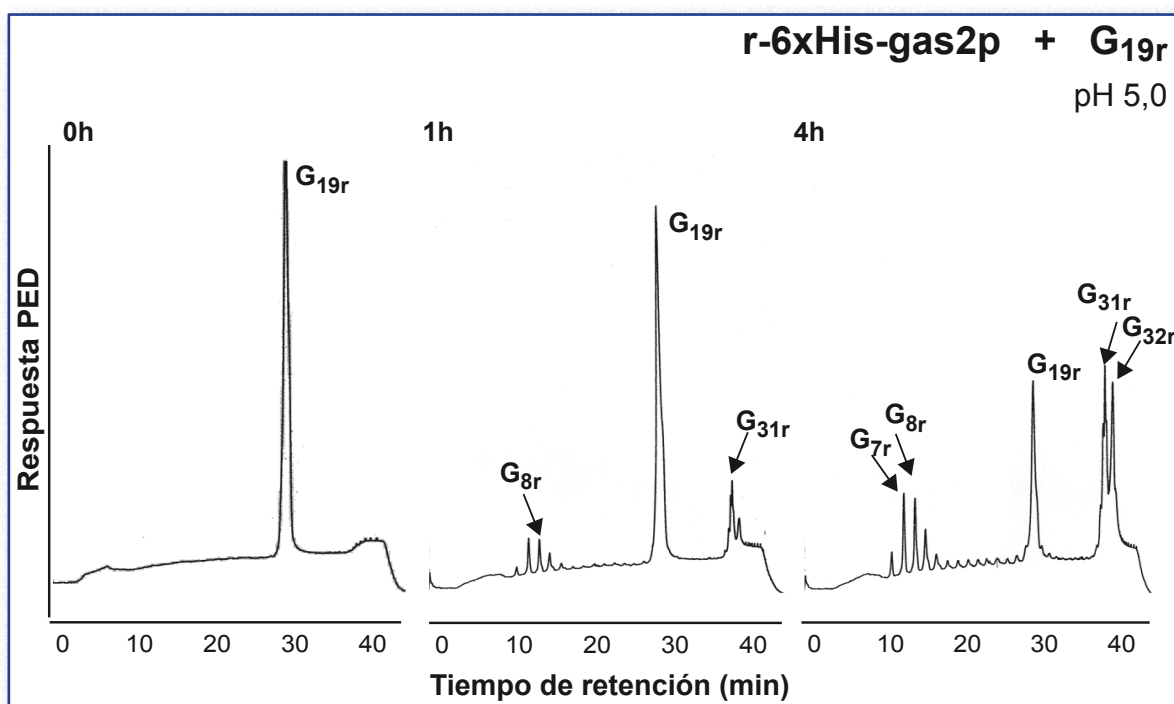


Figura 74. La proteína gas2p también es una β -1,3-glucanosil-transferasa. r-6xHis-gas2p fue incubada con G_{19r} en tampón acético 100 mM (pH 5,0) durante los tiempos indicados. Los productos de reacción fueron analizados con HPAEC. En la Figura se indican los productos de reacción más abundantes.

ferencia con tamaños cada vez mayores (grado de polimerización >30), hasta que se volvían insolubles en álcali. La comparación de los perfiles de HPAEC obtenidos con laminarioligosacáridos control mostraron que todos los productos contenían únicamente enlaces β -1,3, ya que la introducción de un enlace distinto habría resultado en un cambio en el tiempo de retención del oligosacárido ramificado (Koizumi *et al.*, 1989; Mouyna *et al.*, 1998).

Por tanto, todas estas observaciones permiten concluir que gas1p, gas2p, gas4p y gas5p poseen actividad β -1,3-glucanosil-transferasa *in vitro*, aunque difieren en sus afinidades por distintos sustratos (dependiendo del grado de polimerización) y en tamaño del oligosacárido que transfieren, lo que resulta en distintos productos liberados. En la Figura 75 se esquematizan las principales reacciones catalizadas por cada una de estas enzimas.

Para determinar la longitud mínima de los oligosacáridos que podían actuar como sustratos de la reacción de transferencia, esto es, que promovería la liberación de un oligosacárido desde el extremo reductor y la generación de un único producto de transferencia, r-gas1p, r-gas4p y r-gas5p fueron incubadas con laminarioligosacáridos de distinto tamaño. El menor sustrato reconocido por las enzimas poseía 9 monómeros de glucosa (datos no mostrados). El pH óptimo para las β -1,3-glucanosil-transferasas gas1p, gas4p y gas5p también fue analizado, resultando un pH ligeramente ácido (pH 5,0). No se observó la aparición de productos para ninguna de las tres enzimas cuando la reacción fue llevada a cabo a pH 3,5, pero gas1p y gas4p eran capaces de actuar a pH ligeramente básico (pH 7,5) (datos no mostrados).

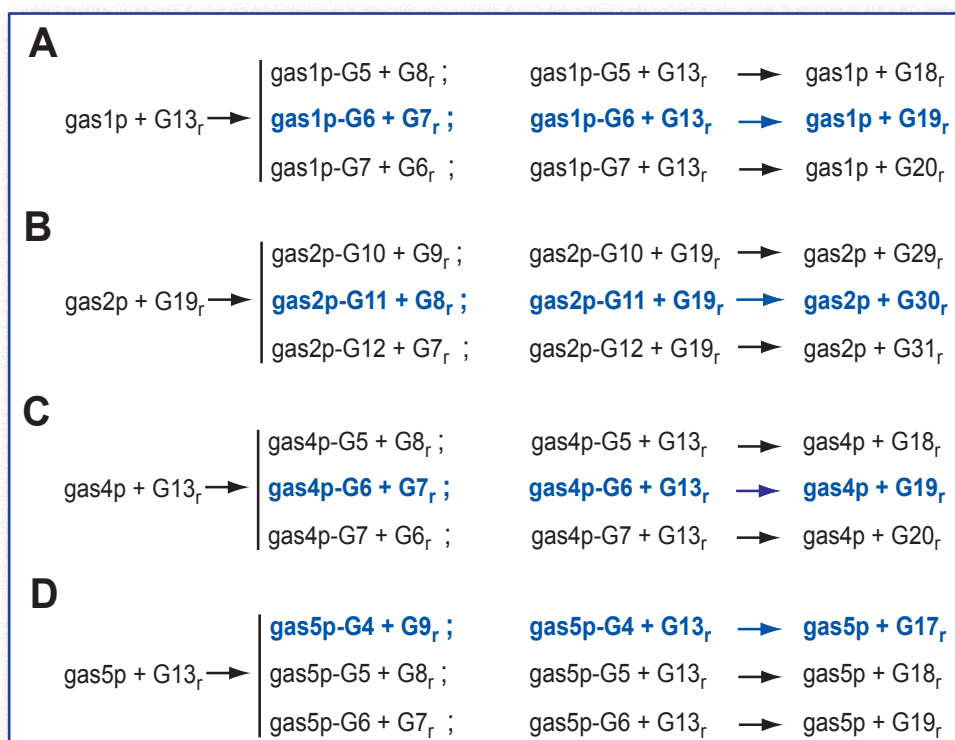


Figura 75. Principales reacciones en dos pasos catalizadas por gas1p, gas2p, gas4p y gas5p. La reacción mayoritaria en cada caso se indica en azul.

(VII)- DISCUSIÓN

(VII)- DISCUSIÓN

S. pombe constituye un atractivo modelo morfo-genético para entender cómo los hongos, y las células en general, regulan el crecimiento polarizado y la citoquinesis a lo largo del ciclo celular. Durante los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por comprender la manera con la que esta levadura establece y regula su crecimiento polarizado (Brunner y Nurse, 2000; Chang, 2001; Fischer *et al.*, 2008; Mata y Nurse, 1998; Verde, 1998) y el mecanismo que controla y coordina la citoquinesis con el ciclo celular (Balasubramanian *et al.*, 2004; Barr y Gruneberg, 2007; Chang y Peter, 2003; Guertin *et al.*, 2002; Hayles y Nurse, 2001; Krapp *et al.*, 2004; McCollum y Gould, 2001). También se ha prestado especial atención a la síntesis de la pared celular y, sobre todo, a su regulación (Arellano *et al.*, 1999; Cabib *et al.*, 1998; Cabib *et al.*, 2001). Sin embargo, ha sido mucho menor el avance experimentado en el conocimiento acerca de cómo la levadura de fisión sintetiza los componentes de la pared celular, en particular, el β -1,3-glucano, el polisacárido estructural mayoritario de su pared vegetativa y uno de los principales componentes de la pared de las ascosporas.

El crecimiento y modificación de los β -1,3-glucanos de la pared celular fúngica a lo largo del ciclo vegetativo implica la síntesis de la cadena por parte del complejo β -1,3-glucán-sintasa y su posterior enlace con otras cadenas de β -1,3-glucano o con otros componentes de la pared celular, como quitina, α -1,3-glucano, β -1,6-glucano (diglucano) y proteínas. En este proceso, es necesaria, por un lado, la hidrólisis de los polímeros preexistentes en la pared celular por acción de enzimas hidrolíticas de tipo endo- y exo-glucanasas y, por otro, la ligación de los nuevos componentes con los preexistentes por la acción de las glucosiltransferasas.

Respecto a las proteínas encargadas de la modificación no degradativa de los polisacáridos de las paredes celulares fúngicas, se han invertido enormes esfuerzos en la búsqueda de la(s) enzima(s) responsable(s) de la ramificación del β -

1,3-glucano recién sintetizado para generar el β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6. Por ahora, dichos esfuerzos han resultado infructuosos, aunque han permitido la identificación y descripción de ScBgl2p y sus homólogos en *A. fumigatus* y *C. albicans* (Goldman *et al.*, 1995; Kalebina *et al.*, 2002; Mouyna *et al.*, 1998; Mrsa *et al.*, 1993; Sarthy *et al.*, 1997). Estas enzimas, pertenecientes a la familia GH17, son capaces de introducir enlaces β -1,6 en las cadenas de β -1,3, de modo que se genera un giro en la cadena lineal de polisacárido. Asimismo, también se ha descrito que las enzimas de la familia GH72 podrían intervenir en la remodelación del β -1,3-glucano, elongando las cadenas laterales. Las proteínas más conocidas de esta familia son ScGas1p, AfGel1p y CaPhr1p (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000a; Popolo y Vai, 1999). A pesar de que existen numerosos estudios sobre la función y las características bioquímicas de estas proteínas, la composición de la pared celular de estas especies es diferente de la de *S. pombe*, ya que está compuesta principalmente por β -1,3 y β -1,6-glucanos y quitina, mientras que en la levadura de fisión no existen cantidades significativas de quitina y contiene α -1,3-glucano, sin mencionar que el β -1,6-glucano de la levadura de fisión difiere significativa y cualitativamente del presente en las otras especies (Klis *et al.*, 2006; Lesage y Bussey, 2006). Estas diferencias llevaron a plantear este trabajo de investigación, para determinar si existían proteínas de la familia GH72 en *S. pombe*, ya que, debido a la diferente composición de la pared celular, podrían no ser necesarias y haberse perdido a lo largo de la evolución. En caso de existir, habría que estudiar si ejercían la misma función biológica en la levadura de fisión. Las diferencias en el ciclo de vida de estas especies y resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio con otras familias de hidrolasas que demuestran que los resultados obtenidos en la levadura de gemación no son siempre extrapolables a la levadura de fisión, justificarían el estudio del papel biológico de estas proteínas en *S. pombe*.

Una búsqueda de proteínas con homología a ScGas1p en la base de datos del genoma de *S. pombe* (Wood *et al.*, 2002) reveló la existencia de cuatro genes que codifican enzimas con homolo-

gía al dominio GluTD propio de los miembros de la familia de glucanosil-transferasas GH72, que fueron denominadas *gas1p*, *gas2p*, *gas4p* y *gas5p*. En este trabajo se ha pretendido determinar la función de estos genes, haciendo especial hincapié en la caracterización de *gas1p* y *gas4p* y su contribución en la organización de la pared celular durante el ciclo vegetativo y la esporulación, respectivamente.

(VII)- 1. Los genes *gas1+*, *gas2+*, *gas4+* y *gas5+* codifican proteínas homólogas a *ScGas1p* en *S. pombe*

Los genes de *S. pombe* resultaron ser homólogos a los genes *GAS/PHR/EPD/GEL* que codifican una familia de proteínas GPI necesarias para una correcta morfogénesis en hongos y levaduras (Caracuel *et al.*, 2005; Carotti *et al.*, 2004; Fonzi, 1999; Hartland *et al.*, 1996; Mouyna *et al.*, 1998; Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005; Popolo y Vai, 1999; Ragni *et al.*, 2007a; Ragni *et al.*, 2007b). Estas proteínas de la familia GH72 poseen una estructura modular, en la cual el dominio catalítico (GluTD) puede estar seguido por diferentes dominios en el extremo C-terminal (Papaleo *et al.*, 2006). Esta variación también ocurre en las proteínas GH72 de *S. pombe*. De manera ilustrativa, *gas1p* presenta una región rica en serinas (*Ser-rich*) y una región rica en cisteínas (*Cys-rich* o *Cys-box*), mientras que *gas2p* únicamente contiene el dominio *Cys-box* y *gas5p*, el dominio *Ser-rich*. Por su parte, *gas4p* no posee ninguno de estos dominios adicionales, excepto si se toma en consideración un dominio *Ser-rich* de tamaño muy reducido (ver a la Figura 25 del Capítulo III).

Antes de proceder al estudio y caracterización de la función de estas proteínas, se comprobó que las cuatro fases de lectura abierta eran genes que se transcribían y no pseudogenes. El hecho de que todas se expresasen durante el crecimiento vegetativo, aunque a distintos niveles, era un primer indicio de que se trataba de genes reales, pues la célula no gastaría energía en procesos innecesarios. Un estudio detallado reveló que la

expresión de estos genes presentaba variaciones en las distintas fases del ciclo de vida -crecimiento vegetativo y esporulación- así como oscilaciones periódicas a lo largo de ciclo celular en algunos casos (Figuras 28B y 29C y D del Capítulo III). Esta estrecha regulación transcripcional de los distintos genes sugería que se trataba de regiones codificantes reales y no de pseudogenes. Así, se comprobó que los ARNm de *gas1+* y *gas5+* presentaban una mayor acumulación en los momentos previos a la septación, mientras que los niveles del transcrito de *gas2+* eran máximos después de anafase. Durante el proceso de conjugación y esporulación, la transcripción de estos tres genes se reprime (*GeneDB*), mientras que aumenta de forma considerable la de *gas4+* hasta alcanzar un máximo coincidente con la síntesis de la pared de las esporas (de Medina-Redondo *et al.*, 2008). La existencia de familias génicas que codifican proteínas de función similar pero que presentan diferencias en la expresión y regulación no es rara en hongos y levaduras. Así, por ejemplo, en el genoma de *S. pombe* existen cuatro genes que codifican la posible subunidad catalítica de la β -1,3-glucán-sintasa y que poseen funciones especializadas durante el ciclo biológico de esta levadura. De este modo, *cps1p/bgs1p*, *bgs3p* y *bgs4p* son indispensables para el crecimiento vegetativo mientras que *bgs2p* es esencial durante la síntesis y maduración de la pared de la ascospora (Cortés *et al.*, 2002; Cortés, 2005; Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000; Martín, 2002; Martín *et al.*, 2003). De manera análoga, la α -glucán-sintasa *ags1p/mok1p* es esencial durante el crecimiento vegetativo, mientras que sus parálogos *mok12p*, *mok13p* y *mok14p* son necesarios para la síntesis de los α -glucanos de la pared de la ascospora (García, I., 2006; García *et al.*, 2006; Hochstenbach *et al.*, 1998). De forma similar, era probable que las proteínas codificadas por los genes *gas+* ejercieran funciones biológicas relacionadas en los diferentes momentos del ciclo de vida de la célula. Como se ha recogido en los Capítulos de Resultados y se discutirá en los siguientes apartados de esta sección, en este trabajo, se ha puesto de manifiesto que *gas4p* es esencial para la ma-

duración y viabilidad de las esporas, mientras que los otros tres miembros -*gas1p*, *gas2p* y *gas5p*- desarrollan su función durante el ciclo vegetativo.

Durante los análisis de expresión, resultó llamativo el hecho de encontrar un transcrito de mayor tamaño del esperado para *gas4⁺* (ver Figura 28A del Capítulo III). Según la información recogida en la base de datos del *GeneDB*, la fase de lectura abierta de los genes *gas2⁺* y *gas4⁺* posee un número similar de nucleótidos. Por ello, cabría esperar que sus transcritos fuesen también de tamaño parecido y generasen proteínas similares en cuanto al número de aminoácidos. Sin embargo, como se comprobó en ensayos tipo *Northern blot* en los que la misma membrana fue hibridada sucesivamente con las sondas de *gas2⁺* y *gas4⁺*, el transcrito de este último gen era mayor. Este fenómeno no se estudió con mayor profundidad, pero una explicación posible es que los genes que se expresan durante el proceso de esporulación podrían estar regulados de distinta manera a la de los genes implicados en el crecimiento vegetativo. Una de estas diferencias podría radicar en la posición de las secuencias promotoras respecto del codón de inicio de la traducción. Ésta sería quizás la situación de *gas4⁺*, en la que el promotor (y por tanto el inicio de la transcripción) podría estar más alejado del triplete ATG, de modo que el ARNm generado fuera de mayor longitud que en *gas2⁺*. Sin embargo, cuando el gen *gas4⁺* se clonó en plásmidos para distintos ensayos, se incluyó únicamente una región de unos 500 pb antes del ATG (5'UTR) y otros 500 pb tras el codón de parada de la traducción (3'UTR) y estos plásmidos eran capaces de complementar los defectos del mutante *gas4Δ*, lo que parece ir en contra de la posibilidad de que el promotor esté más alejado de la región codificante. En todo caso, no se comprobó el tamaño del ARNm producido a partir de transformantes que contenían los distintos plásmidos, por lo que no cabe descartar que produzcan un transcrito de una longitud diferente al producido a partir del *locus* genómico, pero que se tradujera generando la misma proteína capaz de complementar el defecto del mutante.

(VII)- 2. La proteína *gas2p* es un miembro inusual de la familia GH72

Un aspecto que llamó la atención fue el hecho de que la proteína *gas2p* anotada en la base de datos de *S. pombe* careciera de una de las características comunes a todos los miembros de la familia GH72 descritos hasta la fecha: poseer una región hidrofóbica en el extremo C-terminal que sirviera de señal para su escisión y sustitución por un motivo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), el cual permite el anclaje de las proteínas a la membrana plasmática y/o pared celular. Recientemente, Ragni y colaboradores (2007b) han sugerido que la hipotética proteína *gas2p* podría ser no funcional o tal vez una proteína secretada inusual, dado que no posee la señal de anclaje GPI y que, a pesar de poseer una región Cys-rich, presenta mayor homología con los miembros de la subfamilia GH72⁻ (las proteínas que carecen del dominio rico en cisteínas). El dominio rico en Cys, que aparece anotado en la base de datos Pfam como X8 (Pfam PF07983), está presente también en proteínas de plantas, como Ole e 9 y Ole e 10, una β-1,3-glucanasa de la familia GH17 y una lectina, respectivamente (Barral *et al.*, 2005; Huecas *et al.*, 2001), y ha sido clasificado recientemente como una nueva familia de módulos de unión a carbohidratos (CBM43) en la base de datos CAZY. Recientemente se ha descrito que en el dominio X8 de ScGas2p existen 8 Cys entre las que se establecen 4 puentes disulfuros, lo que permite que este dominio se pliegue de forma similar a los de plantas (Popolo *et al.*, 2008). Además, es necesario para que las proteínas adquieran una conformación estable.

Una explicación sencilla para este hecho es que el gen *gas2⁺* estuviese mal anotado en la base de datos del genoma y que sí poseyera la región hidrofóbica C-terminal. Dos aproximaciones diferentes descartaron tal posibilidad: la secuenciación de la parte final de dicho gen a partir de ADN genómico de una cepa silvestre y la visualización de la proteína de fusión *gas2p*-GFP. La primera aproximación reveló que la secuencia del gen presente en las bases de datos era correcta. Además, el estudio de las dos fases de lectura alternativas

y de sus perfiles hidrofóbicos con la aplicación *big-PI Predictor* indicó que no existían secuencias hidrofóbicas capaces de servir de señal de anclaje del motivo GPI en ninguna de ellas (por su parte, el programa *GPI-SOM* indicaba que sí podría existir una señal para este tipo de anclaje en la tercera fase de lectura analizada). Por tanto, de ser *gas2p* una proteína funcional y poseer actividad β -1,3-glucanosil-transferasa, sería un miembro peculiar de la familia GH72 al carecer del anclaje GPI. La segunda aproximación indicó que *gas2-GFP⁺* era capaz de inducir correctamente la expresión de una proteína de fusión que se localizaba en el exterior de la célula, presumiblemente en la pared celular, localización esperada para una proteína implicada en la remodelación de la misma. La adición de epítomos en el extremo carboxilo de las proteínas GPI suele interferir con el complejo procesamiento que estas proteínas sufren en el aparato de Golgi, impidiendo que alcancen su destino final y en muchos casos la fluorescencia se detecta en vesículas intracelulares, como en el caso de la proteína *adg2p* (Alonso-Núñez *et al.*, 2005). Por tanto, la localización de *gas2p-GFP* en el exterior de la célula sugiere la ausencia de una señal para la adición de GPI. Una observación adicional que confirma estas observaciones es el hecho de que la expresión en *P. pastoris* de *r-gas2p* (prácticamente idéntica a *gas2p* nativa -ver Capítulo VI y Materiales y Métodos) provoca su liberación al sobrenadante de cultivo en lugar de quedar retenida en la membrana o pared celular. Sin embargo, no hay seguridad de que este dato sea extrapolable a la levadura de fisión, ya que existen diferencias en la composición de la pared celular de ambas levaduras que podrían modificar la retención de esta proteína en esta estructura.

Una observación adicional que confirma que la secuencia de *gas2p* es correcta es la existencia de proteínas ortólogas en el genoma de otras especies de *Schizosaccharomyces* recientemente secuenciadas, *S. japonicus* y *S. octosporus* (Broad Institute; <http://www.broad.mit.edu>). Estas levaduras poseen cuatro genes de la familia GH72 cada una, que presentan una elevada identidad con las proteínas de *S. pombe* (Fig. 76A). El alineamiento múltiple de estas proteínas así como el análisis de

la estructura modular de las mismas permite determinar que las proteínas codificadas por los genes *SJAG_01835* y *SOC_c188* son los ortólogos de *gas2p* en *S. japonicus* y *S. octosporus*, respectivamente (Fig. 76B). Cuando se compara la secuencia de estas tres proteínas con la *ScGas2p*, se puede comprobar que presentan una elevada identidad a lo largo de toda la proteína, aunque las proteínas de *Schizosaccharomyces* son más cortas que la de *S. cerevisiae*, careciendo de parte del dominio X8 y del final de la proteína (Fig. 76C), por lo que ninguna de ellas posee la región hidrófoba en el extremo carboxilo necesaria para la adición del anclaje GPI (según el programa *GPI-SOM*). Además, solo se conservan 6 de las 8 Cys presentes en el dominio X8. Recientemente se ha descrito que en *ScGas2p* existen 7 puentes disulfuro que se organizan en dos grupos, uno en el dominio GluTD (3 puentes) y otro en el dominio X8 (4 enlaces) (Fig. 77A) (Popolo *et al.*, 2008). Es interesante que las dos Cys que no están conservadas forman uno de los puentes disulfuro, mientras que el resto de los enlaces están perfectamente conservados, por lo que cabría suponer que las proteínas *gas2p* de *Schizosaccharomyces sp* tendrían una estructura general similar a la de *S. cerevisiae*, difiriendo fundamentalmente en el extremo carboxilo (Fig. 77B)

Todas estas observaciones indican que *gas2p* es una β -1,3-glucanosil-transferasa peculiar, siendo diferente del resto de las proteínas de la familia GH72 presentes en otras especies, tanto por su estructura (carencia de anclaje anclaje GPI y dominio X8 más corto) como por su actividad catalítica (como se discutirá más adelante). Además, esta proteína está conservada en las tres especies de *Schizosaccharomyces* secuenciadas hasta la fecha, lo que sugiere que podría desempeñar un papel específico en la construcción de la pared celular en la familia *Schizosaccharomycetaceae*.

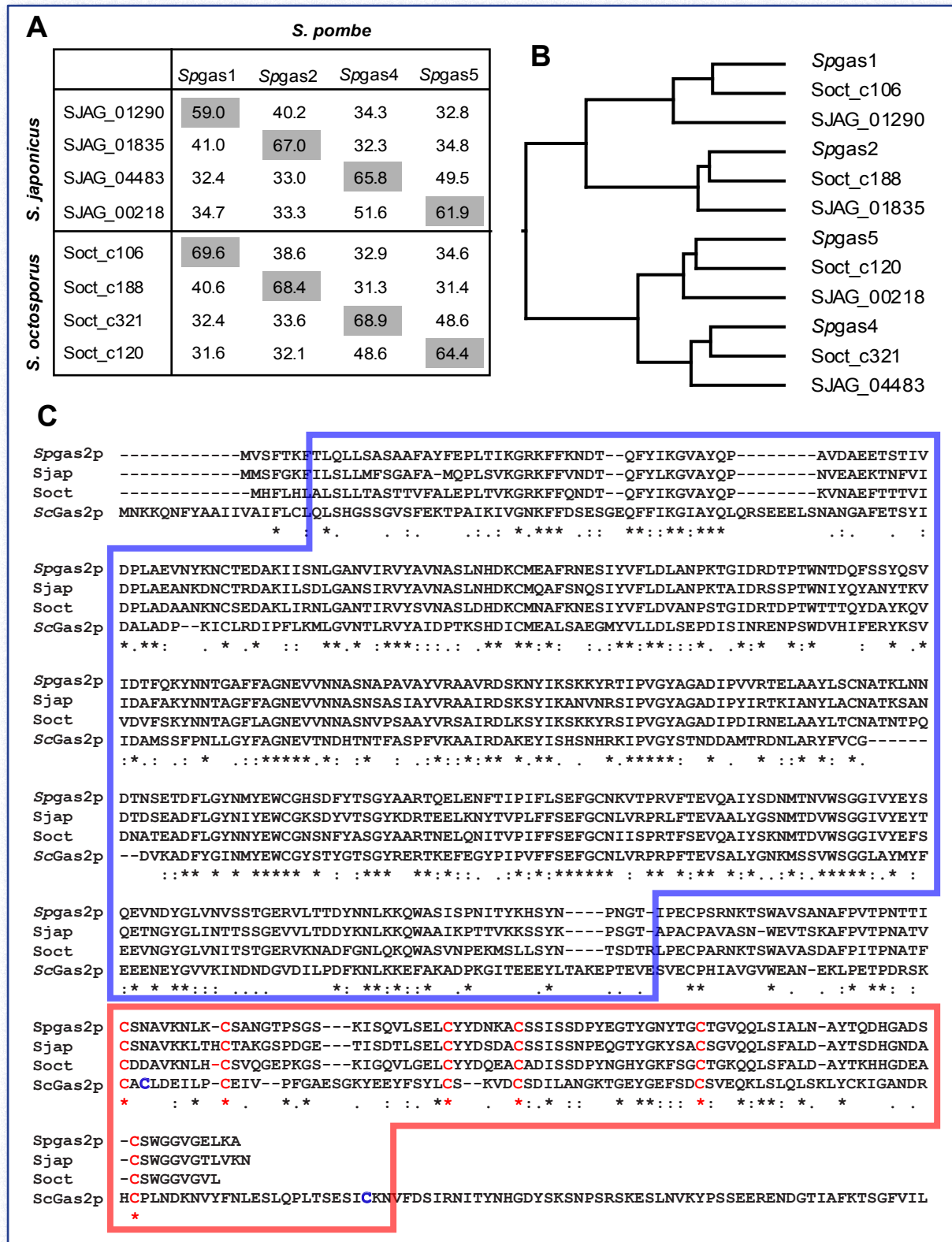


Figura 76. Proteínas GH72 del género *Schizosaccharomyces*. (A) Porcentaje de identidad entre las proteínas GH72 de *S. pombe*, *S. oculosporus* y *S. japonicus*. Las secuencias fueron obtenidas del Broad Institute utilizando BLAST para comparar la secuencia de *gas2p* con el genoma de *S. oculosporus* y *S. japonicus*. Las secuencias de *S. japonicus* son SJAG_00218, SJAG_01290, SJAG_01835 y SJAG_04483. El genoma de *S. oculosporus* no está todavía anotado, por lo que las secuencias se nombraron utilizando el número del contig que las contiene: Soct_c106, Soct_c120, Soct_c188 y Soct_c321. (B) Dendrograma obtenido tras el alineamiento múltiple de las proteínas del género *Schizosaccharomyces* con Clustal X. (C) Alineamiento múltiple de las proteínas *Gas2* de *S. cerevisiae* (*ScGas2p*), *S. pombe* (*SpGas2p*), SJAG_01835 de *S. japonicus* (*Sjap*) y Soct_c188 de *S. oculosporus* (*Soct*). El recuadro azul indica el dominio GluTD y el rojo el dominio X8. Las Cys conservadas en las cuatro proteínas se indican en rojo, mientras que las exclusivas de *S. cerevisiae* están marcadas en azul.

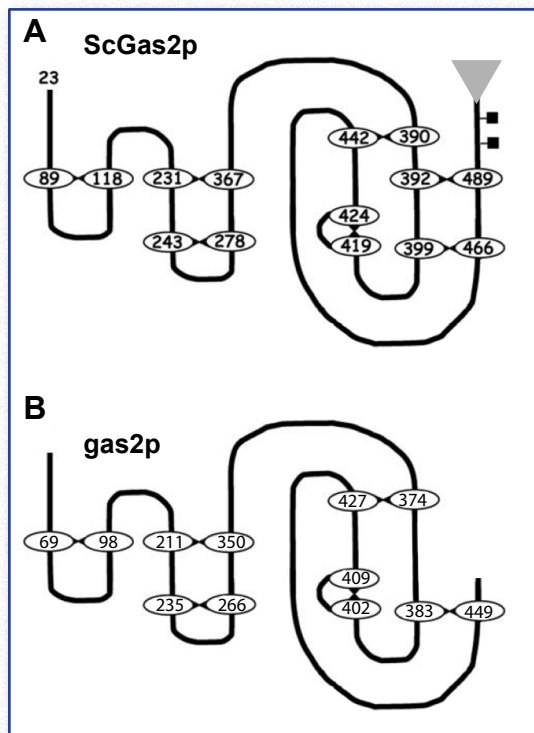


Figura 77. Representación esquemática de las proteínas ScGas2p y Spgasp2p. (A) Esquema de los puentes disulfuros de la proteína ScGas2p determinados experimentalmente (Popolo et al., 2008). Los residuos Cys se muestran como óvalos numerados. Los cuadrados negros indican sitios de N-glicosilación y el triángulo gris el anclaje GPI. (B) Posible estructura terciaria de la proteína gas2p.

(VII)- 3. Las proteínas gasp son β -1,3-glucanosil-transferasas

Cuando se purificaron las formas recombinantes de las proteínas gasp de *S. pombe* y se analizó su actividad catalítica *in vitro*, se comprobó que exhibían la misma actividad glucanosil-transferasa ya descrita para otros miembros de la familia GH72 (Carotti et al., 2004; Mouyna et al., 2000a; Ragni et al., 2007b), esto es, catalizando la transferencia de un oligosacárido de entre 4 y 11 monómeros de glucosa desde el extremo no reductor de una molécula de β -1,3-glucano donadora al extremo no reductor de otra molécula aceptora. El análisis de los productos de reacción obtenidos reveló que los enlaces generados eran también β -1,3, lo que indicaba que estas enzimas no son las responsables de introducir puntos de ramificación en el β -1,3-glucano lineal para generar β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6. Asimismo, el perfil de los cromatogramas también indicaba que el número de extremos reductores y no reductores en las muestras permanecía constante. Por tanto,

las proteínas Spgasp son capaces de participar en la elongación de los β -1,3-glucanos preexistentes, pero no de generar nuevos extremos no reductores (similar a otros miembros de la familia GH72 cuya actividad catalítica ya ha sido descrita).

El análisis de los productos de la reacción generados por las cuatro proteínas indicó que aunque todas ellas son β -1,3-glucanosil-transferasas, existen diferencias en la longitud del oligosacárido que es transferido de una molécula a otra. Así, mientras que r-gas1p y r-gas4p poseen la misma actividad catalítica, siendo los productos iniciales mayoritarios G_{7r} , G_{8r} , G_{18r} y G_{19r} (esto es, transfiriendo β -1,3-hexasacáridos), r-gas5p cataliza preferentemente la transferencia de moléculas con 4 unidades de glucosa ya que los productos iniciales fueron G_{9r} y G_{17r} . Es interesante constatar que la misma variedad en el tamaño de la molécula transferida ha sido descrita también para las proteínas de *S. cerevisiae* (Ragni et al., 2007b), donde las proteínas ScGas1p y ScGas2p poseen la misma actividad que r-gas1p y r-gas4p y ScGas5p es similar a r-gas5p (Tabla 5). Además, otros miembros de esta familia, como AfGel1p, AfGel2p, CaPhr1p y CaPhr2p, presentan una actividad similar a la de ScGas1p, siendo los productos iniciales mayoritarios G_{6r} , G_{7r} , G_{8r} , G_{18r} , G_{19r} y G_{20r} cuando se incuban con G_{13r} (Mouyna et al., 2000a; Mouyna et al., 2005). En el caso de *S. cerevisiae*, se había postulado que quizás la diferencia en la actividad de las distintas proteínas podría deberse a la presencia/ausencia de la región Cys-rich, ya que ScGas1p y ScGas2p poseen la misma actividad pero diferente a las de las otras proteínas (Ragni et al., 2007b). Sin embargo, el hecho de gas4p, que carece del dominio Cys-rich, muestre una actividad similar a la de gas1p, ScGas1p y ScGas2p, que poseen este dominio, indica que no existe una clara correlación entre estos dos hechos, y que proteínas de la subfamilias GH72⁺ y GH72⁻ pueden catalizar la misma reacción de transferencia.

El caso de gas2p es excepcional, ya que a pesar de que se ha sugerido que podría ser una proteína no funcional (Ragni et al., 2007b), en este trabajo se ha demostrado que r-gas2p también posee actividad β -1,3-glucanosil-transferasa.

Tabla 5. Comparación de la actividad catalítica de las proteínas GH72 de *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

<i>S. cerevisiae</i>	Cys-box	Oligosacárido transferido	<i>S. pombe</i>	Cys-box	Oligosacárido transferido
ScGas1p	SI	G6	gas1p	SI	G6
ScGas2p	SI	G6	gas2p	SI	G11
ScGas3p	SI	Actividad no determinada	-	-	-
ScGas4p	NO	G6/G7	gas4p	NO	G6
ScGas5p	NO	G4	gas5p	NO	G4

Sin embargo, esta proteína mostró preferencia por sustratos de mayor longitud en los ensayos *in vitro* que otros miembros de la familia, transfiriendo un oligosacárido de 11 unidades de glucosa desde el extremo no reductor de la molécula donadora hasta la aceptora, siendo los productos más abundantes G_{8r} y G_{31r} cuando se usó como sustrato G_{19r}. Esta actividad enzimática no ha sido descrita previamente para ninguno de los miembros de esta familia, lo que puede ser una indicación de que las peculiares características estructurales de esta proteína le permiten interactuar de manera única con los sustratos.

El alineamiento múltiple de los dominios GluTD (de 330-350 aa) de los miembros de la familia GH72 revela la existencia de dos ácidos glutámicos (señalados con asteriscos) perfectamente conservados en las secuencias (A/S)GNE*(V/I)-residuo ácido catalítico- y SE*(Y/F)GC -residuo nucleófilo catalítico- (Carotti *et al.*, 2004; Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000b; Papaleo *et al.*, 2006). Dichos aminoácidos, constituyentes del par catalítico involucrado en la reacción enzimática, distan entre sí aproximadamente unos 100 residuos y se ha predicho que se situarían en los extremos de las hojas β -4 y β -7 de la estructura en *TIM barrel* predicha para el dominio GluTD (Gaboriaud *et al.*, 1987; Papaleo *et al.*, 2006). Estos ácidos glutámicos también están presentes en las proteínas GH72 de la levadura de fisión ocupando posiciones similares a las descritas en otros miembros de la familia. La mutación de los dos glutamatos conservados en gas4p (las formas gas4p-E157Q y gas4p-E257Q) generó dos proteínas sin actividad biológica (de Medina-Redondo *et al.*, 2008, y este trabajo). Los aminoácidos empleados para

sustituir a los ácidos glutámicos poseen similares características, por lo que la estructura tridimensional de las formas mutantes debería ser similar a la proteína nativa de gas4p. Si bien es cierto que no se ha comprobado que dichas mutaciones eliminan la actividad enzimática, otros autores han demostrado que la sustitución de E160 y E261 por Leu y Phe, respectivamente, resulta en proteínas sin actividad glucanosil-transferasa *in vitro* en AfGel1p, y que la sustitución de E161 y E262 por residuos de Gln anula la actividad catalítica de ScGas1p sin llegar a afectar la conformación de la proteína (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000b). Por tanto, es muy probable que las formas mutantes gas4p-E157Q y gas4p-E257Q carezcan realmente de actividad β -1,3-glucanosil-transferasa. Teniendo en cuenta ambos razonamientos (mantenimiento de la estructura nativa de la proteína y que similares mutaciones anulan la actividad enzimática en proteínas homólogas), se podría aventurar que gas4p no ejerce un simple papel estructural, es decir, no es un mero sillar en el que apoyar y ensamblar los demás componentes de la pared, sino que es su actividad enzimática lo que la convierte en un elemento indispensable en la maduración de la pared de la espora. Más aún, es muy probable que los pares de residuos E157-E258, E156-E263 y E159-E261 (pertenecientes a gas1p, gas2p y gas5p, respectivamente) sean también los responsables de la actividad catalítica de estas proteínas.

(VII)- 4. Las proteínas *gasp* se localizan en las zonas de crecimiento

Como se ha comentado previamente, los genes *gas*⁺ de *S. pombe* presentan diferencias de expresión en las distintas etapas del ciclo de vida y en las distintas fases del ciclo celular. Estas diferencias en los patrones de expresión sugieren que las proteínas podrían estar desempeñando una función similar, es decir, la transferencia de oligosacáridos entre distintas moléculas de β -1,3-glucanos, en distintas localizaciones y momentos del ciclo biológico de esta levadura. Para analizar si las distintas proteínas presentaban una diferente localización, se construyeron fusiones con la GFP o YFP para su examen *in vivo*. Ya que la región hidrófoba del extremo C-terminal es esencial para la correcta localización de las proteínas GPI y al mismo tiempo es eliminada proteolíticamente durante su procesamiento (Pittet y Conzelmann, 2007), para las proteínas *gas1p*, *gas4p* y *gas5p* se decidió insertar inicialmente la secuencia de la YFP en el extremo amino de las mismas, entre la secuencia señal y el dominio GluTD, con la esperanza de que no interfiriera con la localización y función de las proteínas. En el caso de *gas2p*, la GFP se insertó en el extremo carboxilo, al carecer de señal GPI.

Los datos obtenidos indican que las proteínas de la familia GH72 de *S. pombe* se localizan en la periferia celular, aunque existen diferencias debidas al momento del ciclo de vida en el que cada gen se expresa. Así, *gas1p* y *gas2p* se localizan en la periferia de las células vegetativas asociadas preferentemente a los puntos de crecimiento activo (polos y septo), mientras que *gas4p* se encuentra en la pared de las esporas. Respecto a las proteínas que se producen durante el crecimiento vegetativo, únicamente fue posible de visualizar las proteínas YFP-*gas1p* y *gas2p*-GFP. A pesar de que los transcritos de los genes que las codifican alcanzan sus máximos niveles en diferentes momentos del crecimiento celular, ambas proteínas se localizaban de manera preferente en los polos y en el septo de las células, los lugares en los que tiene lugar la síntesis de la nueva pared celular, si bien también se observaba una señal fluores-

cente más tenue en toda la periferia celular. En el caso de *gas4p*, la proteína de fusión se localizaba en la periferia de las ascosporas, mientras que la señal fluorescente debida a YFP-*gas4p* no pudo ser detectada en células vegetativas. Tampoco se detectó *gas4p* durante el crecimiento vegetativo mediante ensayos de tipo *Western-blot* utilizando anticuerpos específicos anti-*gas4p*, lo que sugiere que esta proteína está ausente durante el crecimiento vegetativo o se encuentra en muy bajas cantidades, por debajo del límite de detección de los anticuerpos. Por tanto, en los tres casos las proteínas se localizan en las zonas de crecimiento activo de la pared celular vegetativa (*gas1p* y *gas2p*) o de la espora (*gas4p*), lo que concuerda perfectamente con un papel en la síntesis y remodelación de esta estructura celular.

Las proteínas *gas1p*, *gas4p* y *gas5p* contienen la señal para la adición de un motivo GPI en el extremo carboxilo, pero carecen del motivo dibásico que es necesario para retener las proteínas GPI en la membrana plasmática (Caro *et al.*, 1997; Friedman y Cormack, 2003). De hecho, recientemente, mediante espectrometría de masas, se han identificado las proteínas *gas1p* y *gas5p* como proteínas asociadas covalentemente a la pared celular (de Groot *et al.*, 2007). Estos autores no fueron capaces de detectar *gas4p* en la pared de células vegetativas, pero esto no es de extrañar, ya que, según se ha demostrado en este trabajo, el gen que la codifica apenas se expresa durante el crecimiento vegetativo y dicha proteína sólo se detecta en los últimos estadios de la esporogénesis (Fig. 29C del Capítulo III y Fig. 48B del Capítulo V). Tampoco detectaron la proteína *gas2p* como una proteína asociada covalentemente a la pared mediante un enlace fosfodiéster del motivo GPI o mediante interacciones sensibles a álcali. Estos resultados indican que *gas2p* es una proteína muy poco abundante en la pared celular (a pesar de que el nivel de expresión del gen es similar al de *gas1*⁺) o, alternativamente, que no se encuentra asociada a otros componentes de la pared celular mediante este tipo de enlaces, confirmando nuestras observaciones. Cabe señalar que existen otras proteínas de pared celular que no están unidas a la misma mediante enlaces covalentes

y que, por tanto, tampoco fueron identificadas en este trabajo, como eng1p o agn1p. Por tanto, todas estas observaciones indican que gas1p y gas5p podrían ser proteínas ancladas a la pared celular, donde quedarían unidas al β -1,6-glucano mediante el motivo GPI, con localización preferente en las zonas de crecimiento activo y que gas4p podría tener un destino equivalente en la pared celular de las ascosporas.

Por otro lado, como ya se ha comentado, la estructura de gas2p no muestra ninguna secuencia canónica para la adición del grupo GPI, aunque tampoco podía descartarse *a priori* que poseyera una señal no canónica para este tipo de anclaje. Sin embargo, el hecho de que la proteína de fusión gas2p-GFP muestre una disposición en la periferia celular similar a la de gas1p, sugiere que esta proteína también se localiza en la pared celular y que realmente carece de cualquier tipo de señal para la adición de un motivo GPI. Cabría preguntarse por qué gas2p presenta una localización similar a gas1p si carece del mencionado anclaje. Una posible respuesta es que se trate de una proteína transmembrana, pero el análisis de su perfil hidrofóbico no revela la existencia de ninguna posible región transmembrana. Otra opción es que se trate de una enzima unida covalentemente a la pared celular mediante enlaces sensibles a álcali (ASL-CWPs). Sin embargo, no fue detectada como tal en el trabajo de de Groot y colaboradores (2007). Una última posibilidad que nos hemos planteado es que gas2p sea capaz de interactuar con los polímeros de pared celular a través del dominio X8. En un intento de comprobar si este dominio era necesario para la interacción con los polisacáridos de la pared celular, se realizaron experimentos de unión con carbohidratos usando la proteína r-gas2p purificada. Sin embargo, no ha sido posible detectar interacción con β -1,3-glucano soluble (laminarina) mediante geles de retardo ni con los polisacáridos insolubles de la pared celular de *S. pombe* mediante ensayos de precipitación (datos no mostrados), de forma similar a lo descrito recientemente para la proteína ScGas1p (Popolo *et al.*, 2008). Por tanto, todos estos resultados parecen indicar que gas2p es una glucanosil-transfe-

rasa que ejerce su función en la pared celular sin estar unida covalentemente a la misma.

En cuanto a la localización de gas5p, no fuimos capaces de observar esta proteína mediante su fusión con YFP, a pesar de que se utilizaron dos construcciones diferentes. En las proteínas GH72 de *S. pombe*, el punto de corte predicho de la secuencia señal y el primer bloque de aminoácidos conservados dentro del dominio GluTD están muy próximos entre sí, separados únicamente por 6-10 aa. Por tanto, en la primera de las construcciones empleadas (YFP-gas5p) la proteína fluorescente podría estar interfiriendo en el correcto plegamiento de la enzima e impidiendo el correcto procesamiento del péptido señal. Por ello, se probó a colocar la secuencia de la YFP en una región distinta. Utilizando el programa *Globplot* (<http://globplot.embl.de/>), que permite predecir los dominios globulares de las proteínas, se eligió una región no globular y de aparente baja complejidad, para evitar que interfiriera con el plegamiento de la proteína. Esta aproximación tampoco permitió la observación de la localización de la proteína. En esta segunda construcción, la YFP estaba insertada dentro de la región rica en serinas, susceptible de O-glicosilación. Se ha postulado que la O-glicosilación es utilizada por la célula como un control del correcto plegamiento de las proteínas de secreción (Fernández *et al.*, 1996; Gemmill y Trimble, 2004). Por tanto, podría ocurrir que la inserción de la YFP en esta zona de gas5p resultara en un patrón de glicosilación anormal, señal que sería interpretada por la célula como un mal plegamiento proteico y la degradaría sin esperar a terminar su maduración. A pesar de la incapacidad para determinar la localización de la proteína *in vivo*, esta proteína ha sido identificada como una proteína unida covalentemente a la pared celular (de Groot *et al.*, 2007), aunque desconocemos si su localización está restringida o no a regiones concretas de la pared celular.

A lo largo del desarrollo experimental de este trabajo, también se realizaron ensayos para comprobar la funcionalidad de las proteínas de fusión. Mientras que YFP-gas1p era capaz de complementar los defectos fenotípicos del mutante gas1 Δ ,

la proteína YFP-gas4p no parecía ser funcional, ya que las ascas portadoras de esta construcción no presentaban la refringencia característica de las esporas silvestres, sino que guardaban mayor similitud con las esporas mutantes. Asimismo, las esporas de esta cepa presentaban defectos de germinación. Este hecho cuestiona la validez de los datos de localización obtenidos para gas4p. Sin embargo, la localización observada concuerda perfectamente con la esperada para una proteína implicada en la síntesis y/o remodelación de la pared celular de la espora, por lo que la incapacidad para complementar el defecto de la maduración de las esporas no puede atribuirse a un defecto en la localización. Al analizar dónde se había insertado la secuencia codificante de la proteína fluorescente, se hizo patente que la separación entre la secuencia señal y el dominio GluTD era también mínima, como en el caso de gas5p. Es más, inmediatamente detrás del punto de corte de la secuencia señal se encuentra un bloque de aminoácidos altamente conservados en todas las proteínas de la familia. Dichas secuencias podrían ser importantes para el correcto plegamiento de la cadena polipeptídica, por lo que la inserción de la YFP en ese punto podría estar interfiriendo con el correcto plegamiento, alejando entre sí los aminoácidos catalíticos (McCarter y Withers, 1994). Alternativamente, la secuencia de la YFP podría estar obstruyendo o bloqueando la interacción entre la proteína y el sustrato, eliminando la actividad catalítica. En ambos casos, al mantener la secuencia señal y la zona hidrofóbica para el anclaje GPI, la proteína podría llegar a su destino correcto, pero carecer de actividad catalítica y biológica.

(VII)- 5. El motivo GPI es necesario para la función biológica

Una cuestión importante que emerge del estudio de la localización de estas proteínas, máxime cuando se ha demostrado que gas2p se localiza en la periferia celular a pesar de carecer del grupo GPI, es la importancia de dicho motivo para la correcta ubicación de las tres proteínas que lo

poseen y para su función biológica. Como se ha indicado en el Capítulo VI, las proteínas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo de *P. pastoris* para ensayar su actividad catalítica. Para conseguir que gas1p, gas4p y gas5p fuesen secretadas al medio de cultivo y facilitar su purificación, las formas recombinantes se expresaron sin el motivo GPI. A pesar de ello, todas presentaron actividad en los ensayos *in vitro*, lo que indica que el motivo GPI no es necesario para la actividad catalítica. Esto mismo ocurre en el caso de la proteína AfGel1p-ΔGPI, que posee la misma actividad β-1,3-glucanosil-transferasa que la proteína nativa (de Medina-Redondo *et al.*, 2008; Mouyna *et al.*, 2000a). Adicionalmente, la proteína r-gas2p también posee actividad enzimática *in vitro*, a pesar de carecer de motivo GPI. Por tanto, el anclaje de la proteína a la pared celular mediante enlaces GPI no es necesario para la actividad enzimática de las proteínas de la familia GH72.

Sin embargo, el anclaje de las proteínas mediante enlace GPI es necesario para su correcta localización y funcionalidad biológica. En una revisión publicada por las Dras. Laura Popolo y Marina Vai (1999), se indica que ScGas1p no necesita del motivo GPI para su actividad catalítica, pero que la forma truncada de la proteína (ScGas1p-ΔGPI) no contacta bien con sus sustratos de la pared celular y es secretada anormalmente al medio de cultivo, donde se acumula. Además, las formas secretadas no rescatan el fenotipo del mutante *Scgas1*, lo que indica que la localización en la superficie celular es imprescindible para su función biológica. De forma similar, el truncamiento la región hidrofoba C-terminal de gas4p provocó defectos en su localización, siendo la proteína incapaz de permanecer asociada a la membrana o la pared de la espora. Además, este defecto en la localización también resultó en la incapacidad para complementar el defecto del mutante *gas4Δ*, lo que sugiere que la actividad β-1,3-glucanosil-transferasa (de la que es responsable gas4p) debe estar correctamente localizada en regiones específicas de la pared de la ascospora para realizar su función biológica (de Medina-Redondo *et al.*, 2008, y este trabajo). No se han realizado ensayos similares para comprobar la importancia del motivo GPI en gas1p y

gas5p, pero cabe suponer que el grupo GPI debe ser también necesario para la correcta ubicación de gas1p y gas5p, y para la función biológica de ambas proteínas.

(VII)- 6. Las proteínas GH72 participan en la síntesis y/o remodelación de la pared celular

La biosíntesis de la pared celular fúngica, su biosíntesis es un proceso complejo que implica numerosos pasos y la participación de distintas actividades enzimáticas. Aunque no se conoce con detalle cómo se produce el ensamblaje de esta estructura, se ha postulado que debe ocurrir en distintos pasos resumidos en la Figura 78 (Mouyna *et al.*, 2000a). Tras la síntesis de las cadenas lineales de β -1,3-glucano por el complejo β -1,3-glucán-sintasa, éstas deben ser enlazadas con el resto de los componentes. En primer lugar, debe producirse la adición de una glucosa mediante un enlace β -1,6 en algunas de las glucosas del polímero lineal. Estas glucosas laterales deben ser posteriormente elongadas mediante la adición de oligosacáridos de β -1,3-glucano, generando el β -1,3-glucano ramificado. Finalmente, los extremos no reductores de las cadenas de β -1,3-glucano (o de las ramificaciones) son usados para formar enlaces con otros componentes de la

pared celular, como el β -1,6-glucano, la quitina o, incluso, proteínas de la pared celular. Este modelo puede ser también extrapolable para la síntesis de la envoltura de las ascosporas, al menos la de las capas internas, cuya composición es similar a la de la pared vegetativa (Egel, 2004).

En *S. pombe*, se ha descrito que los genes *bgs1+*, *bgs3+* y *bgs4+* codifican tres posibles subunidades catalíticas del complejo β -1,3-D-glucán-sintasa, implicadas en la síntesis del β -1,3-glucano durante el crecimiento celular y la citoquinesis. Por su parte, *bgs2+* codifica la cuarta proteína de esta familia en *S. pombe*, responsable de la síntesis del β -1,3-glucano de la pared de las ascosporas (Cortés *et al.*, 2002; Cortés, 2005; Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2000; Martín, 2002; Martín *et al.*, 2003). A pesar de numerosos esfuerzos, hasta la fecha no se ha podido identificar la enzima responsable de la ramificación de las cadenas lineales de β -1,3-glucano. Sin embargo, se ha propuesto que la actividad β -1,3-glucanosil-transferasa de la proteína AfGel1p podría ser la responsable de la elongación de las cadenas laterales, generando el β -1,3-glucano ramificado maduro (Mouyna *et al.*, 2000a). También se ha sugerido que las proteínas Phr de *C. albicans* podrían procesar los β -1,3-glucanos con el fin de generar sitios aceptores disponibles para la unión de β -1,6-glucanos (Fonzi, 1999). En *S. pombe*, existen otras glicosil-hidrolasas que po-

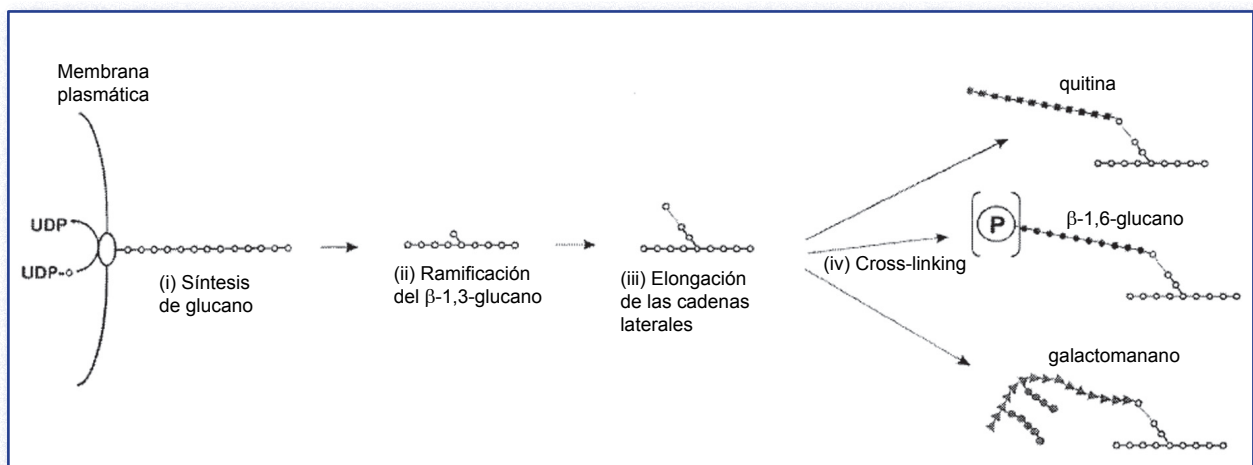


Figura 78. Modelo de la síntesis y modificación del β -1,3-glucano de la pared celular. (i) Biosíntesis de las cadenas lineales de β -1,3-glucano; (ii) ramificación mediante enlaces β -1,6; (iii) elongación de las cadenas laterales; y (iv) establecimiento de enlaces cruzados (cross-linking) con otros polímeros de la pared celular (quitina y galactomanano en *A. fumigatus*; quitina, β -1,6-glucano y proteínas en *S. cerevisiae*) sobre los extremos no reductores de las cadenas laterales del β -1,3-glucano. P, proteínas (adaptado de Mouyna *et al.*, 2000a).

drían también participar en la remodelación de los polímeros de la pared, aunque de momento se desconoce su función. Así, por ejemplo, en nuestro grupo se han identificado tres genes con homología a *ScEXG1* que codifican a proteínas de la familia GH5 (SPBC1105, SPAC12B10.11 y SPBC2D10.05, denominados *exg1⁺*, *exg2⁺* y *exg3⁺*, respectivamente). A diferencia de sus homólogos de *S. cerevisiae*, las proteínas *exg1p* y *exg3p* poseen actividad β -1,6-glucanasa, y *exg1p* actúa con un mecanismo endohidrolítico (E. Dueñas, comunicación personal).

Por tanto, una hipótesis razonable sobre la función biológica de las proteínas GH72 de la levadura de fisión es que estén también implicadas en la elongación de las cadenas laterales de β -1,3-glucanos, sin generar nuevos extremos no reductores, pero haciéndolos más accesibles para el anclaje de otros polisacáridos de la pared celular. La existencia de cadenas laterales de β -1,3-glucano demasiado cortas supondría una menor flexibilidad de las mismas, lo cual dificultaría el entrelazamiento con los demás polisacáridos o proteínas de la pared, ya sea por impedimentos estéricos entre los propios componentes de la pared celular o con las enzimas responsables de establecer los enlaces cruzados entre los mismos. Los datos experimentales recogidos en esta Memoria indican que al menos dos de las proteínas GH72 de *S. pombe* son necesarias para la maduración de la pared celular, bien durante el crecimiento vegetativo, bien durante la esporulación.

En primer lugar, las células *gas1 Δ* no eran capaces de mantener la morfología cilíndrica típica de esta especie. Además, en ausencia de un estabilizador osmótico en el medio de cultivo, muchas de las células mutantes sufrían lisis en el momento de la disolución del septo de división, aunque en algunos casos también se observó lisis en células aisladas. El hecho de que en la mayoría de los casos se produjera durante el proceso de separación celular llevó a pensar que quizás una pared celular más debilitada o incorrectamente ensamblada podría ser más susceptible a la acción de las glucanasas implicadas en separación celular (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Dekker *et al.*, 2004; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003), y por ello la

lisis ocurre mayoritariamente durante la separación. Sin embargo, la delección de la β -glucanasa *eng1p* no suprimía el defecto de lisis del mutante *gas1 Δ* . Respecto a *gas4⁺*, los diploides *gas4 Δ* no son capaces de formar esporas refráctiles o maduras tras incubación en medio de esporulación, aunque completan las divisiones meióticas con normalidad.

En segundo lugar, el estudio ultraestructural de la pared celular de mutantes *gas1 Δ* y de las esporas *gas4 Δ* mostró que la actividad β -1,3-glucanosiltransferasa es esencial en ambos procesos para la correcta síntesis de la pared celular. Durante el crecimiento vegetativo, la ausencia de *gas1p* origina graves defectos, de modo que la capa interna de β -1,3-glucano es amorfa y granular, observándose, además, discontinuidades en la capa externa de galactomananos. En la pared celular de los mutantes *gas2 Δ* , *gas5 Δ* y *gas2 Δ gas5 Δ* no se detectaron diferencias significativas respecto a la cepa silvestre, lo que hace pensar que la contribución de estas enzimas en la síntesis de la pared celular es minoritaria. El examen al microscopio electrónico de las ascas del mutante *gas4 Δ* reveló la formación de cuatro compartimentos dentro de cada asca, aunque la capa externa densa a los electrones de cada ascospora era más delgada y menos definida que en las esporas silvestres. La apariencia de las esporas mutantes es siempre muy similar, indicando que todas ellas se detienen en el mismo estadio de maduración de la pared celular.

En tercer lugar, los experimentos de fraccionamiento en células vegetativas o en esporas indicaron que existían ligeras variaciones en las proporciones relativas de los distintos componentes en los mutantes *gas1 Δ* y *gas4 Δ* . En la pared celular vegetativa de las células *gas1 Δ* se observaba un aumento en la cantidad de radiactividad incorporada en la pared celular con respecto al total. Además, existía una disminución en la fracción de β -1,3-glucano que iba acompañada de un aumento en el contenido de α -glucano y manano. Algo similar se observó en el caso de las esporas *gas4 Δ* , en las que parecía producirse una sutil reducción de β -1,3-glucano que podía verse compensada por un ligero aumento de la fracción

α -glucano + manano (de Medina-Redondo *et al.*, 2008, y este trabajo). No se observaron diferencias en la composición cuantitativa de la pared celular vegetativa entre los mutantes *gas2 Δ* , *gas5 Δ* y *gas2 Δ gas5 Δ* y la estirpe silvestre incubada en las mismas condiciones, indicando que estas enzimas deben desempeñar un papel menos importante en la remodelación de la pared celular. Con anterioridad se han publicado estudios bioquímicos de la composición de la pared celular del mutante *gas1 Δ* de *S. cerevisiae*, que revelaron que, aunque el contenido total de glucano es similar al de la cepa silvestre, cambia su distribución entre las fracciones álcali-soluble y álcali-insoluble y al mismo tiempo tiene lugar un aumento de quitina, lo que refleja diferencias en las conexiones existentes entre los distintos polímeros de la pared celular (Popolo *et al.*, 1997; Valdivieso *et al.*, 2000). En *S. pombe* no es posible subdividir los glucanos en álcali-solubles e insolubles, puesto que la fracción álcali-insoluble corresponde al β -1,3-glucano que está unido a quitina, polímero inexistente en la levadura de fisión (Pérez y Ribas, 2004). Es posible que en esta levadura la ausencia de *gas1p* produzca un defecto en el grado de ramificación o en la longitud de las cadenas laterales del β -1,3-glucano y que el aumento en α -1,3-glucano observado sea una respuesta similar a la del aumento de la quitina en *S. cerevisiae*, reforzando la pared celular para evitar la lisis.

Finalmente, la lisis de las células *gas1 Δ* durante la separación celular se produce incluso en medio con soporte osmótico y el hecho de que las esporas mutantes *gas4 Δ* no sean capaces de generar una descendencia viable, incluso en medio con sorbitol, sugiere que la correcta maduración de la pared celular es necesaria para mantener la viabilidad celular en ambas etapas del ciclo de vida de la levadura de fisión. Esta idea se apoya en el hecho de que las células *gas1 Δ* y las esporas *gas4 Δ* se tiñen con azul de metileno, indicando que la ausencia de estas proteínas resulta en un defecto para mantener la integridad celular y que, en el caso de *gas4p*, la falta de viabilidad de las esporas no es defecto de germinación. Curiosamente, se ha descrito un fenotipo muy parecido al del mutante *gas4 Δ* de la levadura de fisión en

la cepa *gas2 Δ gas4 Δ* de *S. cerevisiae*. Las proteínas ScGas2p y ScGas4p son dos β -1,3-glucanosil-transferasas específicas de esporogénesis implicadas en la maduración de la pared de las ascosporas (Ragni *et al.*, 2007a). La delección de cualquiera de ellos no produce ningún fenotipo, pero el mutante doble *gas2 Δ gas4 Δ* produce esporas con una viabilidad muy reducida, lo que sugiere que ScGas2p y ScGas4p desempeñan funciones redundantes en el ensamblaje de la pared de la spora. En la levadura de fisión no existe tal redundancia, ya que esta función está desempeñada por una única proteína, *gas4p*. Sin embargo, estas proteínas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* son verdaderos homólogos funcionales ya que *gas4p* es capaz de complementar parcialmente los defectos de esporulación del mutante *gas2 Δ gas4 Δ* de *S. cerevisiae*.

Otra observación interesante es que los fenotipos de los mutantes *gas1 Δ* y *gas4 Δ* son similares a los descritos para los mutantes que carecen de *bgs4⁺* y *bgs2⁺*, respectivamente, que codifican subunidades catalíticas de la β -glucán-sintasa responsable de la síntesis del septo secundario y de la pared celular de las esporas (Cortés, 2005; Cortés *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2000). Estos datos indican, pues, que no sólo la síntesis de cadenas lineales de β -1,3-glucano dependiente de *bgs2p* y *bgs4p*, sino también la maduración de las mismas por parte de las proteínas *gasp* mediante su correcto anclaje y unión a otras cadenas preexistentes es esencial para la adecuada formación de la pared celular y/o de la spora y el mantenimiento de la viabilidad de las células vegetativas y de las ascosporas.

(VII)- 7. Una estructura común, diferentes funciones in vivo

Como se ha visto a lo largo de toda esta Memoria, las proteínas de la familia GH72 de *S. pombe* poseen una estructura muy similar, pero tienen distinto significado y/o importancia biológica. Estas diferencias en la función biológica pueden conseguirse mediante la expresión en momentos distintos del ciclo celular de proteínas con idéntica

actividad catalítica, mediante ligeras variaciones en el mecanismo de acción y/o diferencias en la localización de las enzimas.

Las dos proteínas cuya ausencia genera los fenotipos más severos, gas1p y gas4p, catalizan la misma reacción enzimática, transfiriendo un oligosacárido de 6-7 unidades de glucosa entre cadenas de β -1,3-glucano. Por tanto, parece que la transferencia de oligosacáridos de tamaño medio es crucial para mantener la integridad de la pared celular. Sin embargo, estas dos actividades enzimáticas no son redundantes, ya que se sintetizan en momentos muy distintos del ciclo biológico. Además, las proteínas gas1p y gas4p se diferencian en que la primera posee un dominio X8 seguido de una región rica en serinas, mientras que la última presenta únicamente una corta región *Ser-rich*. Estas regiones suelen estar altamente O-glicosiladas, por lo que generalmente la proteína adopta una conformación lineal, en forma de bastón, alejando el extremo por el cual se anclan a la membrana o a la pared celular del extremo portador del dominio catalítico (Stratford, 1994). Por tanto, se puede especular que la diferente longitud de la región *Ser-rich* en gas1p y gas4p podría resultar en que sus dominios catalíticos se encontraran en distintas posiciones de la pared, más cerca de la membrana en el caso de gas4p. De hecho, una diferencia importante es que la pared de la espora se ensambla *de novo* en el interior de la membrana de la forespora mientras que el crecimiento vegetativo implica la extensión de la pared preexistente, por lo que la actividad β -1,3-glucanosil-transferasa podría ser necesaria en distintas posiciones espaciales. Cabe preguntarse si, ya que estas dos proteínas catalizan la misma

actividad *in vitro*, serían capaces de complementar la ausencia de la otra. Una respuesta afirmativa significaría que los dominios X8 y *Ser-rich* no son necesarios para la función biológica de gas1p. En la actualidad, estamos realizando ensayos que nos permitan arrojar luz en este punto.

Un ejemplo de dos proteínas homólogas que se expresan en el mismo momento del ciclo vegetativo y que presumiblemente se localizan en las mismas estructuras celulares lo constituyen gas1p y gas5p. Sin embargo, estas dos proteínas transfieren cadenas de glucanos de diferente longitud, únicamente 4 monómeros de glucosa en el caso de gas5p. Este hecho podría suponer una modificación más fina de la longitud de las cadenas laterales del β -1,3-glucano. Además, parece que la velocidad con la que actúa esta enzima es menor (resultados no mostrados). Ambas observaciones podrían explicar por qué gas5p, a pesar de expresarse simultáneamente con gas1p, no es capaz de complementar los defectos de una cepa *gas1* Δ .

En el caso de gas2p, se combinan la expresión en momentos diferentes del ciclo celular y la introducción de ligeras variaciones en la actividad catalítica respecto de gas1p, aunque ambas proteínas se localizan en zonas similares de la pared celular. Hasta el momento no se habían descrito enzimas de la familia GH72 que utilizaran como sustratos preferentes cadenas de 19 glucosas unidas por enlaces β -1,3, transfiriendo oligosacáridos de 11 monómeros. Este detalle, junto con la falta de un motivo GPI en esta proteína, la convierte en un miembro peculiar de la familia GH72, a pesar de que su ausencia no genera defectos aparentes.

(VIII)- CONCLUSIONES

(VIII)- CONCLUSIONES

1) *Schizosaccharomyces pombe* posee en su genoma cuatro fases de lectura (ORFs SPAC19B12.02c, SPBC29A10.08, SPBC342.03 y SPAC11E3.13c) que codifican proteínas homólogas a los miembros de la familia 72 de las glicosil-hidrolasas. Dichas ORFs han recibido el nombre de *gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ y *gas5*⁺, respectivamente, y su expresión oscila periódicamente a lo largo del ciclo mitótico y/o durante el proceso de esporogénesis. Los productos de *gas1*⁺, *gas2*⁺ y *gas5*⁺ ejercen su función biológica durante el ciclo vegetativo, mientras que la proteína codificada por *gas4*⁺ actúa al final de la esporulación.

2) Las cuatro proteínas gasp poseen actividad β -1,3-glucanosil-transferasa *in vitro*, presentando un mecanismo de acción similar al de otros miembros de la familia GH72 y con un sitio activo que reconoce al menos 9 glucosas unidas mediante enlaces β -1,3. Sin embargo, el enlace hidrolizado preferentemente es distinto para cada una de estas enzimas.

3) Mediante análisis bioinformáticos se han identificado dos secuencias cortas de aminoácidos –FF(A/S)GNE*V y F(F/L)SE*(Y/F)GCN- localizadas dentro del dominio GluTD en las que se encuentran los ácidos glutámicos responsables, presumiblemente, de la actividad catalítica (señalados con asteriscos). Se ha demostrado que dichos aminoácidos son claves para la función biológica *in vivo* de *gas4p*, por lo que potencialmente también lo son para las otras tres proteínas tipo Gas1.

4) Las proteínas gasp se localizan en la periferia celular: *gas1p* y *gas2p* se distribuyen preferentemente por los polos y los septos celulares, mientras que *gas4p* se localiza en la pared de las ascosporas. La proteína *gas5p* también se encuentra en la pared celular, aunque se desconoce su localización exacta. El motivo GPI es necesario para la correcta localización de *gas4p* y, muy posiblemente, para la de *gas1p* y *gas5p*.

5) Los genes *gas1*⁺ y *gas4*⁺ son responsables de las dos actividades β -1,3-glucanosil-transferasas más importantes en *S. pombe*. Más concretamente, *gas4p* es imprescindible tras la meiosis, actuando principalmente durante la maduración de las ascosporas y siendo responsable de la viabilidad de las mismas. Por su parte, la función biológica de *gas1p* es imprescindible para la integridad celular durante el crecimiento vegetativo. Las proteínas *gas2p* y *gas5p* no parecen necesarias para *S. pombe* y podrían estar realizando funciones minoritarias o secundarias en el ensamblaje de la pared celular.

6) La proteína *gas1p* es la única proteína GH72 esencial para el mantenimiento de la integridad celular durante la síntesis/remodelación de la pared celular en la citoquinesis y el crecimiento polarizado. La lisis en el septo en los mutantes *gas1* Δ se produce después de completar la síntesis del mismo y los primeros estadios de la separación celular, lo que sugiere que *gas1p* es esencial para una correcta síntesis de la pared celular en esta región. Sin embargo, la función de *gas1p* no es la de evitar un exceso de degradación por parte de enzimas hidrolíticas como *eng1p*.

7) Las proteínas gasp están implicadas en la remodelación cualitativa de la pared celular, ya que su ausencia o presencia no afecta significativamente a las proporciones globales con las que los carbohidratos contribuyen en la formación de la pared celular. Sin embargo, la ultraestructura de la misma sí se ve afectada en ausencia de dichas proteínas.

(IX)- MATERIALES Y MÉTODOS

(IX)- MATERIALES Y MÉTODOS

(IX)- 1. Microorganismos utilizados

El presente trabajo se ha desarrollado utilizando distintas estirpes de *Escherichia coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las características genéticas de todos estos organismos, así como su procedencia se recogen en la Tabla 6.

La mayor parte de este trabajo se ha llevado a cabo empleando la levadura de fisión *S. pombe* como modelo de estudio de los procesos de división celular, morfogénesis y esporulación.

La bacteria *E. coli* se ha empleado en los trabajos rutinarios de clonación molecular. La estirpe DH5 α se utilizó como hospedador habitual de los plásmidos empleados. Además, se empleó la levadura de gemación *S. cerevisiae* para la creación de algunos plásmidos, aprovechando la capacidad de recombinar regiones homólogas de ADN (ya sea en plásmidos o en sus propios cromosomas) de dicho organismo. Asimismo, se utilizó para es-

Tabla 6. Estirpes de microorganismos utilizadas en este trabajo. En el apartado "Genotipo" se indica en negrita y entre paréntesis, cuando es necesario, las cepas parentales utilizadas para construir los diploides.

ESTIRPE	GENOTIPO	PROCEDENCIA
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
h20	<i>h⁻ leu1-32</i>	Stock del laboratorio
h116	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6-M216</i>	Stock del laboratorio
h54	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6-M210</i>	Stock del laboratorio
S964	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32</i>	S. Moreno
S1111	<i>h⁻ pat1-114 ade6M210 leu1-32</i>	S. Moreno
S1112	<i>h⁻ pat1-114 ade6M216 leu1-32</i>	S. Moreno
OL537	<i>h⁻ leu1-32 ura4-Δ18 eng1Δ::URA4</i>	Stock del laboratorio
OL538	<i>h⁻ leu1-32 ura4-Δ18 eng1Δ::URA4</i>	Stock del laboratorio
OL599	<i>h⁻ ura4-Δ18 agn1Δ::URA4</i>	Stock del laboratorio
YMMR16	<i>h⁻ leu1-32 gas2Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR17	<i>h⁻ leu 1.32 gas4Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR18	<i>h⁻ leu 1.32 gas5Δ-1::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR25	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 gas4Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR30	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas4Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR32	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR34	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas2Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR37	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4 + pMMR18</i>	Este trabajo
YMMR40	<i>h⁻ leu1.32 gas2Δ::kanMX4 gas5Δ::kanMX4 (YMMR16 x YMMR32)</i>	Este trabajo
YMMR41	<i>h⁻ leu1.32 ade6M216 gas2Δ::kanMX4 gas5Δ::kanMX4 (YMMR16 x YMMR32)</i>	Este trabajo
YMMR44	<i>h⁺/h⁻ leu1.32/leu1.32 ura4-Δ18 / ura4-Δ18 ade6M120/ade6M216 + pMMR19</i>	Este trabajo
YMMR78	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 gas4Δ::kanMX4 + pAL-KS</i>	Este trabajo
YMMR79	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 gas4Δ::kanMX4 + pMMR14</i>	Este trabajo
YMMR80	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 gas4Δ::kanMX4 + pMMR19</i>	Este trabajo
YMMR81	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 gas4Δ::kanMX4 + pMMR26</i>	Este trabajo
YMMR82	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4 + pAL-KS</i>	Este trabajo
YMMR83	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4 + pMMR14</i>	Este trabajo
YMMR84	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4 + pMMR19</i>	Este trabajo
YMMR85	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4 + pMMR26</i>	Este trabajo

YMMR86	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 gas4Δ::kanMX4 + pMMR29</i>	Este trabajo
YMMR87	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 gas4Δ::kanMX4 + pMMR30</i>	Este trabajo
YMMR88	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4 + pMMR29</i>	Este trabajo
YMMR89	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 gas5Δ::kanMX4 + pMMR30</i>	Este trabajo
YMMR104	<i>h⁺/h⁻ leu1.32/leu1.32 ura4-Δ18 / ura4-Δ18 ade6-M120/ade6-M216 gas1Δ::kanMX4/gas1⁺</i>	Este trabajo
YMMR105	<i>h⁻ leu1-32 gas2-GFP</i>	Este trabajo
YMMR106	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade gas1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
YMMR107	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M210 + pMMR27</i>	Este trabajo
YMMR108	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade6M216 + pMMR27</i>	Este trabajo
YMMR115	<i>h⁺ leu1.32 ura4-Δ18 ade eng2Δ::URA4 gas4Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
YMMR116	<i>h⁻ leu1.32 ura4-Δ18 ade eng2Δ::URA4 gas4Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
YMMR117	<i>h⁻ pat1-114 ade6-M210 leu1-32 ura4-Δ18 gas4Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
YMMR118	<i>h⁻ pat1-114 ade6-M216 leu1-32 ura4-Δ18 gas4Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
YMMR119	<i>eng1Δ::URA4 gas1Δ::KanMX4 (YMMR106 x OL538)</i>	Este trabajo
YMMR120	<i>agn1Δ::URA4 gas1Δ::KanMX4 (YMMR106 x OL599)</i>	Este trabajo
YMMR122	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 ade6M210/ade6M216 leu1-32/leu1-32 gas4Δ::KanMX4/ gas4Δ::KanMX4 (YMMR117 x YMMR118)</i>	Este trabajo
YMMR123	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 ade6M210/ade6M216 leu1-32/leu1-32 gas4Δ::KanMX4/ gas4Δ::KanMX4 + pMMR26</i>	Este trabajo

S. cerevisiae

AN120	<i>MATa/MATα arg4/ARG4 his3/his3 ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 rme1::LEU2/RME trp1/trp1 ura3/ura3</i>	Stock del laboratorio
ER309	<i>MATa/MATα arg4/ARG4 gas2Δ::HIS3/gas2Δ::HIS3 gas4Δ::KanMX4/ gas4Δ::KanMX4 ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 rme1::LEU2/RME trp1/trp1 ura3/ura3</i>	E. Ragni
YMMR127	AN120 + pRS424-P _{SPO20}	Este trabajo
YMMR128	ER309 + pRS424-P _{SPO20}	Este trabajo
YMMR129	ER309 + pMMR38	Este trabajo

Pichia pastoris

KM71H	Arg4	Stock del laboratorio
YMMR53	KM71H + pPICZαA integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR54	KM71H + pPICZαB integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR55	KM71H + pMMR21 (gas2- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR57	KM71H + pMMR23 (gas4- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR58	KM71H + pMMR24 (gas5- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR62	KM71H + pMMR22 (gas1- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR77	KM71H + pMMR21 (gas2- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR110	KM71H + pMMR34 (gas2-Δ9- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR124	KM71H + pMMR35 (6xHis-gas2p-Δ9- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo
YMMR125	KM71H + pMMR36 (gas2p-Δ9-ES- <i>c-myc</i> -(His) ₆) integrado en cromosoma	Este trabajo

Escherichia coli

DH5α	<i>supE44 ΔlacU 169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA 1</i>	F. del Rey
------	--	------------

tudios de complementación heteróloga de la proteína gas4p.

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%.

(IX)- 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 100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 1,2 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.

(IX)- 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 A.

(IX)- 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, 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 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 $\text{D.O.}_{595} = 1$ equivale a 2×10^7 células/mL, para el caso de la levadura de fisión.

(IX)- 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 *cdc25+*. La cepa *cdc25-22* es capaz de crecer a temperatura permisiva (25°C), pero a temperatura restrictiva (37°C) detiene su ciclo celular en la fase G2 (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 temprana ($\text{D.O.}_{595} = 0,5$), momento en el que se transfirió a temperatura restrictiva durante 4 horas para bloquear las células en G2. Posteriormente, los cultivos fueron incubados de nuevo a la temperatura permisiva, recogiendo muestras a los intervalos de tiempo deseados tras la liberación.

(IX)- 2.1.3. Conjugación y esporulación de *S. pombe*

Tanto para la construcción de mutantes dobles como para el estudio de la función de la proteína *gas4p* durante el proceso de esporulación, 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 YEPD o SPA 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*), seleccionado 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 una dilución 1/100 de la mezcla anterior en placas de medio rico; una vez germinadas las ascosporas, se analizaron por réplica en medios selectivos.

(IX)- 2.1.4. Aislamiento de estirpes diploides

Para la obtención de células diploides a partir de estirpes de tipo sexual opuesto, se realizaron cruces entre haploides h^+ y h^- con requerimientos nutricionales complementarios (como los alelos *ade6-M210* o *ade6-M216*, que permiten la selección de diploides en medios carentes de adenina por complementación intragénica). Tras 12-16 horas de incubación, se extendía la mezcla de células en placas de medio mínimo con los suplementos adecuados, de modo que sólo las células diploides fueran capaces de crecer.

Puesto que en *S. pombe* los diploides son inestables y esporulan al alcanzar la fase estacionaria en medio mínimo, tan pronto como aparecían las

colonias en las placas, éstas eran transferidas a placas de medio rico (YES). Los diploides así aislados se mantenían en YES con objeto de inhibir su esporulación, reestriéndolos en medio fresco frecuentemente. Adicionalmente, antes de realizar cualquier experimento con ellos, se volvía a comprobar su genotipo mediante réplicas en placas de medio mínimo o en medio YES suplementado con floxina B (*Sigma*) (las colonias diploides incorporan mayor cantidad de esta molécula coloreada, mientras que las haploides quedan de color claro), así como su capacidad de esporular para evitar la selección de diploides estériles.

En algunos casos, la construcción de estirpes diploides se realizó a partir de estirpes haploides homocigóticas para el tipo sexual (h/h^-), mediante la fusión de protoplastos (Sipiczki y Ferenczy, 1977). Dicho método fuerza la fusión citoplásmica y nuclear de células que, en condiciones normales, no podrían hacerlo. En este proceso, la pared celular se degrada enzimáticamente y, a continuación, se induce la fusión celular por adición de polietilenglicol (PEG). Las células se vuelven muy sensibles osmóticamente, por lo que es necesario emplear un estabilizador osmótico (como KCl o sorbitol) en los medios de cultivo. Los diploides generados se seleccionan mediante la complementación de marcadores auxotróficos que llevan cada una de las cepas parentales.

(IX)- 2.1.5. Sincronización del proceso de meiosis-esporulación de *S. pombe*

Para inducir la sincronía de la esporulación, se utilizaron cepas portadoras de la mutación termosensible *pat1-114*. La proteína kinasa *pat1p* es necesaria para inhibir la meiosis en células diploides (Beach *et al.*, 1985; McLeod y Beach, 1988). Cuando un mutante diploide homocigótico *h/h pat1-114/pat1-114* es incubado a 25°C en un medio pobre en nitrógeno, las células quedan detenidas en la fase G0 o quiescente del ciclo celular. La inactivación de la kinasa *pat1p* por incubación a temperatura restrictiva (37°C) permite la inducción sincrónica de la meiosis.

Para ello, las cepas diploides con la mutación *pat1-114* fueron incubadas en medio mínimo a 25°C (con los suplementos adecuados en caso

necesario) hasta alcanzar el volumen de cultivo y la densidad óptica deseada. A continuación, se recogieron las células por centrifugación y se lavaron tres veces con agua estéril antes de resuspenderlas en medio mínimo sin nitrógeno (MM-N) a una D.O.

= 0,3. En todos los casos, el volumen del matraz era diez veces superior al volumen del medio que contenía. Los cultivos se incubaron a 25°C durante 15 horas, para bloquear las células en G0 y a continuación se transfirieron a 37°C (tiempo 0), añadiendo NH₄Cl a una concentración final de 0,5 g/L y, en caso de que fuera necesario, leucina a concentración final de 50 µg/mL (Blanco *et al.*, 2001), procediéndose a la recogida de muestras a los intervalos deseados.

(IX)- 2.2. Crecimiento de *S. cerevisiae*

El crecimiento de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en placas de medio sólido o en matraces con medio líquido que se incubaron a 28°C. El crecimiento en medio líquido se determinó midiendo la turbidez del medio de cultivo por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro. En este caso, una D.O.₆₀₀ = 1 equivale a 1x10⁷ células/mL. La composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de la levadura de gemación se encuentra recogida en el Anexo A.

(IX)- 2.2.1. Inducción de la esporulación en *S. cerevisiae*

Para inducir la esporulación eficiente y sincrónica de las estirpes diploides, las células crecían vegetativamente hasta saturación en el medio adecuado, aproximadamente durante 16-24 h a 30° C y, posteriormente, eran diluidas en medio de pre-esporulación (YPAcetato), el cual permitía la adaptación de las células al metabolismo respiratorio requerido durante la esporulación. Se inoculaban células a D.O.₆₀₀ = 0,3 y se incubaban a 30° C en agitación fuerte (250 rpm), teniendo en cuenta que el matraz utilizado debía tener un volumen 10 veces mayor al volumen del cultivo. Tras 13-16 horas de crecimiento en medio YPA, las células eran recogidas por centrifugación y se lavaban dos veces con agua y una con medio

de esporulación para eliminar cualquier resto de fuente carbonada. Finalmente, se inoculaban en medio de esporulación (AcK 2%) a una concentración de 3·10⁷ células/mL y se incubaban a 30° C con agitación fuerte (250 rpm). Este método se basa en la descripción realizada por Fast (1973).

(IX)- 2.3. Crecimiento de *P. pastoris*

El crecimiento de la levadura *P. pastoris* se realizó a 28°C en los medios y condiciones descritos por el fabricante según el protocolo *EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen)*. De modo breve, las cepas de *P. pastoris* fueron inoculadas en medio YEPD, cuando se pretendió aumentar el número de células. La selección de los transformantes se hizo suplementando las placas de YEPD con Zeocina™ a una concentración final de 100 µg/mL. Para inducir la expresión de proteínas heterólogas cuyas secuencias codificantes habían sido colocadas bajo el promotor inducible AOX1, se utilizó, primero, medio líquido BMGY para desreprimir dicho promotor y, posteriormente, medio BMMY, para inducir la expresión. La composición de dichos medios está igualmente recogida en el Anexo A.

(IX)- 2.4. 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 (100 µg/mL) o Zeocina™ (25 µg/mL).

(IX)- 3. Procedimientos generales de clonación molecular

(IX)- 3.1. Vectores utilizados

Los vectores de clonación de *E. coli*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* y *P. pastoris* utilizados en el presente trabajo se indican en la Tabla 7.

(IX)- 3.1.1. Vectores de *E. coli*

Los vectores de clonación de la bacteria *E. coli* son auto-replicativos y constan de un origen de replicación bacteriano y de un marcador de selección, que frecuentemente es un gen de resistencia a antibiótico. Además, portan un pequeño fragmento que proporciona sitios únicos de reconocimiento para endonucleasas (sitio de clonación múltiple o *polylinker*).

En este trabajo experimental se empleó el plásmido *pBluescript II KS⁺* (*Stratagene*). Se trata de un plásmido autoreplicativo con un tamaño de 2.985 pb y en cuya secuencia se encuentran los siguientes elementos:

- Origen de replicación relajada *colE1* (*ori*).
- Gen de resistencia a ampicilina (Amp).
- Fragmento del operón lactosa de *E. coli* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa (*LacZ*).
- Sitio de clonación múltiple (*polylinker*) con 21 sitios de restricción reconocidos por endonucleasas específicas, insertados en la fase de lectura del péptido α sin alterarla.
- Promotores de las ARN polimerasas T3 y T7, que flanquean el fragmento de ADN portador del sitio de clonación múltiple y que pueden utilizarse para la síntesis de ARN *in vitro*.
- Un fragmento de la región intergénica del fago f1 (f1 IG) que codifica las funciones requeridas para la replicación y el empaquetamiento, y que hace posible que estos vectores puedan recuperarse como ADN monocatenario una vez infectada una población de células adecuada portadora de alguno de estos plásmidos con el fago modificado M13K07.

(IX)- 3.1.2. 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 empleó en repetidas ocasiones a la utilización del vector *pAL-KS⁺*. Fue construido por el Dr. J. Ishiguro (Konan University, Japón) a partir del vector *pBluescript II KS⁺* (*Stratagene*), al que se le añadió el marcador *LEU2* 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* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *leu1-32* de *S. pombe*.

(IX)- 3.1.3. Vectores de *S. cerevisiae*

De forma similar a lo descrito anteriormente para los vectores de *S. pombe*, los vectores de clonación para la levadura de gemación constan básicamente de un origen de replicación, un marcador de selección en bacterias y un gen de selección en levaduras. En el caso del vector *pRS424* empleado en este trabajo, perteneciente a la serie *pRS* (Christianson *et al.*, 1992), se trata de un plásmido multicopia que lleva el gen *TRP1* como marcador de selección.

(IX)- 3.1.4. Vectores de *P. pastoris*

Los vectores *pPICZ α A* y *pPICZ α B* empleados en este trabajo se caracterizan por permitir la secreción al medio de cultivo de la proteína cuya fase codificante se ha clonado en ellos. Se diferencian en la fase de lectura usada y en algunos sitios de restricción. Ambos comparten las siguientes características comunes:

- Promotor del gen *AOX1*: fragmento de 942 pb que contiene el promotor *AOX1* que permite la expresión inducida por metanol.

- Secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*: dirige la proteína que se está expresando a la ruta de secreción.

- Sitio de clonación múltiple que contiene 10 sitios de restricción únicos para la inserción del gen de interés en el vector.

- Epítipo *c-myc* en el extremo carboxilo: Para la detección de la proteína de fusión con el anticuerpo anti-*myc*.

- Secuencia de poli-histidinas (6XHis) en el extremo carboxilo: Permite la purificación de la proteína de fusión recombinante mediante cromatografía de afinidad. Además, esta secuencia es al epítipo reconocido por el anticuerpo anti-His.

- Terminador de la transcripción del gen *AOX1* (TT): Terminador de transcripción y señal de poliadenilación del gen *AOX1* (341 pb), que permite el correcto procesamiento en 3' del ARNm, incluyendo la poliadenilación, que aumenta la estabilidad del mensajero.

- Promotor del gen *TEF1*: El promotor del gen del factor 1 de elongación de la traducción de *S. cerevisiae* controla la expresión del gen *Strep-toalloteichus hindustanus ble* en *Pichia sp*, lo que confiere resistencia al antibiótico Zeocina™.

- EM7 (promotor procariota sintético): Promotor constitutivo que permite la expresión del gen *Sh ble* en *E. coli*, confiriendo resistencia al antibiótico Zeocina™.

- Región terminadora de la transcripción del gen *CYC1*: Extremo 3' del gen *CYC1* de *S. cerevisiae*, que permite el procesamiento eficiente del extremo 3' del ARNm del gen *Sh ble*.

- Origen de replicación pUC: Para la replicación y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

- *SacI*, *PmeI* *BstXI*: Sitios de restricción únicos presentes en la secuencia del promotor del gen *AOX1*, que permiten la linearización del plásmido para dirigir su integración en este locus genómico.

- Ausencia de origen de replicación en levaduras: Los transformantes resistentes a Zeocina™ sólo pueden ser aislados si ha ocurrido un evento de recombinación entre el plásmido y el genoma de *P. pastoris*.

Tabla 7. Vectores de clonación utilizados en este trabajo

VECTOR	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
<i>Escherichia coli</i>		
Bluescript ⁺	<i>Amp^R lacZ ColE1 f1</i>	Stratagene
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
pAL-KS	<i>LEU2, ars1⁺, ori, f1, Amp^R</i>	J. Ishiguro
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
pRS424-P _{SPO20}	2 μ , <i>Amp^R, ori, f1</i> TRIP1. Región -731 a -1 que contiene el promotor del gen <i>SPO20</i> (P _{SPO20})	(Christianson <i>et al.</i> , 1992)
<i>Pichia pastoris</i>		
pPICZ α A	Promotor <i>AOX1</i> , péptido señal del factor α de <i>S. cerevisiae</i> , 6-His, epítipo <i>myc</i> , Zeocina ^R	Invitrogen
pPICZ α B	Promotor <i>AOX1</i> , péptido señal del factor α de <i>S. cerevisiae</i> , 6-His, epítipo <i>myc</i> , Zeocina ^R	Invitrogen

(IX)- 3.2. Obtención de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* de manera rápida y a pequeña escala (mini-preps o minipreparaciones), se empleó el método de ebullición de las muestras en presencia de lisozima (Holmes y Quigley, 1981). En los casos en los que era necesaria una concentración mayor de ADN 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 ADN plasmídico y/o genómico de las levaduras de gemación y fisión, se realizó según los protocolos descritos por Moreno *et al.* (1991). La valoración de la concentración de ADN en las muestras se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260 nm y teniendo en cuenta que la relación absorbancia a 260 nm/280 nm para estimar el grado de pureza de las mismas. Así, la concentración se calculó sabiendo que $A_{260} = 1$ indica una concentración de ADN de 50 µg/mL en solución acuosa.

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador *Minicycler™ (MJ Research)* y diferentes polimerasas: *Expand*

High Fidelity (Roche), *VentR® DNA Polymerase (New England Biolabs®)* o *Biotools DNA polimerasa (Biotools)*. La reacción se efectuó siguiendo las instrucciones de la casa comercial en cada caso. Por lo general, se desnaturalizaba el ADN molde por incubación a 94°C durante 8 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 ADN a amplificar, para permitir la síntesis de las cadenas de ADN. Al finalizar el último ciclo, se realizaba una etapa de extensión adicional a 72°C durante 10 minutos.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo están recogidos en la Tabla 8.

Para obtener una población de moléculas de *gas1+* conteniendo mutaciones al azar, se realizó una PCR degenerada sobre este gen, según se describieron Cadwell y Joyce (1992). Para introducir errores en el proceso de amplificación, se añadió una mezcla no equimolecular de los distintos deoxinucleótidos (dNTPs), que contenía dCTP/dTTP en una concentración 10 veces superior a la de dGTP/dATP y se utilizó la enzima *Biotools* con el tampón suministrado por el fabricante.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	PROPÓSITO
911	TATTGCCAGCATTGCTGC	Comprobar construcción en plásmidos pPICαZ
912	GCAAATGGCATTCTGACATCC	
998	CTTCCACTGGTGAGCGTGTCTT	Preparación sonda <i>gas2+</i>
999	ACCATGATCCTGAGTGTAAGCGTT	
1000	ACTTCTCTTCCCCCTACTCCTTCA	Preparación sonda <i>gas1+</i>
1001	AGCACCGCTGCTGCTCTTAG	
1002	CAAAGATGACGAGCGTAGAGTGT	Preparación sonda <i>gas4+</i>
1003	AGCTGAGGGTAGCGATAAGGAC	
1004	TGCTAACTATACTGGAGACGGTGATT	Preparación sonda <i>gas5+</i>
1005	AAGCGAGAAAGGTTAAAAGTAGAAGC	
1025	TAAAGCGGCCGCTCATTTCGTCATACTGTATTACGTTGG	Delección de <i>gas2+</i>
1026	GGGGATCCGTCGACCTGCAGCGTACGTAAATTTGGTAAAG GAGACCATG	
1027	AACGAGCTCGAATTCATCGATGATTGTTGGTGAGCTTAAGG CATAATTTCC	
1028	TAAAAGTAGTATTTCGCTGATTGAATGTCCATATAAG	

1029	TAAATCTAGAGTCCCAATCCCCCTTCTGCATTCA	Delección de <i>gas1</i> ⁺
1030	GGGGATCCGTCGACCTGCAGCGTACGGCCAAAGATAGAAT ACTGAACTTCA	
1031	AACGAGCTCGAATTCATCGATGATCCTCTCCGTTGTTATCG GTGGCAC	
1032	TAAACTCGAGGAAACGAAGCACCCCATACTTGTG	
1035	ACATCTCGTTATCCCTGACATCAC	Comprobación delección <i>gas2</i> ⁺
1036	ATATCTCTACCGCCAGTACCTTC	
1037	TCAAGCTTGCTTCTTACATTGCAT	Comprobación delección <i>gas1</i> ⁺
1038	GATTTGCTCTTATGCTGCAAAAGG	
1039	AAGACTGATTCATCGGCTGGTGTG	Comprobación delección <i>gas4</i> ⁺
1040	GGGTAGTATGATAGCTTCGAGG	
1041	CACAGTTGCTGTTGCTTGTCTC	Comprobación delección <i>gas5</i> ⁺
1042	ACGAAGTTTTGGCGTTAGATTG	
1043	TAAATCTAGATTTCTGTTTAGATGAGGATACTAAGA	Delección de <i>gas4</i> ⁺
1044	GGGGATCCGTCGACCTGCAGCGTACTAGCAACACCCATGT TGCAATATAAT	
1045	AACGAGCTCGAATTCATCGATGATGTCCTTATCGCTACCCT CAGCTTCT	
1046	TAAACTCGAGAATGTTATGTAAATGATACCTTACTACG	
1047	TAAATCTAGAACCGCTACCATATATAGTGGGATAGC	Delección de <i>gas5</i> ⁺
1048	GGGGATCCGTCGACCTGCAGCGTACGAGGAAGTTCATAGC AGATATAGGTTT	
1049	AACGAGCTCGAATTCATCGATGATGGTATACTGGCAATTAG CGGACTTG	
1050	TAAACTCGAGCGAATATATCAATAATGAACTTGAGAAG	
1076	GGATCCTCAAGCTTGCTTCTTACATTGCAT	Clonación de <i>gas1</i> ⁺
1140	ccagtgaaaagtcttctccttactgttaattaaAGGAGAACTGAGGCTTTA GCGAGGC	Construcción de YFP- <i>gas1</i> ⁺
1141	gggattacacatggcatggatgaactatacaaaGTTACGTTGATGGTCGT TACTTT	
1142	AGTAGGATCAGAGCTTGAAATGGC	
1143	ccagtgaaaagtcttctccttactgttaattaaTGATGTGTTTGTGCTGTA GCTTTTA	Construcción de YFP- <i>gas4</i> ⁺
1144	gggattacacatggcatggatgaactatacaaaATAGTGATTAAGGAAAT GCCTTTTTT	
1145	ACACTTGTCATGGTCGGCTGAATT	
1146	GAAAACGGTCGACTTGTATTG	Comprobar fase de lectura de YFP- <i>gas1</i> ⁺
1147	CAACAGTCCAAGTAGGATCAG	
1148	GTTTACGTTTATCTCAGGTTGCTA	Comprobar fase de lectura de YFP- <i>gas4</i> ⁺
1149	AACTGAAAGTATCGATCCATTCAT	Construcción de YFP- <i>gas5</i> ⁺
1150	ccagtgaaaagtcttctccttactgttaattaaAGCGGAAGAGGCAGAGTC AGCCAAGG	
1151	gggattacacatggcatggatgaactatacaaaATCAAATCAAGGGAAAC GCCTTTTTT	
1152	TAGTTCTTGAAAGCATCGATGGTAG	
1257	GAAGCTGAATTCTATTTTCGAGCCTTTGACTATCAAGGGT	Construcción pMMR21 <i>P_{Aox1-r-gas2}</i> ⁺
1258	TTGTTCTAGAATTGCCTTAAGCTCACCAACACCACC	
1259	GAAGCTGAATTCTCAGTTTCTCTTGTTCCAGTTGATGGT	Construcción pMMR22 <i>P_{Aox1-r-gas1}</i> ⁺
1260	GCTGGCGGCCGCGCTGCTCTTAGAGCTGGAGTTGCT	
1261	GAAGCTGAATTCCAAACACATCCAATAGTGATTAAGGA	Construcción pMMR23 <i>P_{Aox1-r-gas4}</i> ⁺
1262	TTGTTCTAGAATGGAGCTAGTCATGCCAGATGTATA	
1263	GAAGCTGCAGGAGACTCTGCCTCTTCCGCTATCAAA	Construcción pMMR24 <i>P_{Aox1-r-gas5}</i> ⁺
1264	TTGTTCTAGAATGGAAGAAGTAGCCGAGGAGCTTCC	
1283	AGTCGACATTGCTGATTGAATGTCCATATAAG	Clonación de <i>gas2</i> ⁺

1316	AGCTCCTCTGAAAGCGGTTTCATCGTAAAAAAGAATTGTTGA AATTT	Construcción gas4Δ-GPI
1317	AAATTTCAACAATTCTTTTTTACGATGAACCGCTTTCAGAG GAGCT	
1318	TCGTCATTTACTACTTGGTTGCCGGAGAAG	Mutagénesis dirigida de E157 de gas4p
1319	CTTCTCCGGCAACCAAGTAGTAAATGACGA	
1322	TATTGCAACCAAATTGTGACAAGAATAGCG	Mutagénesis dirigida de E257 de gas4p
1323	CGCTATTCTTGTCACAATTTGTTGCAATA	
1324	AGATGGTTTGTTTTTTGGCTTGGGACGTCGAGAG	
1327	CCGGCGGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTTAAATAAACA AACAGCAGTGCC ACCGAT	PCR degenerada de <i>gas1</i> ⁺
1353	attagcggccggtctcggtggcctcgctaaa	Casete de interrupción de <i>gas1</i> ⁺
1354	GGGGATCCGTGCACCTGCAGCGTAgttatcataggagccaagaat caac	
1355	AACGAGCTCGAATTCATCGATGATctagtctcttatgaatcgactatgct	
1371	TACACTCAGGATCATGGTGCCGATTCTTGTAGCTGGGGTGG TGTTGGTGAGCTTAAGGCAcggatccccgggtaattaa	Construcción gas2-GFP
1372	TTACAATAGTACAGGTGGCTGATTACAAACTCATGGATTATA TGCAAGAATGGTATGTGACgaattcgagctcgtttaaac	
1386	TTGTTCTAGAATGCTACAAGAATCGGCACCATG	Construcción pMMR34 (P _{AOX1} -f- <i>gas2</i> -Δ9 ⁺)
1395	GAAGCTGAATCCATCATCATCATCATTATTTGAGCCT TTGACTATCAAGGGT	Construcción pMMR35 (P _{AOX1} -f-6xHis- <i>gas2</i> p)
1396	TTGTTCTAGAATGGCGGCCCGGCGGCCCGGCGGCGCTA CAAGAATCGGCACCATG	Construcción pMMR36 (P _{AOX1} -f- <i>gas2</i> p-ES-6xHis)
1404	gaattcGCATTCTTGGAGAAGGTATTGAATATTATATTGC	Clonar <i>gas4</i> ⁺ bajo control de P _{SPO20}
1405	ctcgagCATTGAGCTAAGCTCTAAATTTCAACAATTC	

En todos los casos, los fragmentos amplificados se purificaron mediante el sistema *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), ya fuera directamente o previa electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión. La secuenciación de fragmentos de ADN se llevó a cabo en un secuenciador automático ABIPRISM.

(IX)- 3.3. Manipulación del ADN

Los procedimientos empleados para la manipulación del ADN son los recogidos en el manual de laboratorio de Sambrook y colaboradores (1989), 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 ADN 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 0,7% 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 ADN 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 ADN se realizó utilizando la ligasa del fago T4 (*Roche*), incubando la mezcla de la reacción durante, al menos, dos horas a 37°C. La mezcla de la ligación se empleó para transformar directamente *E. coli*.

En la Tabla 9 se resumen las principales características de los plásmidos construidos en el transcurso del trabajo experimental recogido en esta Memoria.

(IX)- 3.3.1. Plásmidos derivados de *gas1*⁺

pMMR6: Casete de delección *gas1Δ::KanMX4*. Se amplificaron fragmentos de unos 300-500 pb utilizando parejas oligonucleótidos específicos (1029-1030 y 1031-1032). A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados al ca-

Tabla 9. Plásmidos construidos en el presente trabajo. En el apartado "Descripción", siempre que no se indique lo contrario, el gen ha sido clonado con su propio promotor. En caso contrario, se especifica el promotor que controla la expresión del gen.

PLÁSMIDO	VECTOR	DESCRIPCIÓN
pMMR3	pSK ⁺	Casete de delección <i>gas2::KanMX4</i>
pMMR6	pSK ⁺	Casete de delección <i>gas1::KanMX4</i>
pMMR7	pSK ⁺	Casete de delección <i>gas4::KanMX4</i>
pMMR8	pSK ⁺	Casete de delección <i>gas5::KanMX4</i>
pMMR9	pAL-KS	<i>gas5</i> ⁺
pMMR13	pAL-KS	<i>gas1</i> ⁺
pMMR14	pAL-KS	<i>gas4</i> ⁺
pMMR15	pAL-KS	<i>gas2</i> ⁺
pMMR18	pAL-KS	<i>YFP-gas1</i> ⁺
pMMR19	pAL-KS	<i>YFP-gas4</i> ⁺
pMMR21	pPICZαA	<i>P_{AOX1}-r-gas2</i> ⁺ (región codificante completa, salvo secuencia señal)
pMMR22	pPICZαA	<i>P_{AOX1}-r-gas1</i> ⁺
pMMR23	pPICZαA	<i>P_{AOX1}-r-gas4</i> ⁺
pMMR24	pPICZαB	<i>P_{AOX1}-r-gas5</i> ⁺
pMMR26	pAL-KS	<i>gas4-ΔGPI</i>
pMMR27	pAL-KS	<i>YFP-gas4-ΔGPI</i>
pMMR29	pAL-KS	<i>gas4-E257Q</i>
pMMR30	pAL-KS	<i>gas4-E157Q</i>
pMMR34	pPICZαA	<i>P_{AOX1}-r-gas2</i> ⁺ (región codificante sin secuencia señal ni últimos 27 nucleótidos)
pMMR35	pPICZαA	<i>P_{AOX1}-r-6His-gas2</i> ⁺ (construcción r-6xHis-gas2p)
pMMR36	pPICZαA	<i>P_{AOX1}-r-gas2</i> ⁺ -(Ala) ₂ Gly(Ala) ₂ Gly(Ala) ₂ (construcción r-gas2-ES-6xHisp)
pC764	pRS424	Región -731 a -1 que contiene el promotor del gen <i>SPO20</i> (<i>P_{SPO20}</i>)
pMMR38	pC764	<i>P_{SPO20}-gas4</i> ⁺

sete *KanMX4*, que confiere resistencia al antibiótico G418 obtenido del plásmido pFA6a-*KanMX4* (Wach *et al.*, 1994). El fragmento fusionado se clonó entre los sitios *Xba*I y *Xho*I del vector pKS⁺.

pMMR13: *gas1*⁺. La construcción del plásmido portador de la región codificante de *gas1*⁺ bajo el control de su propio promotor se realizó mediante amplificación por PCR de la secuencia codificante de la β-1,3-glucanosil-transferasa con los oligonucleótidos 1076 y 1032. El fragmento obtenido se clonó entre los sitios *Xba*I y *Bam*HI del vector pAL-KS.

pMMR18: *YFP-gas1*⁺. La fusión marcada con la proteína fluorescente amarilla (YFP) en el extremo amino se construyó también por PCR. En primer lugar, se amplificaron fragmentos de DNA de 570 y 210 pb con parejas de oligonucleótidos específicos (1076-1140 y 1141-1142). Los fragmentos

resultantes se fusionaron por PCR recombinante con la secuencia de la YFP, obtenida del plásmido pBS7 (*Yeast Resource Center*, <http://depts.washington.edu/yeastrc/>). El fragmento amplificado contenía la región codificante de la YFP fusionada tras el codon 23^o de *gas1*⁺ (justo tras la secuencia señal), respetando la fase de lectura del gen. Finalmente, dicho fragmento fue introducido en el sitio *Hind*III del plásmido pMMR13.

pMMR22: *P_{AOX1}-r-gas1*⁺. Se generó mediante amplificación por PCR una forma truncada de *gas1*⁺, utilizando los oligonucleótidos 1259 y 1260. El primero de ellos era complementario a los nucleótidos +58 hasta +84 e incorporaba un sitio *Eco*RI en el extremo 5'. El segundo era complementario a los nucleótidos +1.522 hasta +1.545 de la región codificante e incorporaba un sitio *Not*I en el extremo 3'. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *Eco*RI y *Not*I y se clonó en

el vector pPICZαA digerido con las mismas restrictasas.

(IX)- 3.3.2. Plásmidos derivados de *gas2*⁺

pMMR3: Casete de delección *gas2Δ::KanMX4*. Se amplificaron fragmentos de unos 300-500 pb utilizando parejas oligonucleótidos específicos (1025-1026 y 1027-1028). A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados al casete *KanMX4* obtenido del plásmido pFA6a-*KanMX4* (Wach *et al.*, 1994). El fragmento fusionado se clonó entre los sitios *NotI* y *SpeI* del vector pKS⁺.

pMMR15: *gas2*⁺. La construcción del plásmido portador de la región codificante de *gas2*⁺ bajo el control de su propio promotor se realizó mediante amplificación por PCR de la secuencia codificante de dicho gen con los oligonucleótidos 1025 y 1283. El fragmento así amplificado se clonó entre los sitios *NotI* y *Sall* del vector pAL-KS.

pMMR21: P_{AOX1}-*r-gas2*⁺. Se generó mediante amplificación por PCR de la región codificante completa, salvo la secuencia señal, utilizando los oligonucleótidos 1257 y 1258. El primero de ellos era complementario a los nucleótidos +57 hasta +84 e incorporaba un sitio *EcoRI* en el extremo 5'. El segundo era complementario a los nucleótidos +1.354 hasta +1.377 de la región codificante e incorporaba un sitio *XbaI* en el extremo 3'. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y se clonó en el vector pPICZαA digerido con las mismas restrictasas.

pMMR34: P_{AOX1}-*r-gas2*⁺ (región codificante sin secuencia señal ni últimos 27 nucleótidos). Se generó mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos 1257 y 1386. El segundo oligonucleótido era complementario a los nucleótidos +1.330 hasta +1.353 de la región codificante e incorporaba un sitio *XbaI* en el extremo 3'. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y se clonó en el vector pPICZαA digerido con las mismas restrictasas.

pMMR35: P_{AOX1}-*r-6His-gas2*⁺. Mediante amplificación por PCR se generó una forma de *gas2*⁺ carente de su secuencia señal y de los últimos 27 nucleótidos y que incorporaba una secuencia de 6 histidinas justo antes de la secuencia que codifica

el dominio catalítico. Para ello se emplearon los oligonucleótidos directo 1395 y reverso 1386. El primero de ellos era complementario a los nucleótidos +57 hasta +84, introducía la secuencia codificante de seis histidinas e incorporaba un sitio *EcoRI* en el extremo 5'. El segundo oligonucleótido era complementario a los nucleótidos +1.330 hasta +1.353 de la región codificante e incorporaba un sitio *XbaI* en el extremo 3'. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y se clonó en el vector pPICZαA digerido con las mismas restrictasas.

pMMR36: P_{AOX1}-*r-gas2*⁺-ES-(6xHis). Mediante amplificación por PCR se generó una forma de *gas2*⁺ carente de su secuencia señal y de los últimos 27 nucleótidos, incorporando además un elemento espaciador compuesto por seis alaninas y dos glicinas, (Ala)₂Gly(Ala)₂Gly(Ala)₂, en el extremo 3'. Para ello se emplearon los oligonucleótidos directo 1257 y reverso 1396. El primero de ellos era complementario a los nucleótidos +57 hasta +84 e incorporaba un sitio *EcoRI* en el extremo 5'. El segundo oligonucleótido era complementario a los nucleótidos +1.330 hasta +1.353 de la región codificante, y portaba la información para la introducción de (Ala)₂Gly(Ala)₂Gly(Ala)₂ en la secuencia de aminoácidos e incorporaba un sitio *XbaI* en el extremo 3'. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y se clonó en el vector pPICZαA digerido con las mismas restrictasas.

(IX)- 3.3.3. Plásmidos derivados de *gas4*⁺

pMMR7: Casete de delección *gas4Δ::KanMX4*. Se amplificaron fragmentos de unos 300-500 pb utilizando parejas de oligonucleótidos específicos (1043-1044 y 1045-1046). A continuación, los fragmentos resultantes fueron fusionados al casete *KanMX4*, que confiere resistencia al antibiótico G418, el cual se había obtenido del plásmido pFA6a-*KanMX4* (Wach *et al.*, 1994). El fragmento fusionado se clonó entre los sitios *XbaI* y *XhoI* del vector pKS⁺.

pMMR14: *gas4*⁺. La construcción del plásmido portador de la región codificante de *gas4*⁺ bajo el control de su propio promotor se realizó mediante

amplificación por PCR de la secuencia codificante de la glucanosil-transferasa, con los oligonucleótidos 1043 y 1046. El fragmento así amplificado se clonó entre los sitios *Xba*I y *Xho*I del vector pALKS.

pMMR19: *YFP-gas4⁺*. La fusión marcada con la proteína amarilla fluorescente (YFP) en el extremo N-terminal se construyó también por PCR. En primer lugar, se amplificaron fragmentos de DNA de 570 y 210 pb con parejas de oligonucleótidos específicos (1043-1143 y 1144-1145). Los fragmentos resultantes se fusionaron por PCR recombinante con la secuencia codificante de la YFP, obtenida del plásmido pBS7 (*Yeast Resource Center*, <http://depts.washington.edu/yeastrc/>). El fragmento amplificado contenía la región codificante de la YFP fusionada con el codon 27^o de *gas4⁺* (inmediatamente tras la secuencia señal), respetando la fase de lectura del gen. Finalmente, dicho fragmento fue introducido entre los sitios *Spe*I y *Bgl*II del plásmido pMMR14.

pMMR23: *P_{AOX1}-r-gas4⁺*. Mediante amplificación por PCR se generó una forma truncada de *gas4⁺*, utilizando los oligonucleótidos directo 1261 y reverso 1262. El primero de ellos era complementario a los nucleótidos +70 hasta +96 e incorporaba un sitio *Eco*RI en el extremo 5'. Este último era complementario a los nucleótidos +1.264 hasta +1.287 de la región codificante e incorporaba un sitio *Xba*I en el extremo 3'. El producto de PCR resultante se digirió con *Eco*RI y *Xba*I y se clonó en los mismos sitios del vector pPICZαA.

pMMR26: *gas4-ΔGPI*. La forma mutante de *gas4p* carente de la secuencia hidrofóbica del extremo C-terminal se construyó como se detalla a continuación. En primer lugar, se generó un casete de truncación mediante PCR recombinante (Wach, 1996). Se sintetizaron fragmentos de DNA de 396 y 550 pb, correspondientes a las regiones flanqueantes del extremo carboxilo, para lo cual se emplearon parejas de oligonucleótidos específicos 1002-1317 y 1316-1046. A continuación, los fragmentos obtenidos fueron fusionados mediante PCR recombinante utilizando los oligonucleótidos más externos (1002-1046) y el fragmento resul-

tante se clonó entre los sitios *Aat*II y *Xho*I del plásmido pMMR14.

pMMR27: *YFP-gas4-ΔGPI*. Se siguió la misma estrategia que en el caso del pMMR26, salvo que el fragmento fusionado se clonó entre los sitios *Aat*II y *Xho*I del plásmido pMMR19.

pMMR29: *gas4-E257Q*. La forma mutante de *gas4p* se obtuvo por mutagénesis dirigida, sometiendo a una extensión por PCR a fragmentos parcialmente solapantes (Horton *et al.*, 1989). En un primer paso de PCR se amplificaron dos fragmentos parcialmente solapantes utilizando dos parejas de oligonucleótidos: 1144-1318 y 1319-1324. Los cebadores 1318 y 1319 son complementarios a los nucleótidos +456 a +485 de la región codificante de *gas4⁺*. En estos oligonucleótidos se incorporaba un codon que codificaba una glutamina en lugar de un ácido glutámico. Esta mutación se localizaba en la región solapante entre los fragmentos amplificados con cada pareja de cebadores. A continuación, ambos fragmentos se fusionaron en un segundo paso de PCR, utilizando los oligonucleótidos más externos: 1144 y 1324, amplificando así una región mutada de *gas4⁺*. Dicha región fue clonada entre los sitios *Bgl*II y *Aat*II del plásmido pMMR14.

pMMR30: *gas4-E157Q*. Se construyó de manera similar al anterior. En este caso, las parejas de cebadores empleadas fueron 1144-1322 y 1323-1324, siendo 1322 y 1323 complementarios a los nucleótidos +755 hasta +784 e incorporando una glutamina en lugar de un glutámico. El segundo paso de PCR se realizó combinando los fragmentos recién obtenidos y los oligonucleótidos 1144 y 1324. Finalmente, la región mutada así amplificada se clonó entre los sitios *Bgl*II y *Aat*II del plásmido pMMR14.

(IX)- 3.3.4. Plásmidos derivados de *gas5⁺*

pMMR8: Casete de delección *gas5Δ::KanMX4*. Se amplificaron fragmentos de unos 300-500 pb utilizando parejas oligonucleótidos específicos (1047-1048 y 1049-1050). Los fragmentos resultantes fueron fusionados al casete *KanMX4*, obtenido del plásmido pFA6a-*KanMX4* (Wach *et al.*,

1994). El fragmento obtenido se clonó entre los sitios *Xba*I y *Xho*I del vector pKS⁺.

pMMR9: *gas5*⁺. La construcción del plásmido portador de la región codificante de *gas5*⁺ con su propio promotor se realizó mediante amplificación por PCR de la secuencia + de la glucanosiltransferasa, con los oligonucleótidos 1047 y 1050. El fragmento así amplificado se clonó entre los sitios *Spe*I y *Xho*I del vector pAL-KS.

pMMR24: P_{AOX1}-*r-gas5*⁺. Se generó mediante amplificación por PCR una forma truncada de *gas5*⁺, utilizando los oligonucleótidos 1263 y 1264. El primero era complementario a los nucleótidos +67 hasta +101 e incorporaba un sitio *Pst*I en el extremo 5'. El segundo era complementario a los nucleótidos +1.435 hasta +1.458 de la región codificante e incorporaba un sitio *Xba*I en el extremo 3'. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *Pst*I y *Xba*I y se clonó en el vector pPICZαB digerido con las mismas restrictasas.

(IX)- 3.4. Transformación de bacterias y levaduras

(IX)- 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). Cuando se utilizó la cepa DH10β, se empleó la electroporación, utilizando un electroporador *Micropulser*TM (*BioRad*) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

(IX)- 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 (AcLi) y dimetilsulfóxido (DMSO), mientras que para la transformación de *S. cerevisiae*, se empleó el procedimiento descrito por Ito y colaboradores (1983). Por último, la transformación de las cepas de *P. pastoris* se llevó a cabo mediante electroporación, según las instrucciones del *EasySelect*TM *Pichia Expression Kit* (*Invitrogen*).

(IX)- 4. Métodos genéticos

(IX)- 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 ADN. La estrategia consiste en la construcción de un casete 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 Güldener y colaboradores en 1996). Los diferentes casetes utilizados se construyeron mediante amplificación por PCR de las regiones no codificantes 5' y 3' de cada gen (salvo en la última estrategia para delecionar el gen *gas1*⁺, en la cual se amplificó parte de las regiones codificantes: la secuencia que codifica para el péptido señal y la secuencia de la región hidrófoba del extremo carboxilo) y posterior fusión con el marcador de selección por PCR recombinante (Wach *et al.*, 1994; Wach, 1996). Para comprobar la integración en el locus correspondiente, los transformantes se analizaron por ensayo *Southern-blot* o por PCR.

(IX)- 4.2. Obtención de ARN total de S. pombe

El ARN total se obtuvo por el método del fenol caliente (Ausubel *et al.*, 1987). La valoración de la concentración de ARN en las muestras se efectuó midiendo la absorbancia a 260 nm y teniendo en cuenta la relación de la absorbancia a 260 nm /280 nm para estimar el grado de pureza de la reacción. La cantidad se calculó teniendo en cuenta que una A₂₆₀ = 1 equivale a una concentración de ARN de 40 µg/mL en solución acuosa.

(IX)- 5. Hibridación de ácidos nucleicos

La detección de secuencias específicas de ADN o ARN se llevó a cabo mediante la hibridación de sondas de ADN marcadas radiativamente con las muestras de interés.

(IX)- 5.1. Preparación de sondas marcadas radiactivamente

El marcaje radiactivo de los fragmentos de ADN utilizados como sondas se efectuó utilizando el *kit Rediprime™ II*, según las instrucciones detalladas por el fabricante (*GE Healthcare*). Se marcaron 25 µg de ADN con 3 µL de α-³²P-dCTP (actividad específica >3000 Ci/mmol). La reacción se realizó a 37°C durante 15 minutos y se detuvo añadiendo 1,5 µL de EDTA 0,5 M.

(IX)- 5.2. Detección de secuencias específicas de ADN (*Southern-blot*)

Los experimentos de hibridación para detectar secuencias específicas de ADN utilizando sondas radiactivas se llevaron a cabo según el procedimiento anteriormente publicado (Southern, 1975), con ligeras modificaciones. El ADN genómico de la(s) cepa(s) de interés fue extraído, digerido con las enzimas de restricción apropiadas y, finalmente, sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Tras la electroforesis, el gel fue desnaturalizado (NaOH 0,2 N, NaCl 0,6 M) durante 35 minutos, neutralizado (NaCl 1,5 M, Tris-HCl pH 7,4 1M) durante 30 minutos y deshidratado en un secador de geles *Model 853 Gel Dryer (BioRad)* durante 1 hora. El gel desecado se incubó directamente con la solución de pre-hibridación y con la solución de hibridación, conteniendo las sondas marcadas radiactivamente, durante una noche. Las secuencias de ADN presentes en el gel que habían hibridado con la sonda radiactiva fueron detectadas al exponer éste sobre una película de autorradiografía *Hyperfilm™ MP (GE Healthcare)*.

(IX)- 5.3. Detección de ARN mensajero (*Northern-blot*)

Para los ensayos tipo *Northern-blot*, se siguió el procedimiento basado en la formamida y el formaldehído como agentes desnaturizantes (Sambrook *et al.*, 1989). El ARN total, tras electroforesis en un gel de agarosa, fue transferido mediante capilaridad a membranas *Hybond-N (GE*

Healthcare) y se fijaron a ella mediante exposición a la luz UV en una cámara *Stratalinker™ 2400*, de la casa *Stratagene*. La membrana fue hibridada con la sonda marcada radiactivamente en *Rapid Hyb Buffer (GE Healthcare)* y la presencia de ARN mensajero de interés en la muestra se detectó mediante exposición de la membrana sobre una película de autorradiografía *Hyperfilm™ MP (GE Healthcare)*.

En los casos en los que fue necesario detectar más de un ARN mensajero diferente en la misma muestra, se procedió a la hibridación secuencial con cada una de las sondas adecuadas, eliminando en cada caso la sonda anterior con SDS 0,1% a 100°C sobre la membrana y dejándola enfriar posteriormente.

(IX)- 6. Purificación de proteínas

La purificación de las proteínas recombinantes que poseían el epítipo (6XHis) se realizó a partir del medio de cultivo de las cepas correspondientes de *P. pastoris*, utilizando la resina *Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen)*. Los cultivos en los cuales se había inducido la expresión de las proteínas recombinantes de interés fueron centrifugados y filtrados mediante el sistema *Steritop (Millipore)* para eliminar las células del sobrenadante. A continuación, los caldos de cultivo fueron concentrados mediante ultrafiltración (*Amicon® Ultra-15 10000 MWCO, Millipore*) y dializados frente a la solución de unión o *Bind Buffer* recomendado por el fabricante de la resina (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM). A continuación, la muestra dializada se incubó con la resina *Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen)* durante 4 horas a 4°C y en agitación, y se cargó en una columna. La resina se lavó dos veces con el tampón de lavado o *Wash Buffer* (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM) y la proteína de interés se eluyó con el tampón de elución o *Elute Buffer* ((NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM). Por último, las proteínas purificadas se dializaron frente a tampón acético-acetato 50 mM.

(IX)- 7. Detección y análisis de proteínas

(IX)- 7.1. 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, se lavaron con PMSF (175 µg/mL) y se guardaron a -70°C hasta el momento de su análisis. Para la extracción de proteínas, las muestras se descongelaron en hielo y se resuspendieron en tampón de lisis TEG (Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 30 mM, glicerol 10%, DTT 1mM, 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*). 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).

(IX)- 7.2. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas (*Western-blot*)

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando dos sistemas de electroforesis diferentes, que fueron:

- “*Sistema NUPAGE® Novez Bis-Tris gels*” (*Invitrogen*): La electroforesis de proteínas (50 µg de extracto proteico) se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en geles de Bis-Tris al 10% o en gradiente 4-12%, en tampón MOPS, según las instrucciones del fabricante.

- “*MiniProtean II*” (*BioRad*): La electroforesis de las proteínas que habían quedado unidas o no a la pared celular se realizó en condiciones desnaturizantes, en geles de poliacrilamida al

10% conteniendo SDS al 10%, a una intensidad de 30 mAmp por gel, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970).

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 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 (sistema *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-poli-His (*monoclonal HIS-1, Sigma*), anti-c-myc (*Santa Cruz Biotechnology*) anti-tubulina (*monoclonal B512, Sigma*), anti-actina (*ICN Biomedicals*), anti-HA (*MM-S101-PA, monoclonal 16B12, Babco*) y anti-gas4p (producido por *Biomedal* a partir de una muestra de la proteína gas4p de la levadura de fisión).

(IX)- 7.3. Obtención de anticuerpos policlonales anti-gas4p

Los anticuerpos específicos anti-gas4p fueron generados por *Biomedal* (<http://www.biomedal.es/>). Para ello, se inyectaron en conejos 0,7 mg de proteína recombinante gas4p con el coadyuvante de Freund el día 0. Las subsiguientes inmunizaciones se llevaron a cabo los días +14, +28 y

+ 42, inyectando 0,4 mg de r-gas4p con el adyuvante de Freund. Finalmente, los conejos fueron sacrificados el día +52 y se obtuvieron 6,5 mg de anticuerpo anti-gas4p.

(IX)- 8. Obtención y modificaciones de polisacáridos

Los polisacáridos empleados para determinar la actividad enzimática de las proteínas de interés se recogen en la Tabla 9. Mediante hidrólisis de curdlano con ácido trifluoroacético y purificación concromatografía de intercambio aniónico (Hartland *et al.*, 1996), se obtuvieron laminarioligosacáridos de diferente grado de polimerización (dp8-dp14). El grado de purificación fue analizado según se describe en Fontaine *et al.* (1997).

Cuando fue necesario, los distintos sustratos fueron reducidos mediante tratamiento con NaBH₄ en 50 NaOH 50 mM, dializados frente a agua y liofilizados.

(IX)- 9. Ensayos enzimáticos

(IX)- 9.1. Actividad β -1,3-glucanosil-transferasa

La valoración de la actividad β -1,3-glucanosil-transferasa de las proteínas recombinantes purificadas se realizó mediante el análisis de los azúcares liberados a partir del polisacárido utilizado como sustrato. Las proteínas recombinantes (0,06-0,08 mg/mL) fueron incubadas con laminarioligosacáridos reducidos de distinto grado de polimerización (dp8-dp14) en tampón acético-acetato 50 mM pH 5,5 a 37°C. A distintos tiempos, se tomaron muestras de la reacción de 2,5 μ L, que se añadieron sobre 40 μ L de NaOH 50 mM para detener la reacción.

El análisis de los productos de reacción se realizó por cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico (columna *Carbo-PAC PA-1*, 0,46 mm x 250 mm, *Dionex*), utilizando un detector de pulso electroquímico (HPLC-PED), como se ha descrito previamente (Mouyna *et al.*, 2000a).

Esta técnica permite distinguir polímeros de diferente tamaño y carga en función del tiempo de retención en la columna. Los tampones empleados fueron: tampón A (NaOH 50 mM) y tampón B (AcNa 500 mM en NaOH 50 mM). El gradiente aplicado fue: 0-2 minutos 98% de tampón A, 2% de tampón B (isocrático); 2-15 minutos 65% tampón A, 35% tampón B (lineal); 15-35 minutos 30% de tampón A, 70% tampón B (lineal); 35-37 minutos 100% tampón B (lineal), y, por último, 37-60 minutos 100% tampón B (isocrático).

(IX)- 9.2. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular

Se utilizó una adaptación del método descrito previamente (Ishiguro *et al.*, 1997; Pérez y Ribas, 2004). En esencia, este método consta de varios pasos: a) marcaje radiactivo de las células, b) extracción de las paredes celulares a partir de células marcadas, c) digestiones enzimáticas de dichas paredes celulares, y d) valoración.

El marcaje radiactivo de las paredes de las esporas se realizó partiendo de cultivos de 10 mL de células diploides *h-h- pat1-114/pat1-114* y *pat1-114/pat1-114 gas4 Δ /gas4 Δ* incubadas a 25°C en medio mínimo con los suplementos adecuados. Los cultivos fueron transferidos a medio mínimo sin nitrógeno durante 14 horas, donde alcanzaron una densidad óptica cercana a 0,6. A continuación, dichos cultivos fueron suplementados con nitrógeno y D-¹⁴C-glucosa a una concentración de 1 μ Ci/mL, y se mantuvieron en este medio durante 20 horas a 34°C hasta la formación de esporas. Los fraccionamientos de células durante el crecimiento vegetativo se realizaron a partir de cultivos de 10 ml (D.O .₅₉₅ = 0,8) que habían sido incubados con glucosa radiactiva (D-¹⁴C-glucosa, 1 μ Ci/mL) durante 6 horas.

En ambos casos, las muestras fueron recogidas mediante centrifugación y las células se lavaron 3 veces con EDTA 1 mM, tras lo cual se resuspendieron en 1 mL de EDTA 1 mM del que se tomaron, por duplicado, alícuotas de 10 μ L para valorar la incorporación total de glucosa radiactiva en las células. El resto de las células se rompieron en frío con bolitas de vidrio (*Sigma*) de 425-600 μ m

de diámetro mediante agitación en una *FastPrep FR120* (Savant, Bio101), utilizando tres pulsos de 20 segundos a una velocidad de 5,5. Se decantaron las perlas y la muestra conteniendo las células rotas se resuspendió en 1 mL de EDTA 1 mM, del que se tomaron de nuevo alícuotas de 10 mL por duplicado como otra medida de la incorporación total de glucosa radiactiva.

A continuación, las muestras se lavaron 3 veces con NaCl 2 M y, dos veces, con EDTA 1 mM, mediante centrifugaciones a baja velocidad con la intención de separar las paredes celulares de membranas y otros orgánulos. El precipitado se resuspendió en 1 mL de EDTA 1 mM y se tomaron dos alícuotas de 20 μ L para determinar la incorporación de glucosa radiactiva en las paredes celulares. Finalmente, las muestras fueron incubadas 5 minutos a 100°C para inactivar las glucanasas de la pared celular. Se procedió a una última centrifugación y las paredes se resuspendieron en 500 μ L de EDTA 1 mM para el análisis de los distintos componentes mediante reacciones enzimáticas.

(IX)- 9.2.1. Tratamiento con Zimoliasa

100 μ L de paredes celulares se incubaron con 20 μ L de Zimoliasa 100T (10 mg/mL) *ICN Biomedicals, Aurora, OH*, en tampón citrato-fosfato pH 5,6 50 mM durante 40 horas a 28°C. El volumen final de la reacción fue 200 μ L. Una vez concluida la digestión enzimática, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 12.000 rpm para separar el precipitado de la fracción soluble. El precipitado se lavó con TCA al 10% antes de contar la radiactividad. El precipitado se consideró α -glucano, ya que la Zimoliasa degrada el β -glucano y manano, que se liberan al sobrenadante.

(IX)- 9.2.2. Tratamiento con Quantazime®

100 μ L de paredes celulares fueron incubados con 2,5 μ L de Quantazime® (20 U/ μ L), en tampón Tris-HCl, pH 7,0 durante 40 horas a 28°C. El volumen final de la reacción fue 200 μ L. Una vez concluida la digestión enzimática, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 12.000 rpm para separar el precipitado de la fracción soluble. Una vez concluida la digestión enzimática, las muestras

se centrifugaron para separar el precipitado de la fracción soluble. El precipitado tras la reacción se consideró α -glucano y manano, puesto que la Quantazime® es una β -1,3-glucanasa recombinante que digiere específicamente β -glucano, que se libera al sobrenadante.

(IX)- 9.2.3. Filtrado de las muestras

Después de los distintos tratamientos enzimáticos, las muestras se filtraron sobre papel *Whatman GF/C*. Los filtros se lavaron dos veces con 3 mL de TCA al 10% y una vez con 4 mL de etanol de 96°. A continuación, se dejaron secar y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo *Wallac 1409* añadiendo líquido de centelleo *Optiphase "Hi-safe"* (Wallace).

(IX)- 9.3. Ensayos de sensibilidad a Zimoliasa

La sensibilidad a Zimoliasa fue cuantificada según lo descrito previamente (Coluccio *et al.*, 2004). A partir de un cultivo esporulado, se centrifugaron 100 μ L (aproximadamente DO = 0,05, que equivale a 5×10^4 células) y el precipitado se resuspendió en 1.090 μ L de agua. Se añadieron 10 μ L de Zimoliasa 100T (*ICN Biomedicals, Aurora, OH*) de concentración 10 mg/mL, y se incubó a 37°C. Cada 10 minutos, se retiraron alícuotas de 100 μ L de células (aproximadamente, 5.000 células) que fueron diluidas en agua y sembradas en placas de medio rico para determinar el número de células viables.

(IX)- 10. Técnicas microscópicas

(IX)- 10.1. Microscopía óptica. Tinción con azul de metileno

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*.

El azul de metileno es un colorante vital, porque permite distinguir entre células vivas y muertas, al acumularse en aquellas células que han perdido su integridad. En ambas clases de células, el colorante es capaz de atravesar tanto la pared celular como la membrana plasmática, pero las células vivas lo bombean fuera de ellas. En las células muertas, al no funcionar el sistema de bombeo, el colorante se acumula confiriéndoles un tono azulado. La tinción se realizó mezclando en el portaobjetos 2 μL de cultivo con 2 μL de una solución de azul de metileno al 0,6%. Las muestras se observaron seguidamente en campo claro en el microscopio.

(IX)- 10.2. Microscopía de fluorescencia

La observación se realizó en el microscopio *Leica DMRXA* mediante la iluminación de las muestras con un sistema de epifluorescencia, utilizando una lámpara de mercurio de 100 W (*EBQ100*). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (*Leica DFC350FX*) acoplada al microscopio y procesadas con los programas *Paint Shop Pro V 5.00* (*Jasc Software, Inc*), *ImageJ 1.37a* (*National Institutes of Health, USA*) y *Adobe® Photoshop® CS2* (*Adobe System, Inc*).

Para la observación de proteínas que contenían la proteína fluorescente verde (GFP) o amarilla (YFP), se recogieron células en crecimiento exponencial en medio sólido.

Cuando se pretendía estudiar la pared celular, las células se tiñeron con calcoflúor (10 mg/mL) (*Sigma*) o azul de anilina (0,5 mg/mL), que parece unirse específicamente a glucanos del septo y pared celular de la levadura de fisión (Kippert y Lloyd, 1995).

La visualización de los núcleos se realizó mediante tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, *Serva*), que tiene afinidad por los ácidos nucleicos. Utilizado a baja concentración, es ca-

paz de unirse selectiva y preferencialmente al ADN nuclear. Las células se fijaron con etanol al 70% (Pringle, 1991; Sherman *et al.*, 1986) durante 5 minutos, se lavaron varias veces con PBS (1x), resuspendiéndolas finalmente en 50 μL del mismo tampón. A continuación, se mezclaban 5 μL de esta suspensión celular con 1 μL de una solución de DAPI de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (preparada en PBS).

(IX)- 10.3. Preparación de muestras para microscopía a lo largo del tiempo (time-lapse)

Cuando fue necesario analizar células 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, la cual se vertió sobre un portaobjetos de manera que, al enfriarse, formase una capa fina y plana de 1 mm de grosor. Una vez solidificada, se añadieron 2 μL de cultivo líquido de la cepa a estudiar, se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con parafina (Aceite de vaselina, *Panreac*).

(IX)- 10.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua destilada y con tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,4. Posteriormente, se fijaron con glutaraldehído al 3% (*EM-grade metanol free, TAAB*) en el tampón anterior durante 1 hora. Las células se recogieron por centrifugación suave y se embebieron en agar (*Difco*) al 1,5%, dejándolas durante 5 minutos en un baño a 45°C y, luego, a temperatura ambiente hasta que el agar solidificó. Las muestras se cortaron en pequeños trozos

y se introdujeron en glutaraldehído al 3% durante 30 minutos. Posteriormente, fueron lavadas tres veces en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) durante 30 minutos cada vez y se fijaron con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en tampón fosfato durante 2 horas a 4°C y en oscuridad. Tras este tratamiento, las muestras fueron lavadas dos veces en tampón fosfato durante 15 minutos cada vez y cuatro veces más en agua destilada (10 minutos cada lavado). Tras los lavados, las muestras fueron deshidratadas mediante sucesivas incubaciones en soluciones de acetona (*Merck*) de concentración creciente (10%, 20% y 30% durante 10 minutos cada vez, incubación en acetona al 30% toda una noche; 40%, 60%, 80%, 90% durante 10 minutos cada vez, y finalmente en acetona anhidra durante tres ciclos de 15 minutos). Las muestras deshidratadas se embebieron en resina (*Spurr's*

Resin Kit S024 TAAB) siguiendo las instrucciones del fabricante y secando las muestras durante 8 horas a 70°C. Finalmente, se cortaron en un microtomo equipado con una cuchilla de diamante y se montaron en rejillas de cobre adecuadas para su examen en un microscopio electrónico de transmisión *JEOL 1200 EX* (Servicio General de Microscopía Electrónica de la Universidad de Salamanca e IMB). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa informático *ImageSP Server v 1.0.22.85* (*Image Sys Prog, TRS*).

(IX)- 11. Recursos bioinformáticos

Los programas y recursos bioinformáticos empleados para la realización de esta Memoria se encuentran recogidos en la Tabla 10.

Tabla 10. Recursos bioinformáticos.

PROGRAMAS	DIRECCIONES ELECTRÓNICAS
Adobe® Illustrator CS2	http://www.adobe.com/
Adobe® In Design CS2	http://www.adobe.com/
Adobe® Photoshop	http://www.adobe.com/
Paint Shop Pro	http://www.corel.es/
EndNote® IX	http://www.endnote.com/
Lasergene®	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
FASTA	http://www.ebi.ac.uk/fasta/
Image J	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Expasy	http://www.expasy.org/
Globplot	http://globplot.embl.de/
SignalIP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/
GPI-SOM	http://gpi.unibe.ch/
Big-PI Predictor	http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
OGPET	http://ogpet.utep.edu/OGPET/
CAZy	http://www.cazy.org/

(X)- ANEXO A
Medios de cultivo

(X)- ANEXO A: Medios de cultivo

(X)- 1. Medios de Schizosaccharomyces pombe

(X)- 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

(X)- 1.2. Medios empleados para inducir la esporulación

Medio SPA

Glucosa	1 %
KH ₂ PO ₄	0,1 %
Suplementado con vitaminas	

Medio MEA

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

Medio MM-N

Igual que el EMM, pero sin NH₄Cl

(X)- 2. Medios de *Saccharomyces cerevisiae*

(X)- 2.1. Medios empleados durante el crecimiento vegetativo

Medio YEPD

Extracto de levadura	1 %
Peptona	2 %
Glucosa	2 %

Medio SC-Triptófano

YNB-aa	0,7 %
Glucosa	2 %
CSM-aa*	2 %

* CSM-aa hace referencia a mezclas de aminoácidos comercialmente preparadas, a las que les falta el aminoácido de interés. Se añaden en el medio a la concentración indicada por el fabricante, específica de cada mezcla (CSM-Ura-Trp 0,72 g/l).

(X)- 2.2. Medios empleados para inducir la esporulación

Medio YPAcetato

Extracto de levadura	1 %
Peptona	2 %
Acetato potásico	2 %

YPAcetato se empleó como medio de pre-esporulación. Para la esporulación propiamente dicha, se utilizó AcK 2%.

(X)- 3. Medios de *Pichia pastoris*

Medio YEPDS + Zeocina

Extracto de levadura	1 %
Peptona	2 %
Glucosa	2 %
Sorbitol	1 M
Zeocina	100 µg/mL

Medio BMGY y BMMY

Extracto de levadura	1 %
Peptona	2 %
Fosfato potásico pH 6.0	100 mM
YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 ⁻⁵ %
Glicerol 1% ó Metanol	1%

(X)- 4. Medios de *Escherichia coli*

Medio LB (*Luria Bertani medium*)

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

Medio LB Low Salt Zeocina™

Bactotripton	1 %
Extracto de levadura	0,5 %
NaCl	0,5 %
Zeocina	25 µg/mL

(XI)- ANEXO B

**HPAEC para el análisis de actividad
 β -1,3-glucanosil-transferasa**

(XI)- ANEXO B: HPAEC para el análisis de actividad β -glucanosil-transferasa

(XI)-1. Introducción a las técnicas cromatográficas

La primera técnica cromatográfica se desarrolló en 1.906 y fue puesta a punto por Michail Tsweet. Es una técnica de separación y medida en la que los componentes de una mezcla se distribuyen de forma desigual entre una fase móvil (estacionaria) y otra que fluye a través de ella de forma continua (fase móvil). Actualmente existe una gran variedad de técnicas cromatográficas. Su clasificación se puede hacer atendiendo a la naturaleza de la fase móvil (líquida, gaseosa o de fluidos supercríticos) o la forma de soporte cromatográfico (plana o en columna).

Para nuestro objetivo, se aplicó una variante de HPLC conocida como *High Performance Anion Exchange Chromatography* (HPAEC). En este caso, la fase estacionaria (FE) son partículas porosas de una resina de intercambio iónico, esto es, un polímero de elevado peso molecular e insoluble en agua, que posee en su estructura una serie de grupos de carácter ácido o básico. La fase móvil (FM) suelen ser soluciones acuosas de diferente pH o de diferente fuerza iónica (contenido salino). Habitualmente se emplean eluciones en gradiente.

En la Figura 79 se muestra el modo en que la cromatografía iónica permite separar los polisacáridos de distintos tamaños. Se basa en la capacidad de ionización de los grupos hidroxilo en función del pH o de la fuerza iónica del medio. Para simplificar la figura, sólo se representa el fenómeno sobre los hidroxilos del C6 de cada monómero. En las condiciones descritas (Fontaine *et al.*, 1997), con la muestra en hidróxido sódico, los hidroxilos se encuentran ionizados, cargados negativamente, de modo que interaccionan con las cargas positivas que posee la resina de la colum-

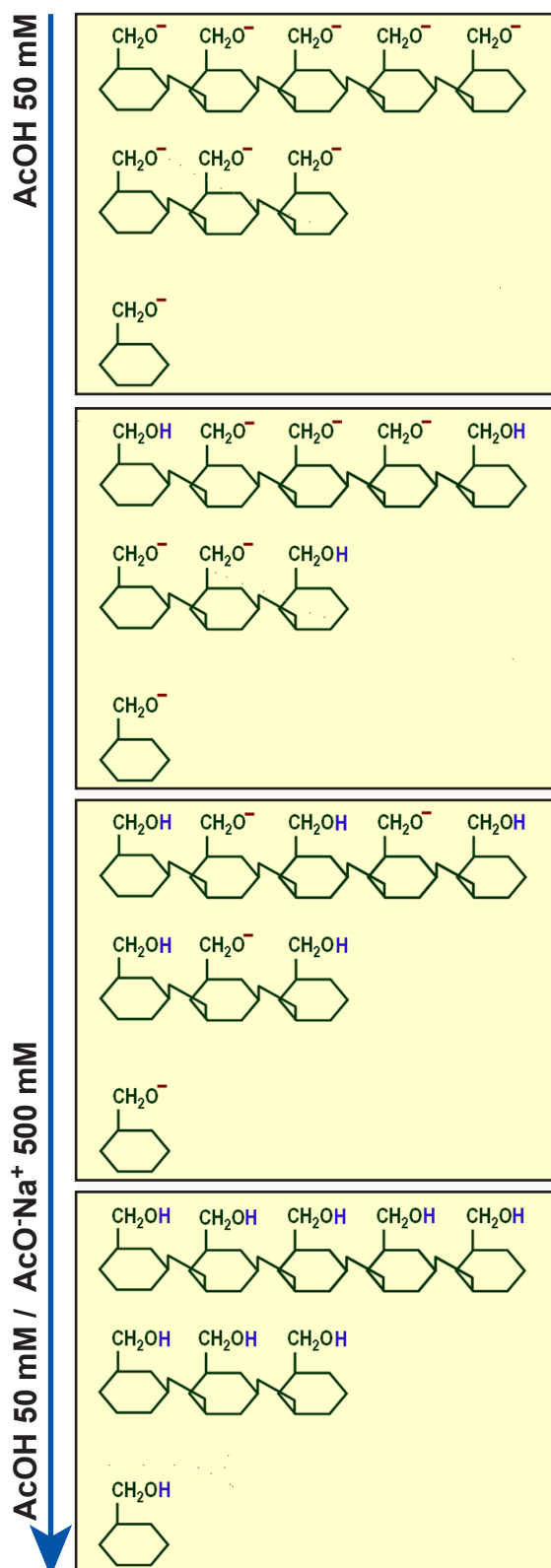


Figura 79. Fundamento de la cromatografía iónica para la separación de polisacáridos. En un entorno básico, los polisacáridos de distintos tamaños se encuentran ionizados. A medida que el entorno se acidifica, los polisacáridos vuelven paulatinamente a la forma molecular y pierden afinidad por resinas con residuos catiónicos.

na. Por ello, todas las moléculas quedan retenidas en el interior de la columna.

La elución se realiza en gradiente, disminuyendo la proporción de hidróxido sódico y aumentando la proporción de acetato sódico. Esta diferencia provoca, de manera gradual, el paso de los hidroxilos ionizados a la forma molecular. Las moléculas más pequeñas, al poseer menor número de grupos ionizables, alcanzan antes la forma no ionizada, y son arrastradas más rápidamente por la fase móvil a través de la columna. Los polímeros más largos también van sufriendo gradualmente el paso a la forma molecular de sus hidroxilos. Hay un debilitamiento progresivo de la interacción con la fase estacionaria, por lo que son arrastrados a través de la columna con mayor lentitud a medida que aumenta su longitud. Es decir, las moléculas de menor tamaño atraviesan la columna más rápidamente. La columna está acoplada a un detector y a un integrador, que detectan las moléculas a medida que son eluidas de la columna y transforman la señal generada en un cromatograma en el que el área de los distintos picos es proporcional a su abundancia.

(XI)- 2. Análisis de los cromatogramas obtenidos

La utilización de esta técnica para analizar los productos generados tras la incubación de una enzima con un polisacárido de determinado tamaño permite determinar el mecanismo de acción de la misma de forma sencilla y distinguir entre enzimas que actúan como hidrolasas y aquellas que catalizan una reacción de transferencia, así como determinar el punto de corte. Como se ha comentado anteriormente, cada oligosacárido eluye de la columna a un tiempo determinado, conocido como tiempo de retención, en función de su naturaleza y tamaño, y del tipo de fase estacionaria empleada. Si una enzima actúa únicamente como hidrolasa, el tamaño de los productos de la reacción será siempre inferior a la del sustrato, mientras que la aparición de productos de mayor tamaño que el original indica que la enzima cataliza una reacción de transferencia.

En la Figura 80 se representan los productos esperados para las distintas reacciones utilizando como sustrato un glucano de 9 unidades de glucosa (G9). El sustrato de la reacción generaría un cromatograma en el que aparece un único pico (Fig. 80A y C). En el caso de que la enzima estudiada fuera una glucanasa, se obtendría una mezcla del sustrato de la reacción (G9) y oligosacáridos de menor tamaño y, por tanto, de menor tiempo de retención que la molécula sustrato. En el ejemplo mostrado en la Figura 80B, los productos corresponderían a moléculas de 3 y 6 glucosas, lo que indicaría que la enzima está actuando específicamente sobre el enlace entre las glucosas 3 y 4 (a contar desde el extremo no reductor del polímero) del sustrato y que por tanto es una endoglucanasa. Por el contrario, si la enzima actuara como una exoglucanasa, en la mezcla de reacción aparecería el sustrato, los monómeros de glucosas liberados por la acción exo-hidrolítica y una mezcla de oligosacáridos de menor tamaño que el sustrato que corresponderían a la hidrólisis del sustrato glucosa a glucosa.

Por el contrario, en el caso de que la proteína que se esté estudiando posea actividad glucosiltransferasa, el sustrato inicial (G9) actuaría a la vez como donador y aceptor, por lo que aparecerían picos de mayor y menor tamaño que el inicial. En el ejemplo mostrado en la Figura 80D aparecen: a) el sustrato inicial (G9); b) un producto de menor longitud, de 6 glucosas, generado por la hidrólisis de un trisacárido del extremo no reductor del sustrato donador, y c) un producto de mayor tamaño que el sustrato, de doce glucosas, generado por la unión del trisacárido escindido al aceptor. Este cromatograma indicaría que la enzima estudiada actúa como glucanosiltransferasa, siendo capaz de transferir un trisacárido de una molécula a otra. Es importante señalar que, en esta ocasión, las moléculas de sustrato no son las últimas en abandonar la columna, sino los productos de transferencia. Además, a medida que transcurre el tiempo de reacción el cromatograma se vuelve más complejo, pues los productos generados pueden actuar como donadores o aceptores en nuevas reacciones de transferencia.

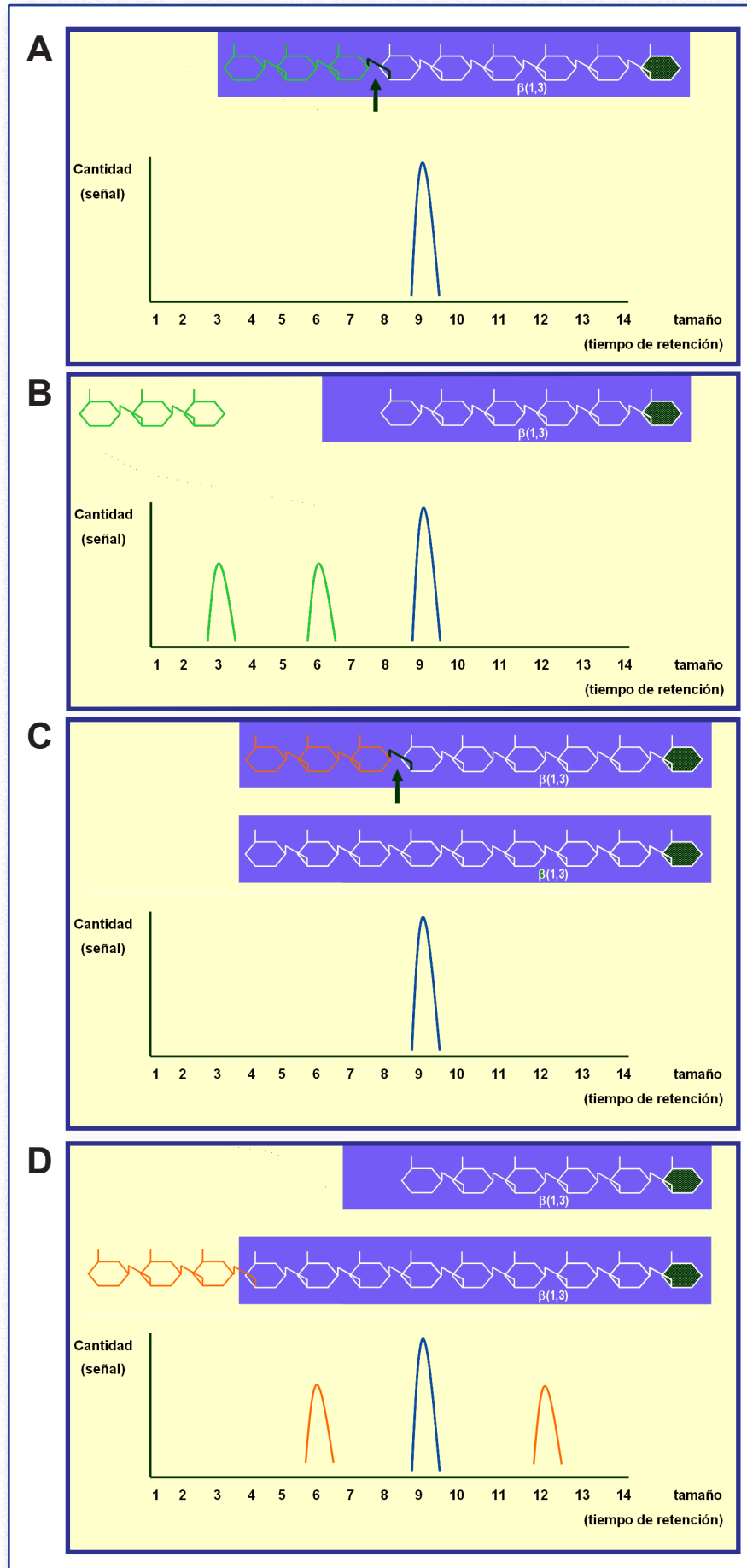


Figura 80. Ejemplos de posibles cromatogramas. (A y C) Cromatogramas a tiempo cero. Antes de que comience la reacción, en la muestra sólo se detecta el polisacárido empleado como sustrato, G9r. (B) Cromatograma generado por una endoglucanasa. Tras la incubación con el sustrato, se detectan los productos de reacción, de menor longitud que el glucano empleado como sustrato. (D) Cromatograma generado por una transglucosidasa. Se caracteriza por la salida de los productos de reacción antes y después que la molécula empleada como sustrato.

ABSTRACT

ABSTRACT

The formation of the *Schizosaccharomyces pombe* cell wall requires the co-ordinated activity of enzymes involved in the biosynthesis and modification of its components, such as glucans. The β -glucan-synthase complex synthesizes linear β -1,3-glucans, which remain unorganized and alkali-soluble until covalent linkages are formed between β -1,3-glucan and other cell wall components. Cell wall transferases that use β -1,3-glucans as substrates could perform important functions in the assembly and organization of the cell wall, since β -1,3-glucan is the main component of vegetative cell wall and one of the more abundant polymers in the ascospore wall. Several proteins belonging to the glycoside hydrolase family 72 (GH72) with β -1,3-glucanosyl-transferase activity have been described in other organisms, such as the *Saccharomyces cerevisiae* Gas1p or the *Aspergillus fumigatus* Gel1p. At least four genes encoding putative β -1,3-glucanosyl-transferases -*gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ y *gas5*⁺- have been identified in the *S. pombe* genome. In this work, we report the characterization of *gas1p*, *gas2p*, *gas4p* and *gas5p* during the different stages of the life cycle and their catalytic activity.

From the functional point of view, *gas1p* is essential for cellular viability during vegetative growth, since *gas1* Δ null mutants can only grow in osmotically supported media. *gas4p* plays an essential role during the construction of the ascospore wall, being necessary for spore germination. Finally, *gas2p* and *gas5p* play a minor role in the synthesis of the cell wall, since *gas2* Δ and *gas5* Δ null mutants or *gas2* Δ *gas5* Δ double mutant do not show significant morphologic defects.

From the biochemical point of view, all of the proteins display β -1,3-glucanosyl-transferase activity, although they differ in their specificity for the substrate length, the split point and the range of the generated products. Taking all the data into account, together with the differences in their expression profiles during the life cycle, the *S. pombe* GH72 proteins may accomplish complementary, non-overlapping, functions in fission yeast.

(XII)- OBJECTIVES

(XII)- OBJECTIVES

This work is a part of a wider project aimed at the identification and characterization of genes involved in cell morphogenesis and cell wall biosynthesis in yeast, specially *Schizosaccharomyces pombe*.

The present research project is intended to characterize the genes belonging to glycosyl-hydrolase family 72 (GH72) in *S. pombe*. The members of this family have been described as glucanosyl-transferases in *S. cerevisiae*, *A. fumigatus* and *Candida albicans*. Therefore, our objectives are:

- The identification of genes homologues to *ScGAS1* in *S. pombe* and the determination of their biological function in fission yeast, by generating null mutants to analyze the composition and structure of the cell wall.
 - The analysis of the expression patterns of the *GAS*-type genes along the life cycle in fission yeast and the localization of their products.
 - The characterization of their catalytic activity in *S. pombe*, the identification of the substrate specificity and their catalytic mechanism, verifying whether these proteins are redundant.
-

(XIII)- RESULTS

**Identification of genes homologues
to *ScGAS1* in *S. pombe***

(XIII)- RESULTS: Identification of genes homologues to ScGAS1 in *S. pombe*

(XIII)- 1. *gas1p*, *gas2p*, *gas4p* and *gas5p* belong to the glycoside-hydrolase family 72 (GH72)

The *Saccharomyces cerevisiae* Gas1p protein is one of the more abundant glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchored-surface proteins in the budding yeast. A search of the *S. pombe* database (Sanger Centre) for proteins with sequence similarity to the *S. cerevisiae* glucanoyl-transferase ScGas1p allowed the identification of four proteins (the products of SPAC19B12.02c, SPBC29A10.08, SPAC11E3.13c and SPBC342.03). These four proteins share common features with ScGas1p, such as the presence of a predicted signal sequence at the N-terminus (as identified with *SignalIP* - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), followed by the conserved domain present in the glycoside hydrolase family 72 (GH72) proteins, which has been termed GluTD -after glucan transferase domain (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000)-, together with a hydrophobic region at the C-terminus that is predicted to be a GPI anchor (identified with *GPI-SOM* and *big-PI*

Predictor). Therefore, these proteins are putative β -1,3-glucanoyl-transferases, such as ScGas1p, ScGas2p, ScGas4p, ScGas5p, AfGel1p and AfGel2p.

(XIII)- 1.1. Modular architecture of the *S. pombe* proteins belonging to the GH72 family

GH72 proteins have a modular structure and may contain additional domains between the GluTD and the GPI anchor. Therefore, some members of this family contain a Cys-rich region that has sequence similarity to carbohydrate-binding module family 43 (CBM43) proteins (Barral *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007b) and/or a Ser-rich region. Recently, a phylogenetic analysis of GH72 proteins has shown that they cluster in two subfamilies, GH72⁺ and GH72⁻, that differ in the presence or absence of the Cys-box (Ragni *et al.*, 2007b).

In *S. cerevisiae*, there are five Gas proteins (ScGas1p-ScGas5p) which differ in the combination of the different domains described above (Fig. 25A). In order to identify whether some of the *S. cerevisiae* proteins were closer to any of their fission yeast counterparts, the percentage of identity between each pair of proteins was determined. The results showed that the closest homologue to ScGas1p was the product of SPAC19B12.02c (46.9% identity, Fig. 25B). In a similar way, ScGas5p displayed a higher similarity to the SPBC342.03 and SPAC11E3.13c products (45.6 and 46.5%,

Table 3. Summary of characteristics of the GH72 *S. pombe* proteins.

	SPAC19B12.02c <i>gas1p</i>	SPBC29A10.08 <i>gas2p</i>	SPBC342.03 <i>gas4p</i>	SPAC11E3.13C <i>gas5p</i>
Amino acids	542	459	456	510
Expected Mw	58,1	50,6	50,7	53,6
Signal sequence	M1-A19	M1-A19	M1-P27	M1-A22
GluTD	S20-I326	Y20-S332	I28-G337	D23-A336
Putative catalytic site	E157 y E258	E156 y E263	E157 y E257	E159 y E261
Cys-rich	C345-K422	C350-C449	NO	NO
Ser-rich	A435-S520	NO	T419-S435	S423-T489
GPI	YES	NO	YES	YES

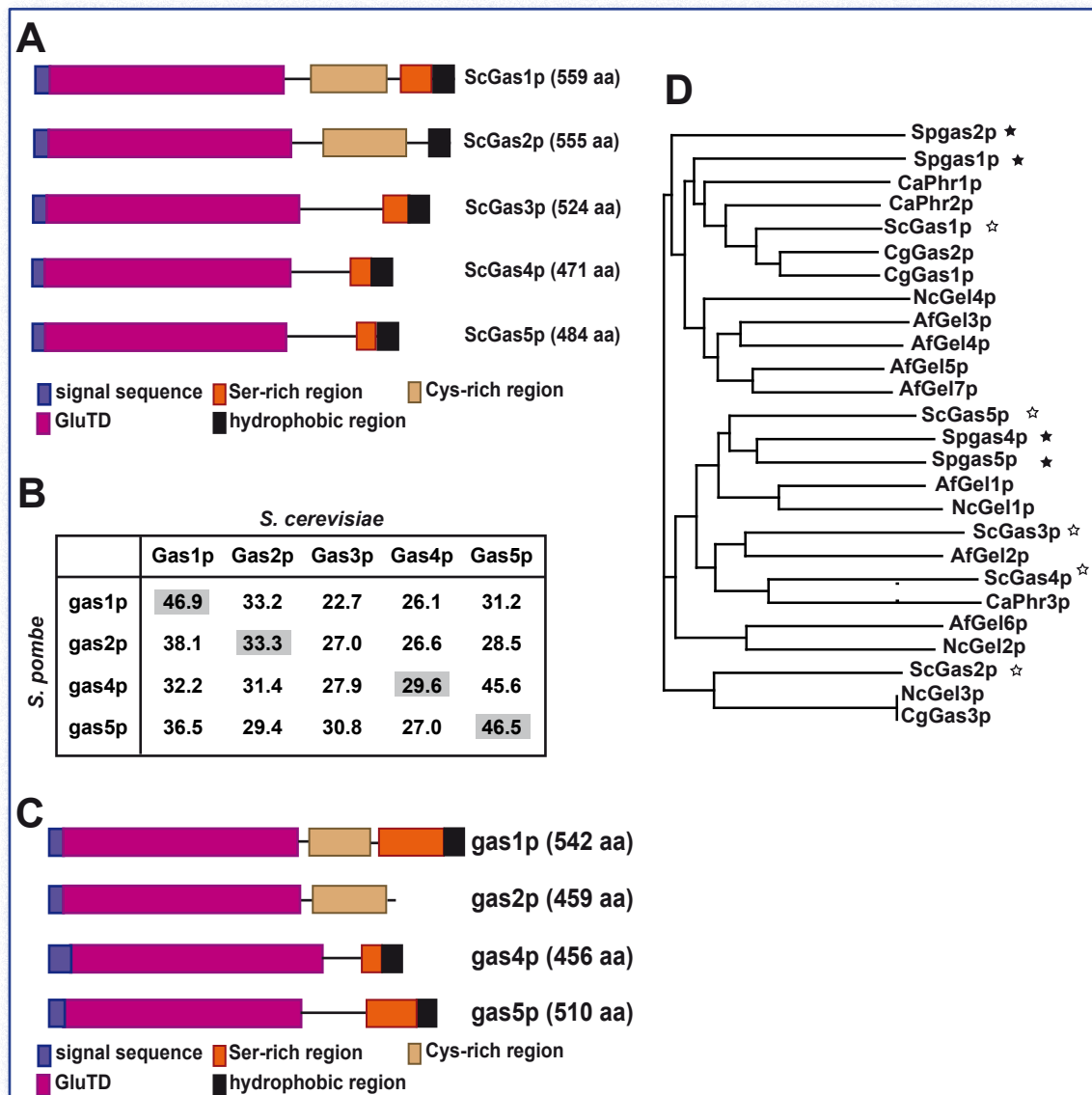


Figure 25. Characteristics of *S. pombe* GH72 proteins. (A) Schematic representation of the modular organization of *S. cerevisiae* Gas1p, Gas2p, Gas3p, Gas4p and Gas5p (adapted from Ragni et al., 2007b). (B) Percentage of identity between *S. cerevisiae* and *S. pombe* GH72 proteins. (C) Schematic representation of the modular organization of *S. pombe* gas1p, gas2p, gas4p and gas5p. (D) Dendrogram of the N-terminal region of proteins belonging to the GH72 family obtained with Clustal X. Sequences from *S. pombe* are Spgas1p (SwissProt code Q9P378), Spgas2p (Q9USU5), Spgas4p (Q9Y7Y7), Spgas5p (O13692); *S. cerevisiae*: Gas1p (P22146), Gas2p (Q06135), Gas3p (Q03655), Gas4p (Q08271), Gas5p (Q08193); *Candida albicans*: CaPhr1p (P43076), CaPhr2p (O13318), CaPhr3p (Q9P8R2); *C. glabrata*: CgGas1p (Q8X0Z7), CgGas2p (Q8X0Z6), CgGas3p (Q8X0Z5); *A. fumigatus*: AfGel1p (O74687), AfGel2p (Q9P8U4), AfGel3p (Q9P8U3), AfGel4p (Q4WHH9), AfGel5p (XP_746993), AfGel6p (XP_754302), AfGel7p (XP_751119); *Neurospora crassa*: NcGel1p (Q8X0X4), NcGel2p (Q8X094), NcGel3p (Q873D1), NcGel4p (Q872H7) and NcGel5p (Q7S962). White asterisk highlight *S. cerevisiae* proteins and black asterisks refer to *S. pombe* proteins.

respectively). However, it was difficult to determine which of the *S. pombe* proteins was more related to ScGas2p, ScGas3p and ScGas4p, as the percentage of identity were very similar. Thus, the modular structure of the *S. pombe* proteins was analysed (Fig. 25C and Table 3). The four proteins have a signal peptide (19-26 residues) in the N-terminus followed by the putative catalytic domain (GluTD, of ~300 aminoacids), where the glutamic acids that constitute the catalytic pair in other member of the family –i.e. glutamates E161

and E262 in ScGas1p (Carotti et al., 2004)- are perfectly conserved in the four *S. pombe* proteins (Table 3). Additionally, the SPAC19B12.02c and SPBC29A10.08 products have a Cys-rich region and the proteins encoded by SPAC19B12.02c and SPAC11E3.13c, a Ser-rich domain of 85 and 66 residues, respectively, whereas this region is shorter in the product of SPBC342.03 (18 aminoacids) and is absent in SPBC29A10.08. Finally, the proteins encoded by SPAC19B12.02c, SPBC342.03 and SPAC11E3.13c were classified as GPI-anchored-

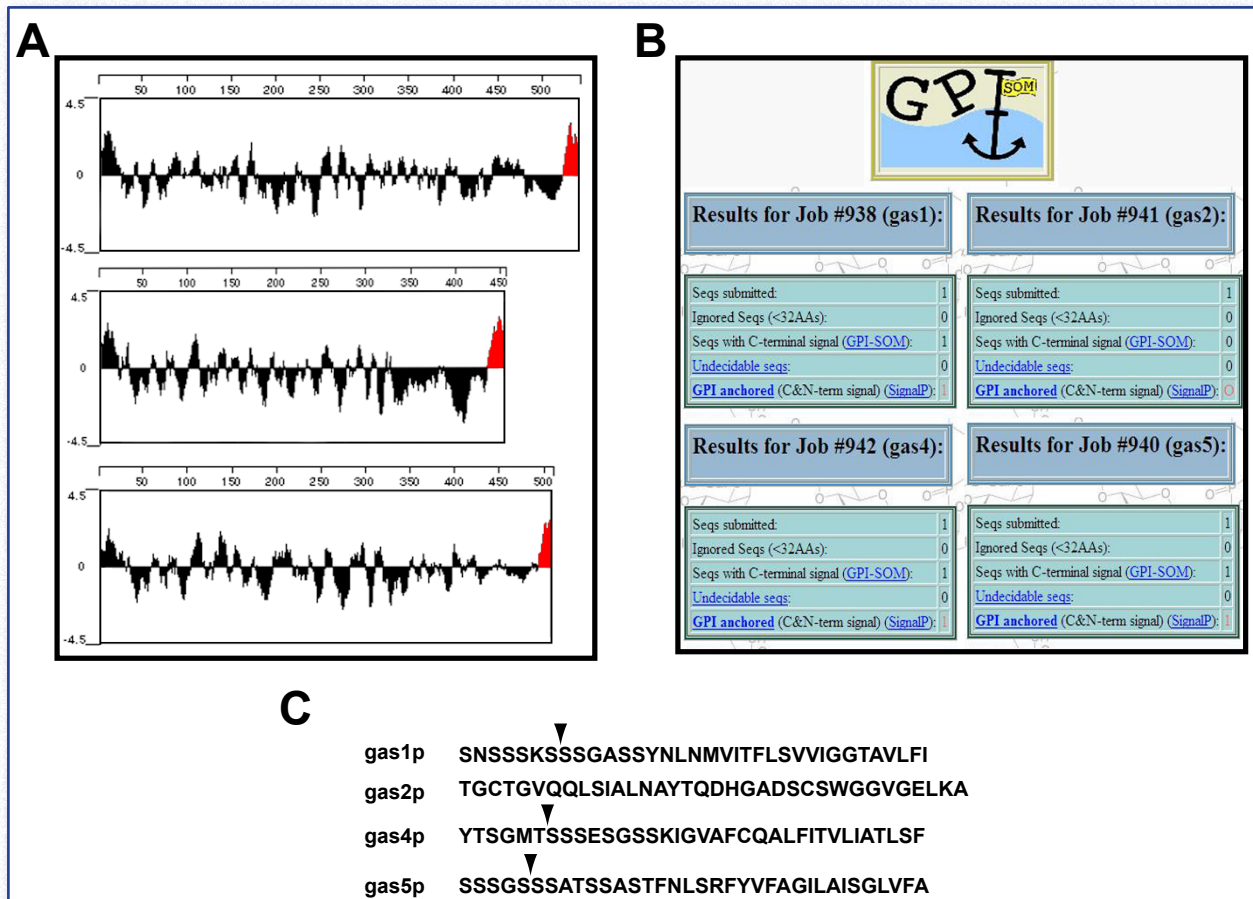


Figure 26. gas1p, gas4p and gas5p contain a hydrophobic signal at the C-termini for GPI-attachment. (A) Hydrophobicity profile of gas1p, gas4p and gas5p. The protein sequences were analyzed with *Protean software (Lasergene)*. The hydrophobic regions at the C-termini are highlighted in red. (B) gas2p lacks the signal for a GPI attachment. The GH72 protein sequences retrieved from the database were analyzed using the bioinformatic *GPI-SOM* tool. (C) Cleavage points for GPI attachment. The C-terminal regions are shown, and the cleavage site proposed by *GPI-SOM* is indicated.

membrane glycoproteins by *GPI-SOM* and *DGPI* (Expasy), with a theoretical molecular weight of 58.1, 50.7 and 53.6 kDa, respectively. On the other hand, the product of SPBC29A10.08 (50.6 kDa) apparently lacks a signal for this type of modification, which makes it different from the rest of the GH72 members. Thus, the modular structure of the protein encoded by SPAC19B12.02c was most similar to that of ScGas1p (GluTD-Cys-Ser-GPI), whereas the product of SPBC29A10.08 looked like ScGas2p, since it possessed a GluTD-Cys structure, although the former one lacked the GPI motif (Fig. 25A and B). Finally, the products of SPBC342.03 and SPAC11E3.13c were similar to ScGas4p and ScGas5p (GluTD-Ser-GPI). Considering every data together, the ORFs SPAC19B12.02c, SPBC29A10.08, SPBC342.03 and SPAC11E3.13c were designated *gas1⁺*, *gas2⁺*, *gas4⁺* and *gas5⁺*, respectively.

As the primary sequence of the N-terminal region is sufficient to discriminate between the two subfamilies, a multiple sequence alignment of the N-terminal region of GH72 fungal proteins was generated using ClustalX (Fig. 25D). The dendrogram was consistent with our previous observations, as gas1p was close to ScGas1p in the GH72⁺ subfamily and gas4p and gas5p were in the GH72⁻ branch near ScGas4p and ScGas5p. As it had been observed by Ragni *et al.* (2007b), gas2p was not in the GH72⁺ branch, although it possessed the Cys-rich region.

(XIII)- 1.2. gas2p differs from other GH72 family members

The absence of a hydrophobic sequence acting as GPI-anchoring signal at the C-terminus of gas2p was very unusual, since all known members of this family show a hydrophobic sequence in

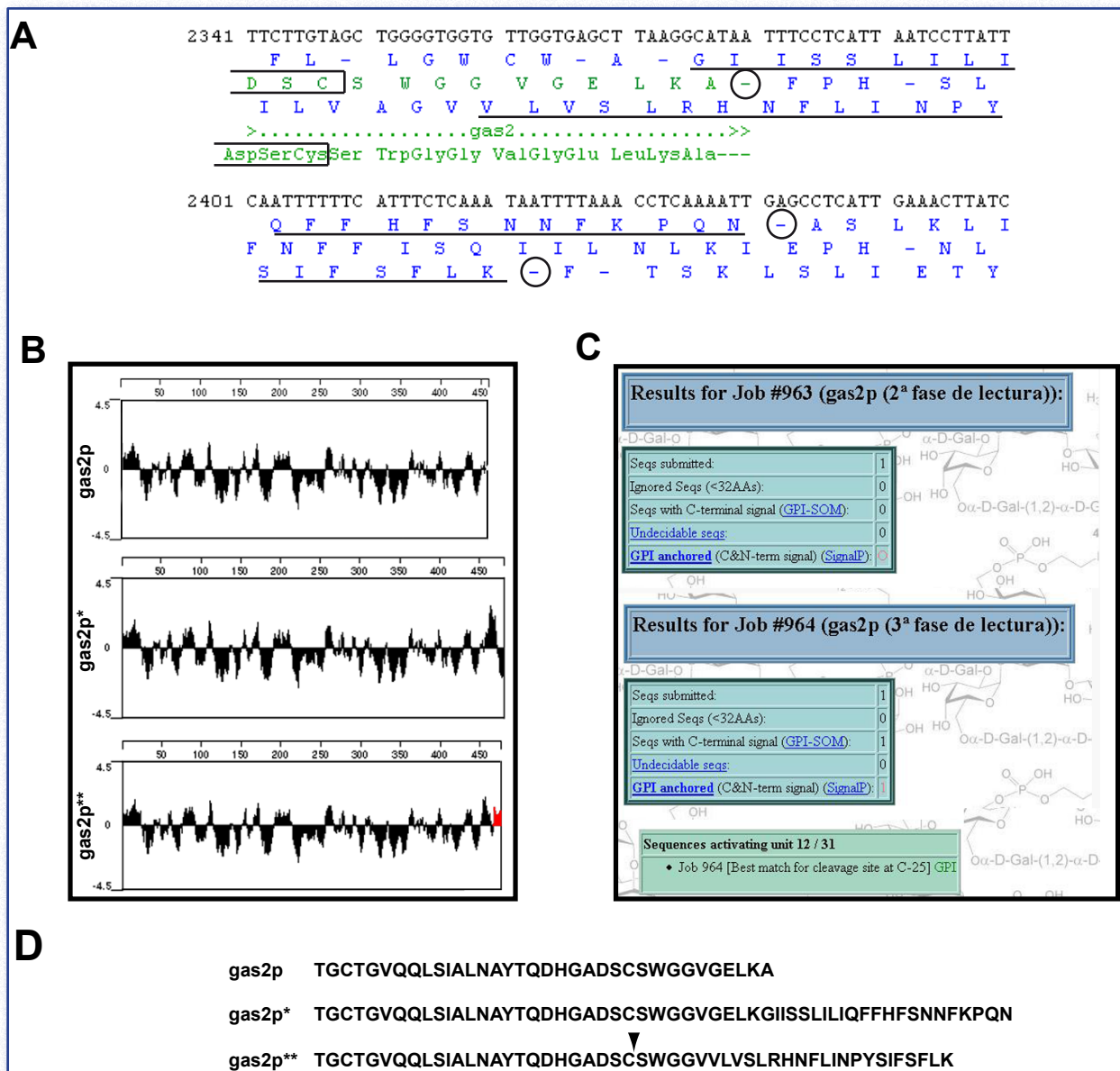


Figure 27. Analysis of the different reading frames of *gas2⁺*. (A) alternative reading frames for the 3' region of *gas2⁺*. The nucleotide sequence was analyzed with *Seqbuilder* (*Lasergene*). The alternative reading frames are shown. (B) Hydrophobicity profile of *gas2p*, *gas2p** and *gas2p***. The sequences were analyzed using the *Protean* (*Lasergene*). The hydrophobic regions at the C-termini are highlighted in red. (C) *gas2p*** shows a putative site for GPI attachment. *gas2p*, *gas2p** and *gas2p*** were analyzed using the bioinformatic *GPI-SOM* tool. (D) Proposed site for GPI attachment.

the C-terminus (Fig. 26A). The *S. pombe* *gas1p*, *gas4p* and *gas5p* proteins contain putative GPI attachment sites with predicted cleavage points at positions -28, -29 and -30, respectively (Fig. 26C), as determined by *GPI-SOM*. However, *gas2p* lacks this hydrophobic region and, therefore, there are not putative sites for GPI attachment. This observation led Ragni and co-workers to suggest that *gas2p* was either non-functional or an unusual secreted protein (2007b). For this reason, we decided to test whether the *gas2⁺* sequence retrieved from the database (*GeneDB*) was correct before starting the characterization of *gas2p*.

The simplest hypothesis to explain this fact is that the sequence present contains a sequencing error, generating a frameshift near to the C-terminus. Since the GluTD and the Cys-rich region are present in *gas2p*, we assumed that, if there had been a change in the reading frame, it should have occurred after the Cys-rich domain. Figure 27A shows the nucleotide sequence of this region and the three possible reading frames. If there was a change in the reading frame, two alternative amino acid sequences, slightly longer than *gas2p*, could be generated, which were termed *gas2p** and *gas2p***, respectively (the name *gas2p* was

reserved for the aminoacidic sequence obtained from the *GeneDB* database).

We found that *gas2p^{**}* generated a hydrophobic sequence at the C-terminus (Fig. 27B), but *big-PI Predictor* did not detected a putative GPI-anchor in *gas2p^{*}* or *gas2p^{**}*. However, a different tool (*GPI-SOM*) indicated that *gas2p^{**}* could contain a signal for post-translational processing and addition of a GPI motif (Fig. 27C), with a predicted cleavage point at position -26, immediately after the Cys-rich region (Fig. 27D). For this reason, we confirmed that the *gas2⁺* nucleotide sequence and the proposed reading frame were correct. The final region of the *gas2⁺* gene was PCR-amplified from a wild-type strain using specific primers and both strands were sequenced. The results confirmed that the sequence in the database was correct and that there were not frameshifts. These results therefore indicate that *gas2p* belongs to the GH72 family, since it contains a GluTD region and the conserved residues which constitute the catalytic pair, but it differs from other GH72 members as it lacks the GPI anchor. One possibility is that *gas2⁺* might have evolved losing its functionality and remaining in the genome as a pseudogene. Therefore, part of the experimental work has focused on testing whether *gas2⁺* is a real gene, together with a detailed study of *gas2p* localization and catalytic activity, to confirm that it belongs to the β -1,3-glucanosyl-transferase family.

(XIII)- 2. Expression of *gas⁺* genes during the *S. pombe* life cycle

(XIII)- 2.1. *gas1⁺*, *gas2⁺* and *gas5⁺* are periodically expressed during mitotic growth

Before analyzing the newly identified genes and their encoded proteins, we analysed the transcription profile of the four ORFs during the cell cycle. Total RNA was extracted from a wild-type strain growing exponentially in rich media and was used for Northern-blot analysis. Specific DNA probes for each of the genes were used to detect

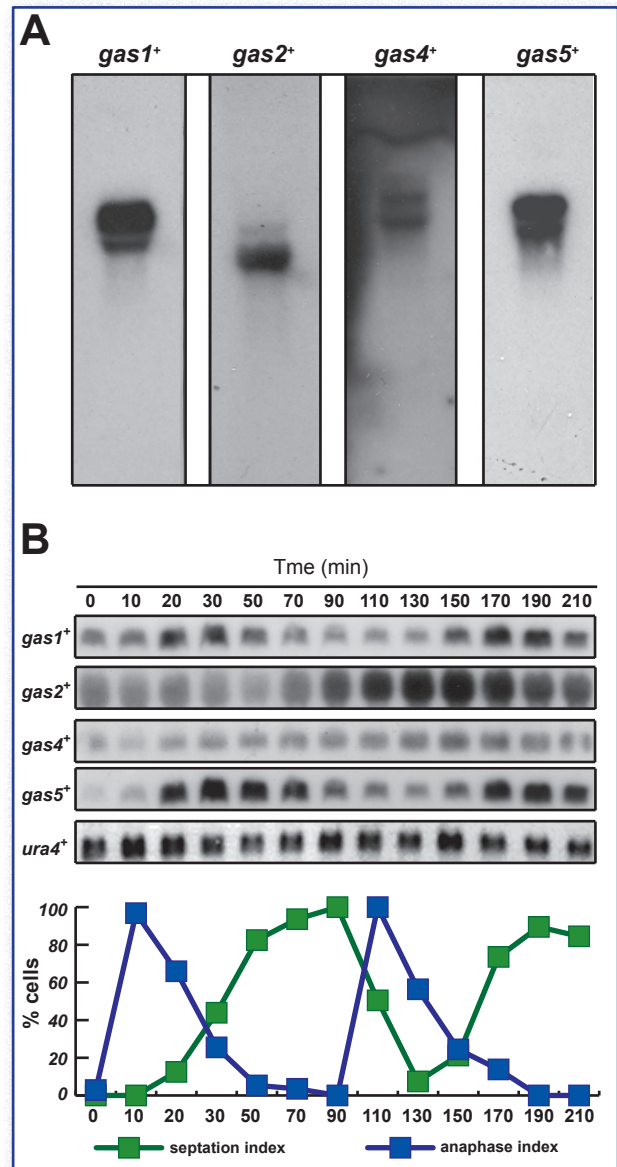


Figure 28. Expression of *gas⁺* genes during vegetative growth. (A) The *S. pombe* GH72 genes are expressed in vegetative growth to a different extent. mRNA from an exponentially growing wild-type strain was hybridized with specific probes for *gas1⁺*, *gas2⁺*, *gas4⁺* and *gas5⁺*. (B) Expression of *gas1⁺*, *gas2⁺*, *gas4⁺* and *gas5⁺* along the cell cycle. Synchrony was induced by arrest-release of a *cdc25-22* mutant and samples were taken at the indicated time points (minutes). RNA was hybridized with the same probes employed in (A). *ura4⁺* was used as a loading control. The graph represents the anaphase index (■) or the septation index (■) at each time point. In this experiment, the peak of septum formation occurred at 70-90 min.

their transcripts. To prevent crossed hybridization, the DNA probes were internal fragments of 400-500 bp obtained by PCR and corresponding to the 3' regions, as they are more different. As it can be seen in Figure 28A, transcripts were detected for the four genes, even for *gas2⁺*. This result rules out the possibility that *gas2⁺* is a pseudogen. Additionally, there was a good correlation between

the calculated length of each ORF and the size of the mRNA, except for *gas4*⁺. According to the information retrieved from the *GeneDB*, *gas2*⁺ and *gas4*⁺ have a similar nucleotide number, but *gas4*⁺ transcript was longer than predicted. Another observation was that detection of *gas4*⁺ transcript required a longer exposition time than the other genes (36 hours vs 30 minutes), indicating that this gene is transcribed at a lower level than its homologues during vegetative growth.

Once assessed that the four genes were expressed, mRNA levels along the cell cycle were analyzed. Therefore, expression was monitored by Northern-blot in a *cdc25-22* mutant that had been synchronized in G2 by arrest at the restrictive temperature and then released at 25°C. When the level of the different mRNAs were examined, we found that the expression of three of them (*gas1*⁺, *gas2*⁺ and *gas5*⁺) was periodic during the cell cycle (Fig. 28B). Interestingly, the maximum levels of expression of these genes were achieved at different moments. Thus, while *gas1*⁺ and *gas5*⁺ showed a peak during mitosis, just prior to septation, *gas2*⁺ transcript levels were higher during G2 (Fig. 28B). In sharp contrast, the level of *gas4*⁺ mRNA was very low but constant along the cell cycle, with no observable periodic variations (Fig. 28B). These results allowed us to conclude that the four identified genes can perform their functions at different moments during the life cycle. More precisely, *gas1*⁺, *gas2*⁺ and *gas5*⁺ might act during vegetative growth, but in different moment of the cell cycle.

(XIII)- 2.2. *gas4*⁺ expression peaks during the sporulation process

Since *gas4*⁺ expression was very low and constant during vegetative growth, it could be possible that this gene is expressed in other moments of the life cycle, as it happens with the differential expression of *ScFKS1* and *ScFKS2*, or their fission yeast counterparts *cps1*⁺/*bgs1*⁺, *bgs2*⁺, *bgs3*⁺ and *bgs4*⁺ (Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2003; Mazur *et al.*, 1995).

To test this possibility, Northern-blot was used to monitor *gas4*⁺ expression in a *pat1*-driven synchronous meiosis. The *pat1*p kinase is required to inhibit meiosis in diploid cells (Beach, 1985; McLeod and Beach, 1988). When homozygous *h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114* thermosensitive mutants are starved for nitrogen and incubated at the restrictive temperature, inactivation of the kinase activity allows the induction of synchronous meiosis (Fig. 29A). Samples were collected at different times after transfer to the restrictive temperature and used for Northern-blot analysis. Progression through meiosis was monitored by DAPI staining (Fig. 29B). *gas4*⁺ transcript was present in low amounts at the time when the diploid cells were shifted to the restrictive temperature (time 0), but its expression was strongly induced during meiosis and reached a maximum level during meiosis II (6 h), coincident with the time at which the first mature spores could be detected (Fig. 29C). This induction profile is similar to the meiosis-specific genes classified as the late group, whose products are mainly involved in spore formation (Mata *et al.*, 2002). What is more, the expression pattern observed for *gas4*⁺ during sporulation is coincident with the one recently described for this gene in the analysis of the global gene expression during sporulation using microarrays (Fig. 29D) (Rustici *et al.*, 2004).

The expression pattern of the three genes periodically expressed during vegetative growth was not analysed during sporulation. However, the data contained in the *GeneDB* database indicate that none of them is induced during this process, but their levels are reduced during sporogenesis (Fig. 29D) (Mata *et al.*, 2002).

These results suggest that there is a differential expression pattern for each one of the *S. pombe* GH72 genes. While the *gas4*⁺ product would exert its function during sporulation, the other proteins would act during vegetative growth. Additionally, these three genes may display different (non-redundant) functions, as they reach their maximum levels of expression in different moments of the cell cycle.

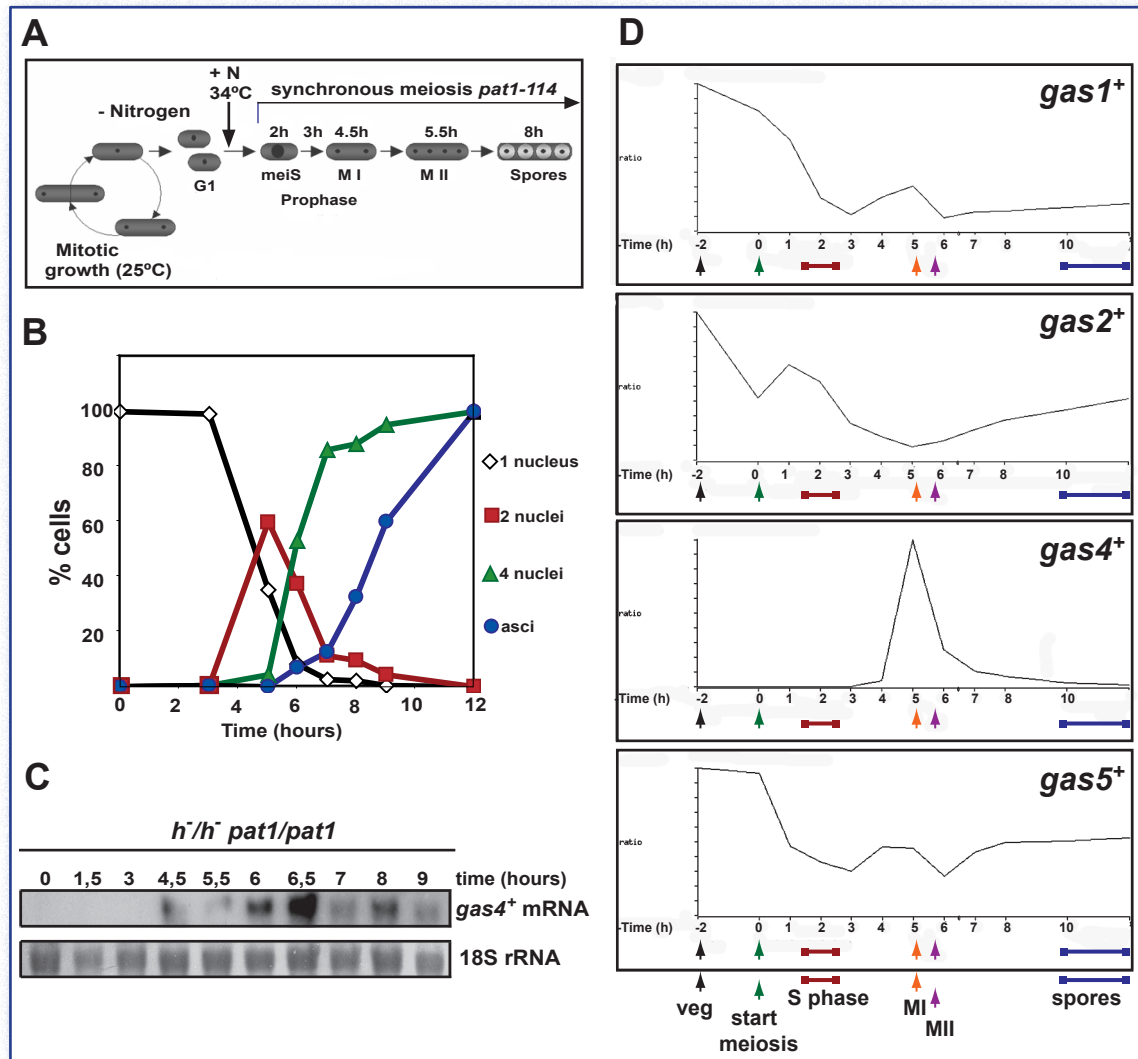


Figure 29. Expression of *gas⁺* genes during meiosis. (A) Schematic representation of *pat1*-driven synchronous meiosis. Vegetatively growing cells were blocked in G1 by nitrogen starvation over ~14 hours and were induced to enter meiosis by inactivating the *pat1p* kinase at 34 °C (time 0 in B and C). The approximate timing to the major meiotic landmarks is indicated. (B) Synchronous meiosis of strain S964. Meiotic progression was followed by DAPI staining of nuclei, and sporulation was checked with microscopic observation of asci. The percentage of mononucleate, binucleate and tetranucleate cells and spores at each time point are represented. (C) Northern blot analysis of *gas4⁺* expression during the synchronous meiosis shown in (B). 18S rRNA levels are shown as loading control. (D) Expression pattern of *gas⁺* genes during meiosis, according to the data retrieved from *GeneDB*.

(XIV)- RESULTS

**Functional characterization of the
vegetative *gas*⁺ genes**

(XIV)- RESULTS: Functional characterization of the vegetative *gas*⁺ genes

(XIV)- 1. *gas1p* is indispensable during vegetative growth, but the other proteins are not

β -glucanase-transferases play an important role in cell wall remodelling in yeast and fungi in different moments of their life cycle. In order to investigate whether *gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ or *gas5*⁺ have any role in cell wall remodelling during the fission yeast cell cycle, we generated null mutants lacking each one of the genes to study the effects of the absence of the proteins. *gas2*⁺, *gas4*⁺ and *gas5*⁺ deletants were obtained very easily. However, it was more difficult to obtain a *gas1* Δ null mutant and different strategies were used, as described below.

(XIV)- 1.1. Strategy 1: Deletion of the coding region

The first strategy to generate null mutants lacking each of the *S. pombe* GH72 genes was to delete the coding region using a PCR-based system (Wach, 1996). Therefore, the entire coding sequences were replaced by the *KanMX4* cassette (*gas1* Δ ::*KanMX4*, *gas2* Δ ::*KanMX4*, *gas4* Δ ::*KanMX4* and *gas5* Δ ::*KanMX4*). For this purpose, DNA fragments of 300-500 bp corresponding to the 5' and 3' flanking regions of the genes were fused to the *KanMX4* cassette (Fig. 30A) and these cassettes were transformed into a wild-type haploid strain. Only transformants lacking the *gas2*⁺ (YMMR16), *gas4*⁺ (YMMR17) and *gas5*⁺ (YMMR18) were obtained, which were checked by PCR using specific primers (Fig. 30B-D). Several transformants were analyzed in each case, selecting those generating a specific band of the right size. The expected bands were unique for *gas2* Δ ::*KanMX4* and *gas4* Δ ::*KanMX4* (Fig. 30B-C). In contrast, two and even three bands were

amplified from DNA from the putative *gas5* Δ null mutants (Fig. 30D). Since one of the amplified fragments had the expected size and the unspecific bands were absent in the wild-type negative control, we assumed that the *gas5*⁺ gene had been correctly deleted in those transformants.

Next, the null mutants were subjected to a preliminary morphologic study. As the genes under study code for putative proteins involved in cell wall biosynthesis or remodelling, the mutants might show morphologic or cell wall-related defects. No significant differences were observed in *gas2* Δ and *gas4* Δ mutants when compared to the parental wild-type strain during vegetative growth. A more precise characterization of both genes will be reported in the following chapters of this Memory. In sharp contrast, very different results were obtained for the YMMR18 mutant (the presumptive *gas5* Δ strain). Strikingly, microscopic observation revealed severe defects in coupling mitosis to septation. As shown in Figure 31A, a) some cells showed a cell separation defect, b) other cells had abnormal deposition of cell wall material, c) a third group of cell display aberrant double septa, leaving an anucleated compartment inside, and d) other showed a defect in nuclear migration during mitosis. It was frequent to observe cells in which one of the daughter nuclei had not correctly migrated to the cell end and remained in the medial region during septation, preventing a correct septum synthesis, similarly to *cut* mutants (Hirano *et al.*, 1986; Samejima *et al.*, 1993). All of these defects were not expected for a protein involved in cell wall remodelling and prompted us to confirm that they were due to the absence of *gas5p*.

To this end, *gas5*⁺ (cloned in plasmid pMMR9) was introduced in the mutant strain to test for complementation of the observed defects. When YMMR18 cells carrying vector or the pMMR9 plasmid were incubated in minimal media, the above mentioned phenotypes were not observed (data not shown). Since the nuclear migration defects were only observed during growth in rich media, we were unable to confirm whether the *gas5* Δ deletion was responsible of this phenotype. Our explanation for these differences is that

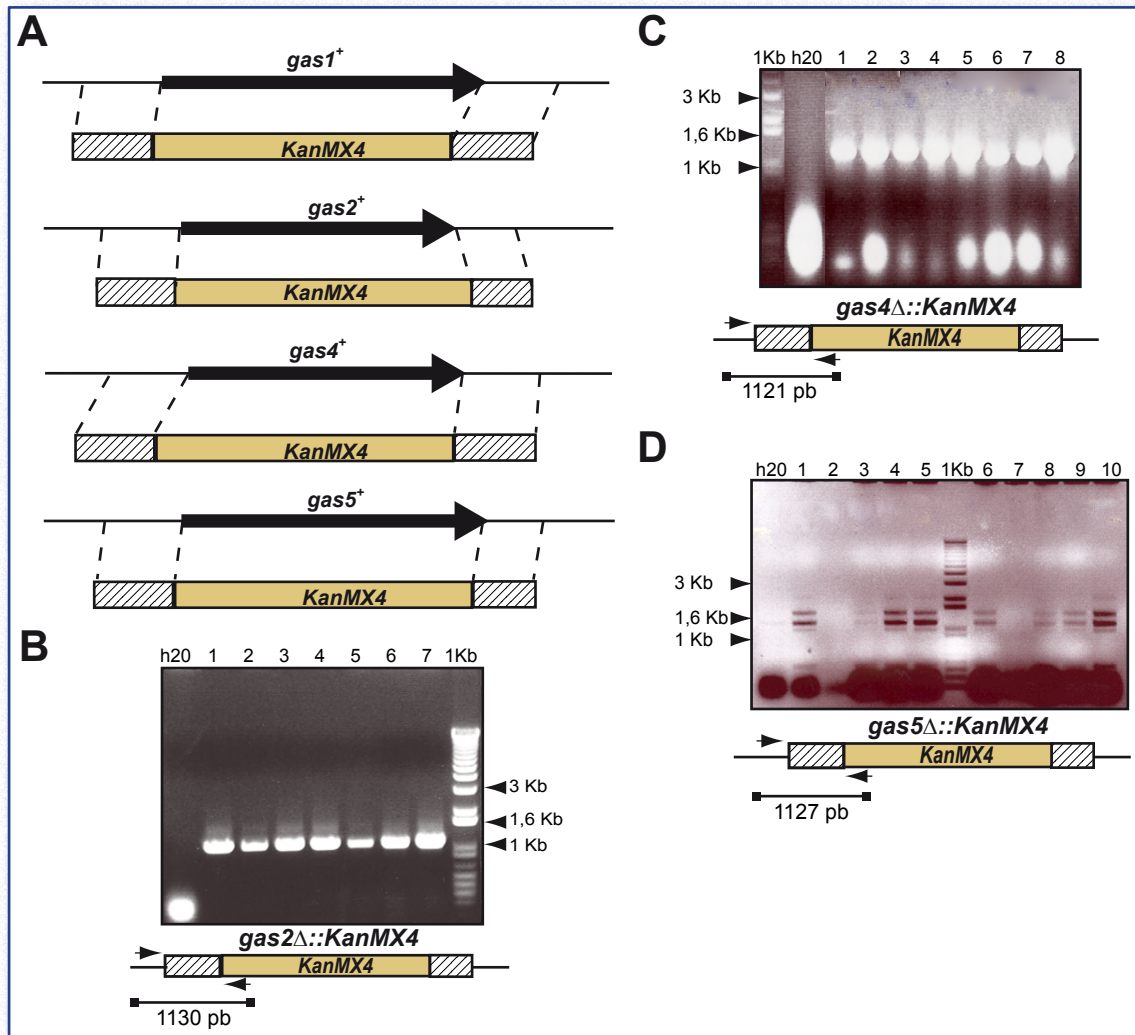


Figure 30. Deletion of *gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ and *gas5*⁺. (A) Deletion cassettes generated to replace *gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ and *gas5*⁺ coding region by the *KanMX4* cassette, which confers resistance to G418. (B) PCR analysis of *gas2*::*kanMX4* mutants. Several transformants (YMMR16) were analyzed by PCR using specific primers (one annealing outside the deletion cassette and one internal to the cassette). The expected size of the fragment was 1130 bp. (C) PCR analysis of *gas4*::*KanMX4* mutants. Several transformants (YMMR17) were checked in a similar way to that described in (B). The expected size of the band was 1121 bp. (D) PCR analysis of *gas5*::*KanMX4* mutants. PCR confirmation of transformants carrying deletion of *gas5*⁺ (YMMR18). The expected size of the band was 1127 bp

perhaps a longer duplication rate in minimal media would provide the cells time enough to finish the mitotic events accurately.

A second approach was needed to confirm whether YMMR18 strain actually lacked the *gas5*⁺ gene. This was accomplished using the Southern-blot technique. Restriction sites that generated bands of different size depending on the allele present were selected to digest genomic DNA. The specific probe selected hybridizes to an internal region of the coding region, detecting fragments of 1.1 Kb and 7 Kb in the wild-strain, whereas it should not hybridize with the deletion strain (Fig. 31B). The results showed that the wild-type allele (1.1 and 7 Kb bands) was present in the

parental strain and in the transformants analyzed, indicating that they contain a wild-type copy of the *gas5*⁺ gene and that the observed defects were not due to the lack of *gas5p*. The fact of YMMR18 cells were resistant to the G418 suggests that the *gas5* Δ ::*KanMX4* cassette had been integrated in the genome interrupting another ORF, which could be responsible of the nuclear migration defects observed.

BLAST searches indicated that the flanking regions of the *gas5* Δ ::*KanMX4* cassette had no significant homologies in the genome. Thus, the same cassette was used to delete *gas5*⁺ in another wild-type strain (h116). The transformants (YMMR32) were confirmed by PCR (Fig. 32A),

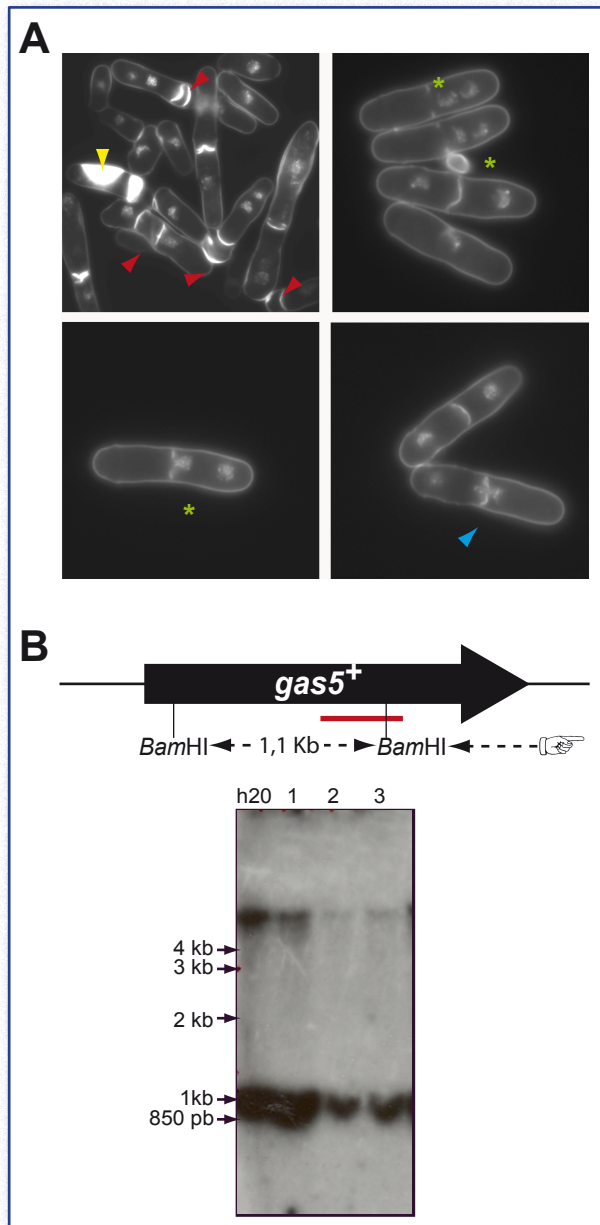


Figure 31. YMMR18 transformants are not true *gas5* Δ null mutants. (A) Phenotype of the YMMR18 strain. YMMR18 cells were incubated in rich medium at 32°C and DAPI and aniline blue stained before fluorescence images were obtained. Red arrowheads point to multiple septa and yellow arrowheads highlight abnormal patches of cell wall material. Green asterisks indicate those cells whose nuclei are mis-positioned. Notice the nucleus strangled by the septa, marked by a blue arrowhead. (B) Southern-blot analysis of strain YMMR18. DNA from a wild-type strain and from several YMMR18 transformants was digested with *Bam*HI and hybridized with a specific probe for *gas5*⁺ (indicated in red). Bands of 1114 bp and 7 Kb correspond to the wild-type allele.

and this time the expected DNA fragment (1127 bp) was amplified and it was a single band (Fig. 30D). To confirm the correct integration, Southern-blot analysis was carried out. Genomic DNA was digested with *Hind*III or *Bam*HI and hybridized with a specific probe for *gas5*⁺. This probe should detect 1.1 Kb and 7 Kb bands (*Bam*HI digestion)

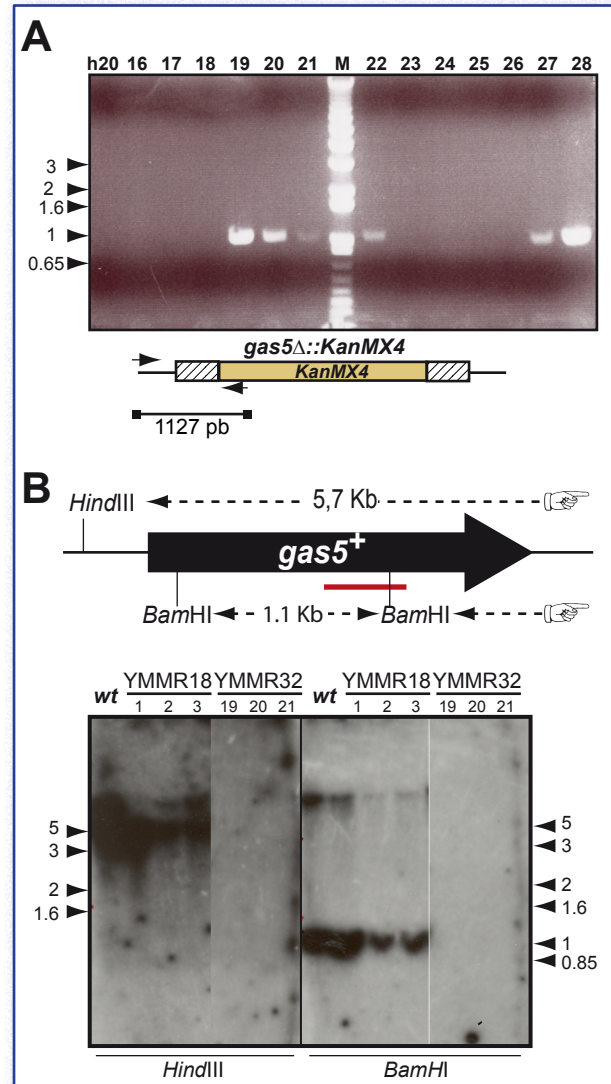


Figure 32. *gas5*⁺ is correctly deleted in strain YMMR32. (A) Transformants were subjected to a PCR analysis using the same primers as in Figure 30D. (B) Analysis of YMMR32 by Southern blot. gDNA from the parental wild-type strain (h116), from three YMMR18 independent clones and from YMMR32 clones were digested by *Hind*III and/or *Bam*HI and hybridized with the specific probe for *gas5*⁺. The 5.7 Kb band (*Hind*III digestion) and the 1.1 and 7 Kb bands (*Bam*HI digested) correspond to the wild-type *gas5*⁺ allele. Molecular size (Kb) is indicated.

or a 5.7 Kb band (*Hind*III digestion) in a wild-type strain, but the probe should not hybridize if *gas5*⁺ had been correctly deleted. As expected, the radioactive signal was only present in the wild-type strain and in YMMR18 transformants, but it was absent in YMMR32 transformants (Fig. 32B). All these results suggested that *gas5*⁺ deletion had been achieved satisfactorily.

Finally, since *gas2* Δ and *gas5* Δ null mutants were obtained in strains of opposite mating-type,

the double *gas2Δ gas5Δ* null mutant (YMMR41) was constructed.

(XIV)- 1.1. Strategy 2: *gas1⁺* silencing using a regulatable promoter

No *gas1Δ* null mutants were obtained after several attempts using haploid cells, suggesting that *gas1⁺* might be essential for cell viability. Consequently, the same cassette was used to transform a diploid strain (HVP24), to obtain heterozygous *gas1⁺/gas1Δ* mutants. However, no transformant grew in selective media (YES + G418). Several possibilities to explain this fact are possible: a) the deletion cassette was not correct; b) *gas1⁺* was essential and the genetic dose was important for cell viability in diploid cells, and c) the chromosome region that contains *gas1⁺* was little susceptible for suffering recombination events.

To discard the first possibility, the deletion cassette was sequenced and it was confirmed that the flanking regions to direct integration to the *gas1⁺* locus were present. Additionally, the *KanMX4* coding region was replaced by the same fragment obtained from the pFA6a*KanMX4* plasmid to rule out the possibility that the *KanMX4* contained a frameshift generated during the PCR reaction. This new cassette was used to transform the wild-type diploid strain, but no G418-resistant transformants were obtained.

Although these results suggested that the *gas1⁺* locus could be defective for recombination, two alternative approaches were designed to generate conditional mutants, in case it were an essential gene. The first strategy was to control *gas1⁺* expression by a regulatable promoter which could be easily repressed. The second was to generate thermosensitive mutants, able to grow at 25°C but not at 37°C.

In order to repress *gas1⁺* expression, a new construction was generated to replace the native promoter by the P81_{*nmt1*} (*no messenger in thiamine*) (Bähler *et al.*, 1998). The construction was flanked by two short regions (80 bp) from the *gas1⁺* 5' UTR (untranslated region) (Fig. 33A). The cassette was transformed in wild-type haploid and diploid cells, plating the transformants in media

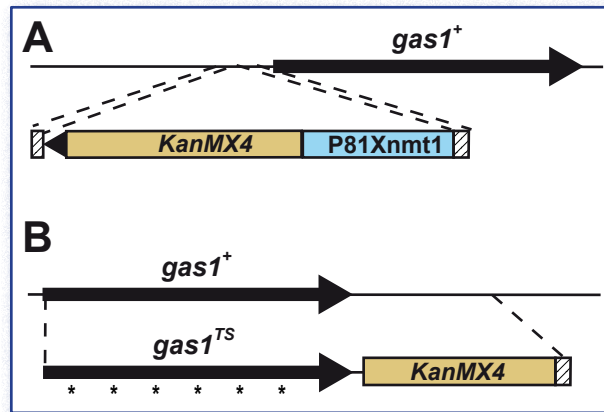


Figure 33. Strategies to achieve *gas1Δ* deletion. (A) Cassette for *gas1⁺* silencing. The regulatable P81_{*nmt1*} promoter would replace the P_{*gas1⁺*} promoter. (B) Cassette designed to obtain thermosensitive *gas1* mutants. Asterisks indicate possible mutations that would have been incorporated during the degenerated PCR reaction.

without thiamine to allow *gas1⁺* expression. Again, no G418-resistant transformants were obtained.

(XIV)- 1.3. Strategy 3: *gas1⁺* thermosensitive mutants

To isolate *gas1* mutants, we introduced random mutations into the *gas1⁺* coding region by the error-prone PCR method (Cadwell and Joyce, 1992). The PCR product was fused to the *Kan^R* gene, followed by a 500 bp sequence homologue to the *gas1⁺* 3' UTR (Fig. 33B). The resulting cassette was used to transform wild-type haploid and diploid cells.

If *gas1⁺* were essential, those mutations abolishing the catalytic activity completely would generate unviable mutants. Silent mutations would generate transformants able to grow at any temperature, as the wild-type strain. Finally, mutations affecting protein folding or the catalytic activity depending on the temperature would generate G418-resistant transformants able to grow at the permissive temperature (25°C), but not at the restrictive temperature (37°C). Thus, in order to select thermosensitive mutants, transformants were plated on rich media + G418 and then, replica-plated and incubated at at 37°C. Those mutants solely growing at 25°C would be selected. However, we did not obtain any thermosensitive mutant, neither a clone carrying synonymous mutations. The latter observation was quite significant, as it suggested that the recombination events were infrequent in this genomic region.

(XIV)- 1.4. Strategy 4: *gas1⁺* interruption

The results described above prompted us to try a last approach to abolish *gas1⁺* biological function. A new *KanMX4* cassette was constructed, which contained two flanking regions corresponding to the *gas1⁺* coding sequence (Fig. 34A). Therefore, recombination would occur inside the coding region, replacing the region containing the GluTD (with the active site). This interruption cassette was transformed in the HVP24 diploid strain (Fig. 34A) and four clones were obtained (YMMR104). Those clones were isolated on YES + G418 and only three of them grew. Each one was analyzed in duplicate by PCR (Fig. 34A). The presence of a 1.6 Kb DNA fragment was indicative of the successful integration of the interruption cassette in some clones (Fig. 34B). A Southern-blot analysis was also carried out to confirm that integration was correct. gDNA was digested with *NheI* or *SpeI* and hybridized with a specific probe for *gas1⁺*. This assay confirmed the presence of the *gas1⁺* allele in the parental strain (2.1 and 1.7 Kb fragments), whereas the transformed clones were heterozygous, as they possessed a wild-type allele and an interrupted one (3.1 and 2.7 Kb fragments, Fig. 34C).

gas1⁺/gas1 Δ ::KanMX4 heterozygous diploids were induced to sporulate and tetrads were dissected on rich media to obtain *gas1 Δ* haploids. Each tetrad generated two viable and two unviable spores, and the viable spores were always *kan^S*, indicating that they carried the *gas1⁺* allele (Fig. 35A). When unviable spores were observed in a microscope, we found that they were able to germinate and generated only two or three cells that finally lysed (Fig. 35C). In contrast, when the tetrad dissection was carried out on osmotically supported medium (YES + 1.2 M sorbitol), the four spores were viable and generated colonies. These colonies were plated in YES + Sorbitol + G418 or YES, and the *Kan^R* colonies were unable to grow in the absence of sorbitol (Fig. 35B). This was confirmed by streaking out wild-type and YMMR106 strains in media without sorbitol, and only the *gas1⁺* strain was able to grow (Fig. 36).

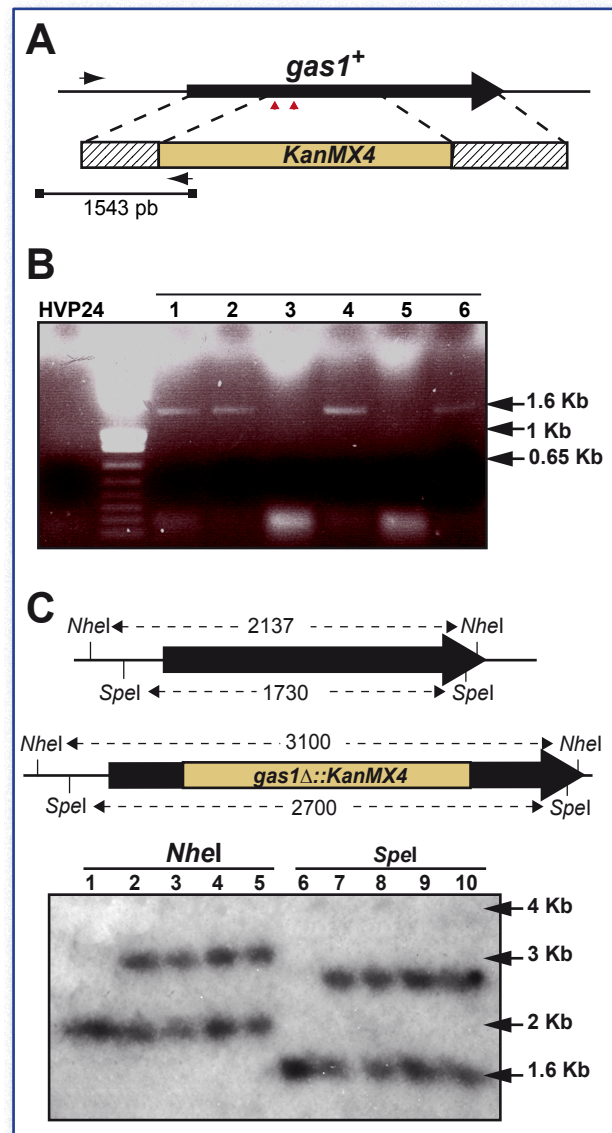


Figure 34. *gas1⁺* interruption. (A) Cassette for interruption of the *gas1⁺* GluTD domain. Arrowheads point the putative catalytic residues. (B) Confirmation of the heterozygous strain YMMR104 by PCR. Transformants were analyzed by PCR using primers internal and external to the interruption cassette. Each transformant was analyzed in duplicate. (C) Southern blot analysis of the heterozygous *gas1⁺/gas1 Δ* strain (YMMR104). DNA from the wild-type strain (lanes 1 and 6) and from different clones (lanes 2-5 and 7-10) was digested with *NheI* (lanes 1-5) or *SpeI* (lanes 6-10). The 2138 bp fragment corresponds to the wild-type allele in lanes 1-5, while the 3108 bp band correspond to the *gas1 Δ ::KanMX4* interruption (lanes 2-5). Similarly, in lanes 6-10, the higher electroforetic mobility fragment (1730 bp) correspond to *gas1⁺* in lanes 6-10, whereas the lower mobility one (2700 bp) is *gas1 Δ ::KanMX4* interruption (lanes 7-10).

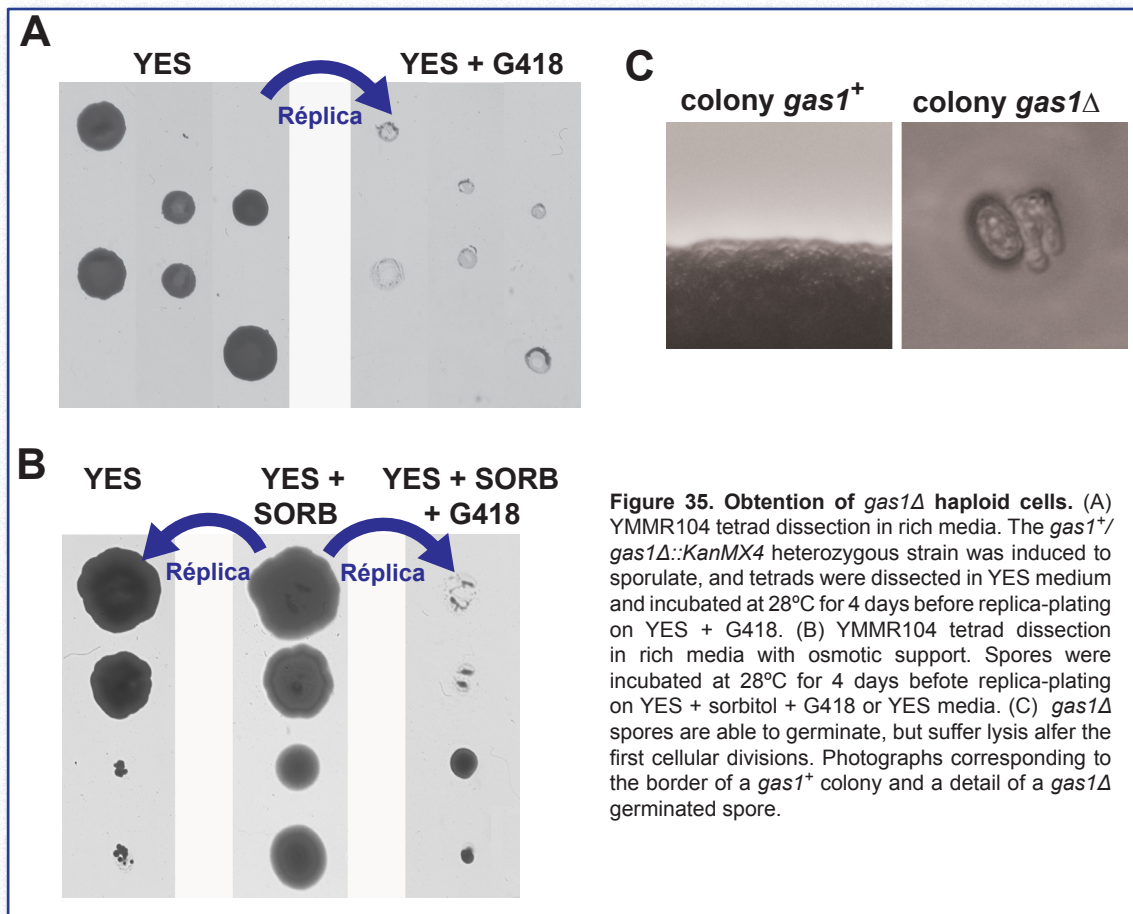


Figure 35. Obtention of *gas1* Δ haploid cells. (A) YMMR104 tetrad dissection in rich media. The *gas1*⁺/*gas1* Δ ::*KanMX4* heterozygous strain was induced to sporulate, and tetrads were dissected in YES medium and incubated at 28°C for 4 days before replica-planting on YES + G418. (B) YMMR104 tetrad dissection in rich media with osmotic support. Spores were incubated at 28°C for 4 days before replica-planting on YES + sorbitol + G418 or YES media. (C) *gas1* Δ spores are able to germinate, but suffer lysis after the first cellular divisions. Photographs corresponding to the border of a *gas1*⁺ colony and a detail of a *gas1* Δ germinated spore.

Thus, these colonies were selected as *gas1* Δ mutants and termed YMMR106.

Finally, to test that the lysis phenotype was due to *gas1*⁺ interruption, the *gas1*⁺ gene was cloned in the pAL-KS vector and the resulting plasmid (pMMR16) was transformed into the YMMR106 strain. *gas1*⁺ expression complemented the lysis phenotype in the absence of sorbitol (data not shown).

These results therefore indicate that *gas1*⁺ is an essential gene during vegetative growth, being required for maintenance of cell integrity while the other three genes -*gas2*⁺, *gas4*⁺ and *gas5*⁺- are dispensable for vegetative growth. Additionally, our results point out to the fact that the genomic regions flanking the *gas1*⁺ ORF are not able to suffer recombination events frequently.

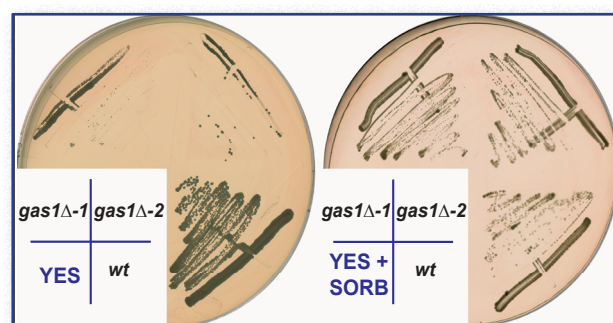


Figure 36. Cells lacking *gas1p* require osmotic support for growth. h116 and YMMR106 strains were plated in rich media with and without sorbitol and incubated at 32°C for 3 days before images were captured.

(XIV)- 2. Mitotic growth of *GH72* null mutants

To analyze whether deletion of the *gas* genes affects the duplication rate, the generation time of the null mutants was analyzed. To this end, strains that had been growing overnight in rich media were inoculated in fresh media and incubated at 32°C and 37°C. As shown Fig. 37A, *gas2Δ* (YMMR16), *gas4Δ* (YMMR17), *gas5Δ* (YMMR32) and double *gas2Δ gas5Δ* (YMMR41) mutants grew at the same rate than their parental strains at both temperatures. Similar results were obtained when the experiment was performed with minimal media (data not shown).

For *gas1Δ* mutants, generation rate was determined in the presence and absence of osmotic support (sorbitol 1.2 M). Wild-type or *gas1Δ* cells grown overnight at 32°C in media containing sorbitol were inoculated in media with or without osmotic support. The results indicated that *gas1Δ* cells were unable to grow in the absence of a osmotic support, in sharp contrast to the *gas1+* strain, consistent with the results of growth in solid media. This phenotype was partially reverted when sorbitol was added to the culture media, although growth rate was slower than in the wild-type strain.

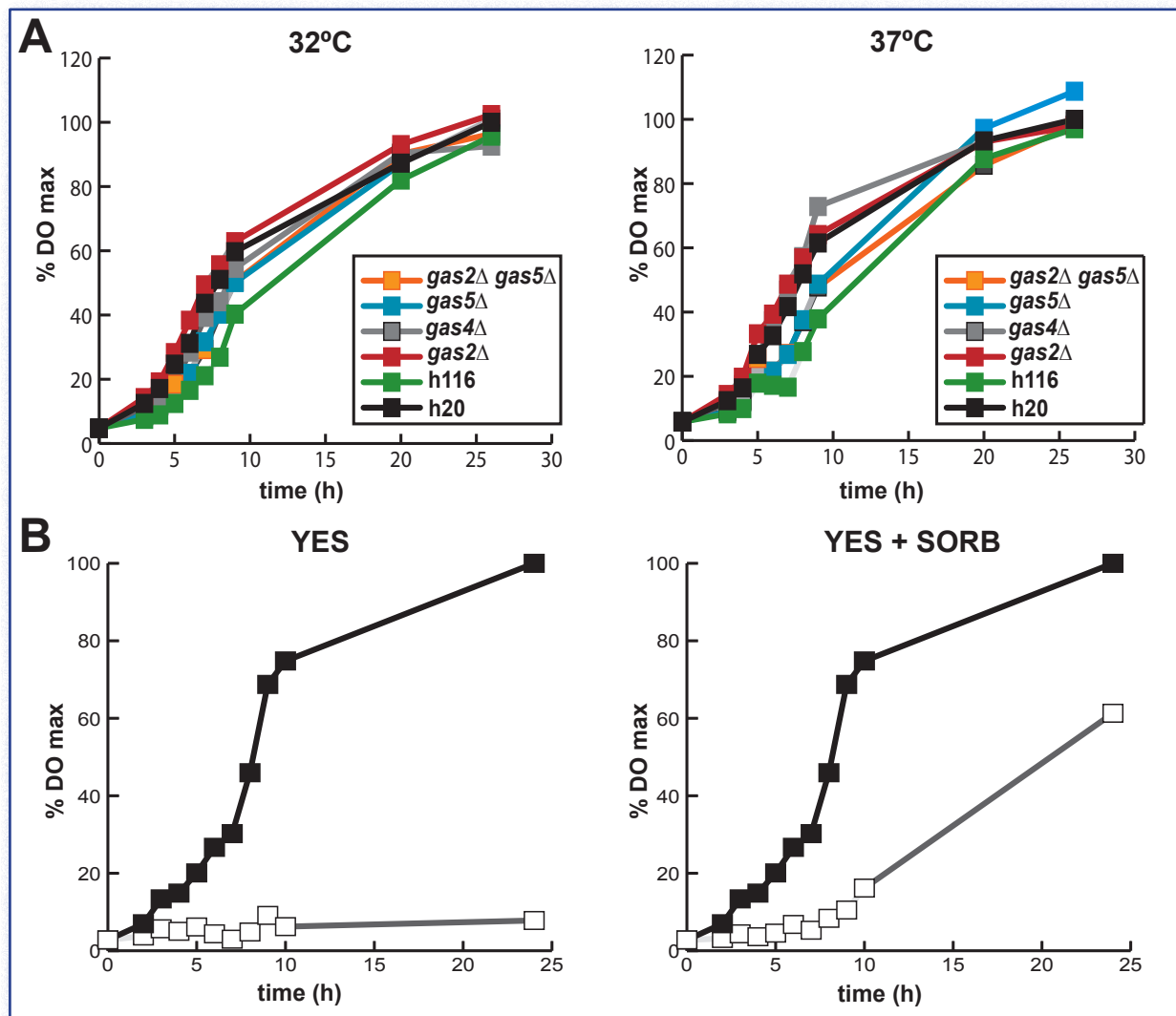


Figure 37. Vegetative growth of *gas1Δ*, *gas2Δ*, *gas4Δ*, *gas5Δ* and *gas2Δ gas5Δ* mutants in liquid cultures. (A) Growth rate of h20 (■) and h116 (■) wild-type strains and *gas2Δ* (■), *gas4Δ* (■), *gas5Δ* (■) and *gas2Δ gas5Δ* (■) mutant strains at 32 °C (left panel) and 37°C (right panel). The growth rate of the mutants does not differ from that of the wild-type strain. (B) Growth rate of *gas1+* (■) and *gas1Δ* (□) strains with (right) and without (left) sorbitol in the culture medium.

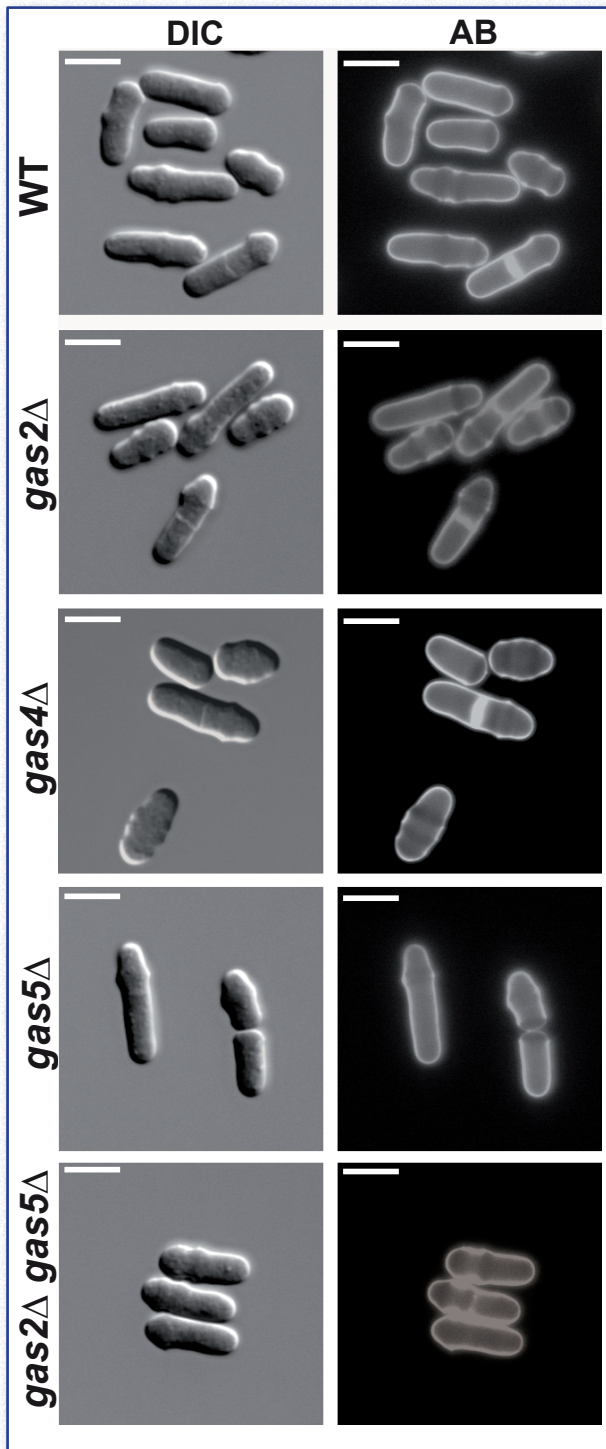


Figure 38. Microscopic aspect of the wild-type strain and *gas2Δ*, *gas4Δ*, *gas5Δ* and *gas2Δ gas5Δ* mutant cells. Wild-type strain (h20) and *gas2Δ*, *gas4Δ*, *gas5Δ* and *gas2Δ gas5Δ* cells (YMMR16, YMMR32 and YMMR41) were incubated in rich media (YES), fixed with ethanol 70% and stained with aniline blue. Phase contrast (DIC) or fluorescent (AB, after aniline blue) photographs are shown. Bars, 10 μ m.

(XIV)- 3. Morphology of GH72 mutants during mitotic growth

The morphology of the mutant cells was analyzed by microscopic observation during vegetative growth at different temperatures, using aniline blue to stain the cell wall β -1,3-glucan (Kippert and Lloyd, 1995). No significant differences were observed in the single or double mutants when compared to the wild type strain (Fig. 38). These results suggested that *gas2p* and *gas5p* are not necessary for cell morphogenesis during vegetative growth in *S. pombe*.

In contrast, *gas1Δ* cells grown in media with sorbitol were shorter and rounder than the wild-type strain, and some lysed cells were also observed (Fig. 39A). In other cells, cell wall staining was not uniform, showing abnormal deposition of cell wall material that stained more intensely with aniline blue (Fig. 39A, arrowheads). When mutant cells were transferred to media without sorbitol and incubated for 2 hours, they stopped growing and around 60% of cells were lysed. Half of the 40% surviving cells had lost their polarity and were rounded (Fig 39B and C). Interestingly, many lysed cells displayed a similar terminal phenotype, appearing as pairs of lysed cells, as if they had suffered lysis during the cell separation process (Fig. 39A).

The fact of the majority of lysed cells appeared as pairs prompted us to analyze whether lysis was due to the action of the *eng1p* and *agn1p* glucanases, involved in cell separation (Dekker *et al.*, 2004; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Therefore, a time-lapse experiment was performed to monitor the cell growth over the time. A thin layer of solid rich medium containing 2% agarose (without sorbitol) was prepared on glass slides. Exponentially growing *gas1Δ* cells were inoculated on the slides and images were captured every minute. Cells were able to grow normally, although some displayed polarity defects, and they could assemble the separation septum properly (Fig. 40). However, when cell separation started and the newly generated ends started to appear rounded, lysis occurred suddenly (minutes 19, 27, 80, 98 and 104 in Fig. 40A; minutes 2 and 11 in Fig. 40B, and minute 8 in Fig. 40C).

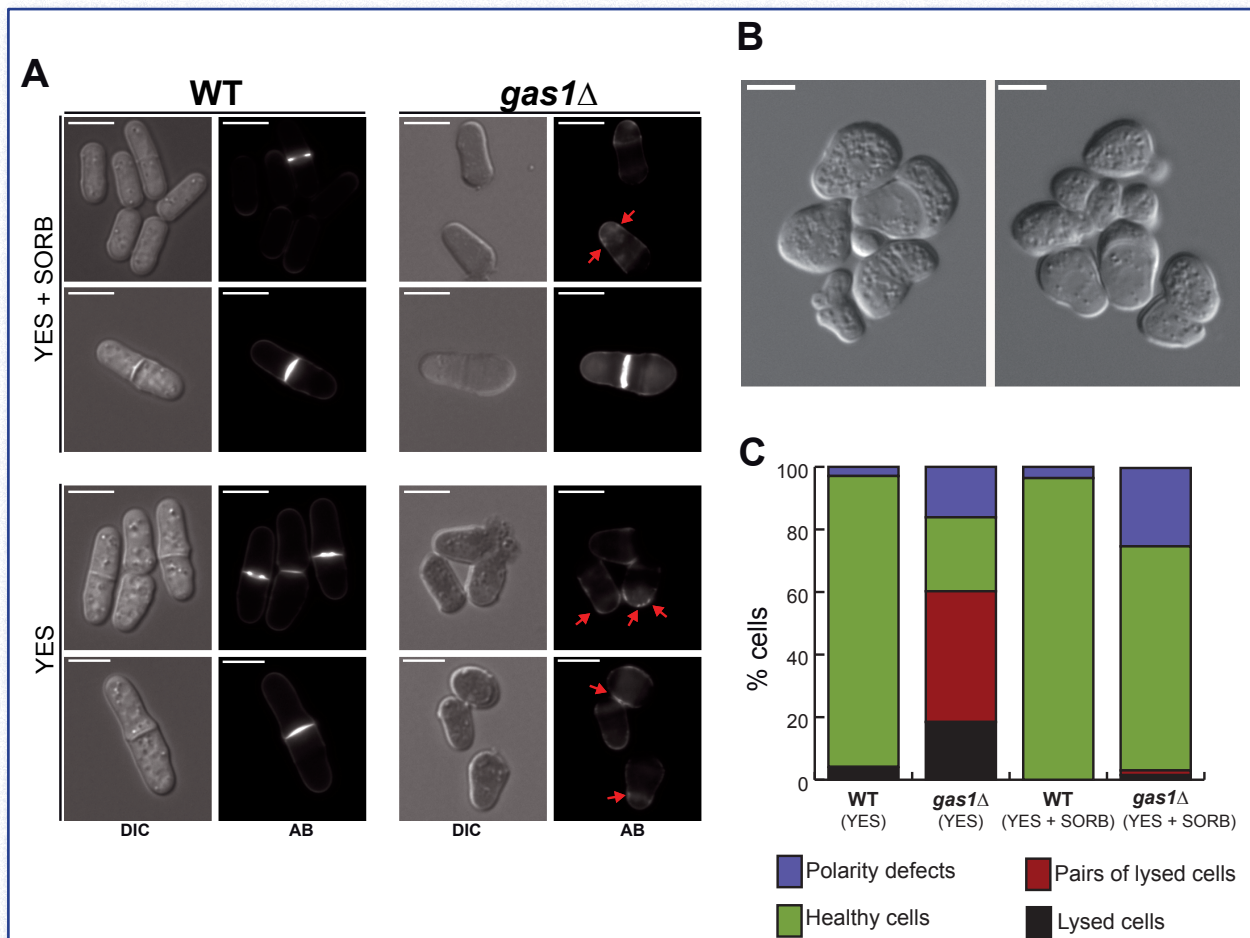


Figure 39. Microscopic aspect of *gas1*⁺ and *gas1Δ* mutant cells. (A) The wild-type and the *gas1Δ* strains were incubated in rich media with or without osmotic support. Samples were directly stained with aniline blue before photographs were captured. Differential interference contrast (DIC) or fluorescent (AB) images are shown. Arrows indicated abnormal deposition of glucan-like cell wall material. Bars, 10 μm. (B) *gas1Δ* polarity defects in the absence of osmotic support. Illustrative images of the polarity defects are shown. (C) Percentage of *gas1Δ* cells showing polarity or lytic defects with and without osmotic support. Wild-type and *gas1Δ* cells that had been growing O/N in rich media with sorbitol were reincultured in fresh media with and without sorbitol 1.2 M and incubated at 32°C for 2 hours before calculating the percentage of isolated lysed cells (■), pairs of lysed cells (■), healthy isolated cells (■) and cells with polarity defects (■).

One possibility to explain this fact is that the cell wall of *gas1Δ* mutants is weaker or has defects in the cross-linking of the different polymers, similar to what has been proposed for other yeast and fungi (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000a; Popolo and Vai, 1999). If this were the case, the cell wall could be more sensible to the hydrolytic activity of *agn1p* or *eng1p*, and therefore deletion of *agn1*⁺ or *eng1*⁺ would prevent lysis. To test this hypothesis, we tried to construct the *eng1Δ gas1Δ* and *agn1Δ gas1Δ* double mutants by genetic crosses followed by random spore analysis. Germinated selected spores from the *gas1Δ* x *eng1Δ* genetic cross were termed as YMMR119, while those from the *gas1Δ* x *agn1Δ* genetic cross were named YMMR120.

Presence of the *gas1Δ* deletion allele in the spores was confirmed by PCR analysis. Using a

combination of primers (1037-1038) that amplify bands of different sizes depending on the allele present (Fig. 41A), the deletion allele was confirmed in strains YMMR106 and YMMR119, but the *gas1*⁺ allele was present in strain YMMR120 (Fig. 41B). These results indicated that only the *eng1Δ gas1Δ* double mutant was obtained.

We next analyzed the ability of the *eng1Δ gas1Δ* double mutant to grow in media without sorbitol. In sharp contrast to our hypothesis, the double mutant showed similar growth defects to the *gas1Δ* mutant (Fig. 42). Therefore, lysis is not due to an excessive degradation of cell wall material by *eng1p*. We cannot rule out that it could be due to the activity of *agn1p* or other poorly characterized enzymes (there are three GH5 enzymes -*exg1p*, *exg2p* and *exg3p*-; E. Dueñas,

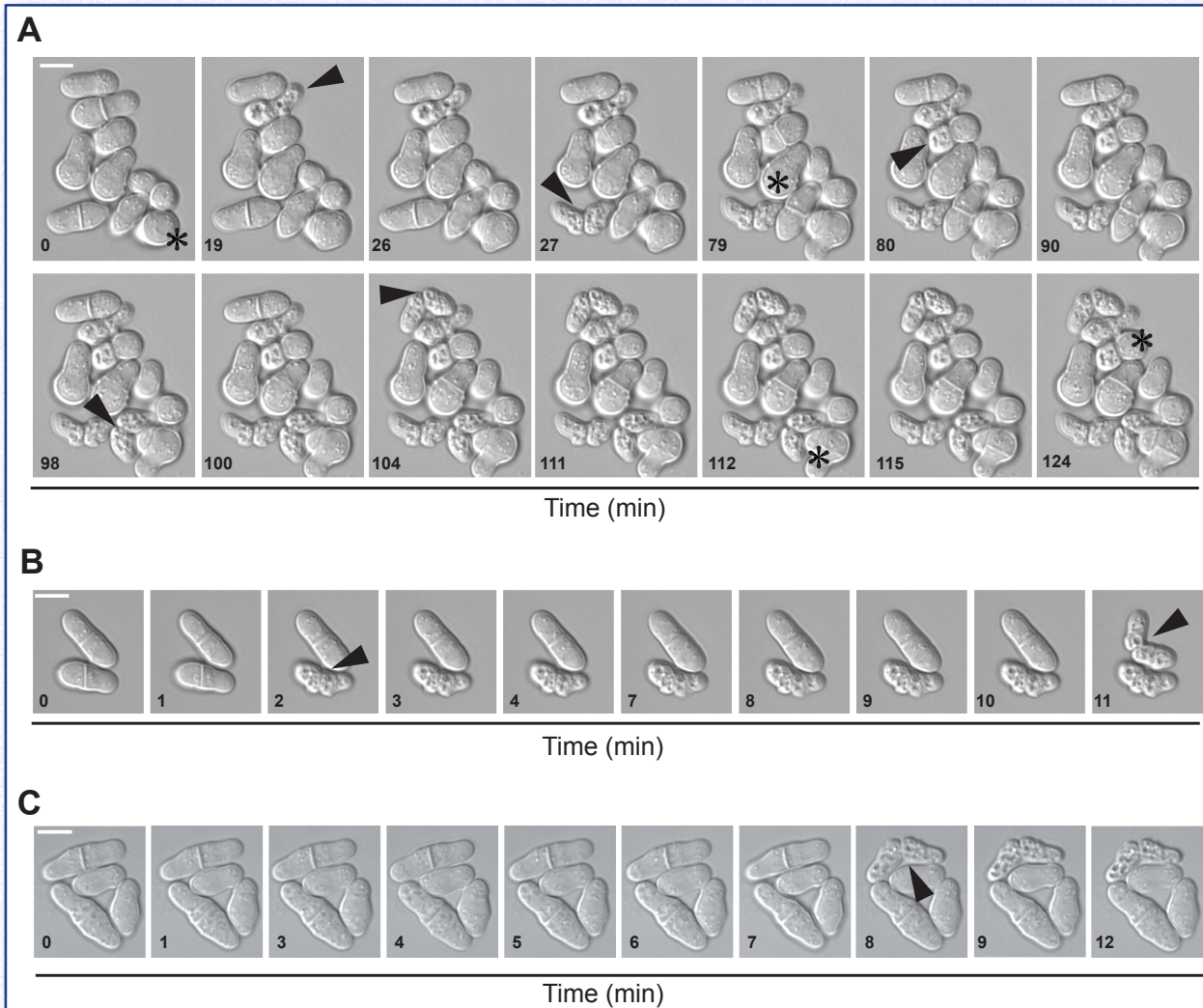
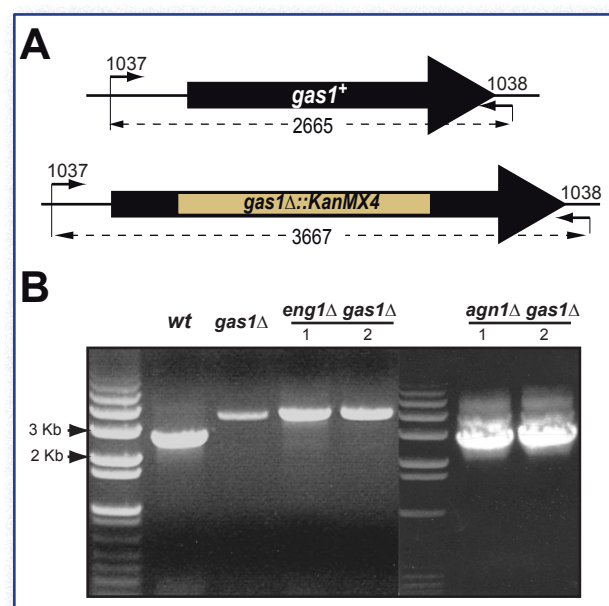


Figure 40. Time-lapse microscopic analysis of *gas1Δ* mutant. *gas1Δ* cells grown in liquid media with osmotic support were inoculated on YES solid medium and observed with a microscope equipped for the Nomarski technique. Images were captured every minute. (A), (B) and (C) show the growth, polarity defects and cell lysis along the time. Black arrowheads point cell lyses at each time point. Asterisks highlight cells losing polarity. Scale bars, 10 μ m.

personal communication) involved in cell wall remodelling.

These results suggest that *gas1⁺* is essential to maintain cellular integrity and viability during vegetative growth and for cell morphogenesis. In the absence of *gas1p*, cell lysis takes place in active growing regions of the cell (poles and septum), and those cells that do not lyse display morphogenic defects, manifested by widened poles or widened medial regions.

Figure 41. YMMR120 is the double mutant *eng1Δ gas1Δ*. (A) Schematic representation of expected DNA fragments that should be amplified by PCR in the YMMR119 and YMMR120 strains. The expected size for the wild-type allele is 2,665 bp and 3,667 bp for the *gas1Δ::KanMX4* allele. (B) PCR analysis of YMMR119 and YMMR120 strains. The 2.6 Kb band is present in the wild-type, YMMR120-1 and YMMR120-2 strains.



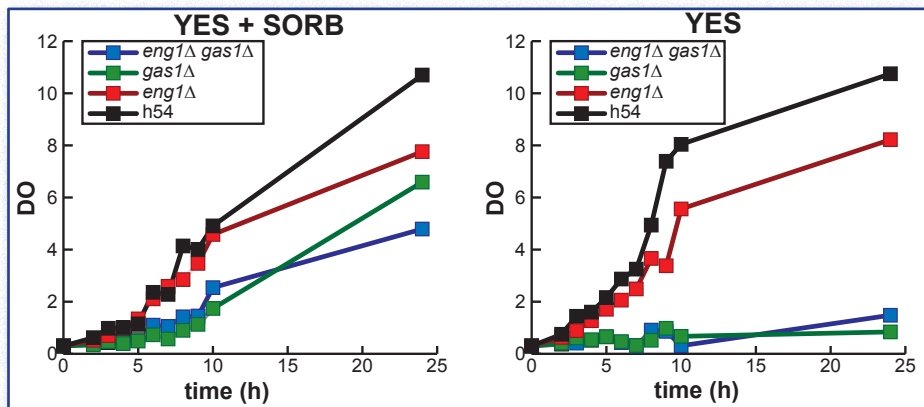


Figure 42. *eng1⁺* deletion does not prevent lysis in *gas1Δ* cells. Growth of the wild-type (■), YMMR106-1 (■), OL538 (■) and YMMR119-2 (■) strains in rich media plus sorbitol 1.2 M (left) and without osmotic support (right). *eng1Δ gas1Δ* double mutant behaves as the *gas1Δ* null mutant.

(XIV)- 4. *gas1p* is required for proper morphogenesis

To further assess the nature of the defect of *gas1Δ* mutants and to test whether *gas2Δ*, *gas5Δ* or *gas2Δ gas5Δ* cells could display a cell defect indistinguishable by optic microscopy, transmission electron microscopy (TEM) was used to compare the morphology of the cell wall between wild-type and mutant strains (Fig. 43 and 44). Exponentially growing cells in rich media (with osmotic support, in the case of *gas1Δ* cells) were fixed in glutaraldehyde 3% and treated with OsO_4 before samples were observed in a transmission electron microscope.

Wild-type cells incubated in YES + sorbitol displayed the *S. pombe* characteristic rod-shaped morphology. Cell wall thickness was uniform around the cell and the inner electron-lucent (glucans) and the outer electron-opaque (α -mannans) layers were present (Fig. 43A). In contrast, *gas1Δ* cells displayed an irregular shape and size (Fig. 43B-D). Indeed, cell wall thickness was not constant and it was difficult to distinguish between the outer and the inner layers, as the cell wall showed a granular and amorphous aspect (Fig. 43B). In those cells

where the electron-opaque material was visible, the outer-layer appeared discontinuous (Fig. 43B-D, arrowheads). Additionally, in cells synthesizing the septum, defects in the medial region of the cell were also obvious (Fig. 43C-D). Septa of mutant cells did not show the typical three-layered structure. In wild-type cells, the septum consists of a medial electron-light layer (linear β -1,3-glucan) that is surrounded by electron-dense material (branched β -1,3-glucan and mannan) at both sides. In *gas1Δ* cells, the three layers were not clearly distinguished (Fig. 43D). Also, septum degradation to generate independent daughter cells did not occur properly. As shown in Figure 43C, there were undegraded fragments of the cell wall surrounding the septum that kept together the daughter cells, even when they already were synthesizing a new septum. All these results suggested that cell wall is not properly assemble in *gas1Δ* cells.

When *gas2Δ*, *gas5Δ* and *gas2Δ gas5Δ* cells were subjected to a similar analysis, no significant differences between the wild-type and mutant strains were observed (Fig. 44A-D). This result was consistent with the normal phenotype observed at the optic microscope for these mutant cells.

Figure 43. *gas1p* is required for proper morphogenesis. Transmission electron microscopy of wild-type and *gas1Δ* mutant strains. *gas1Δ* cells show aberrant cell wall aspect. Samples of exponentially growing cells in YES + sorbitol were taken and fixed with OsO_4 . (A) wild-type cell wall has an inner electron-lucent layer and an outer continuous electron-opaque layer. Transversal section of a wild-type cell is shown on the right panel. (B) *gas1Δ* cells display an irregular cell wall thickness. Micrographs corresponding to a whole mutant cell and a detail of the cell wall are shown. (C) Septum is not correctly degraded in *gas1Δ* cells. (D) Septum does not display the three-layered typical structure in the null mutant strain.

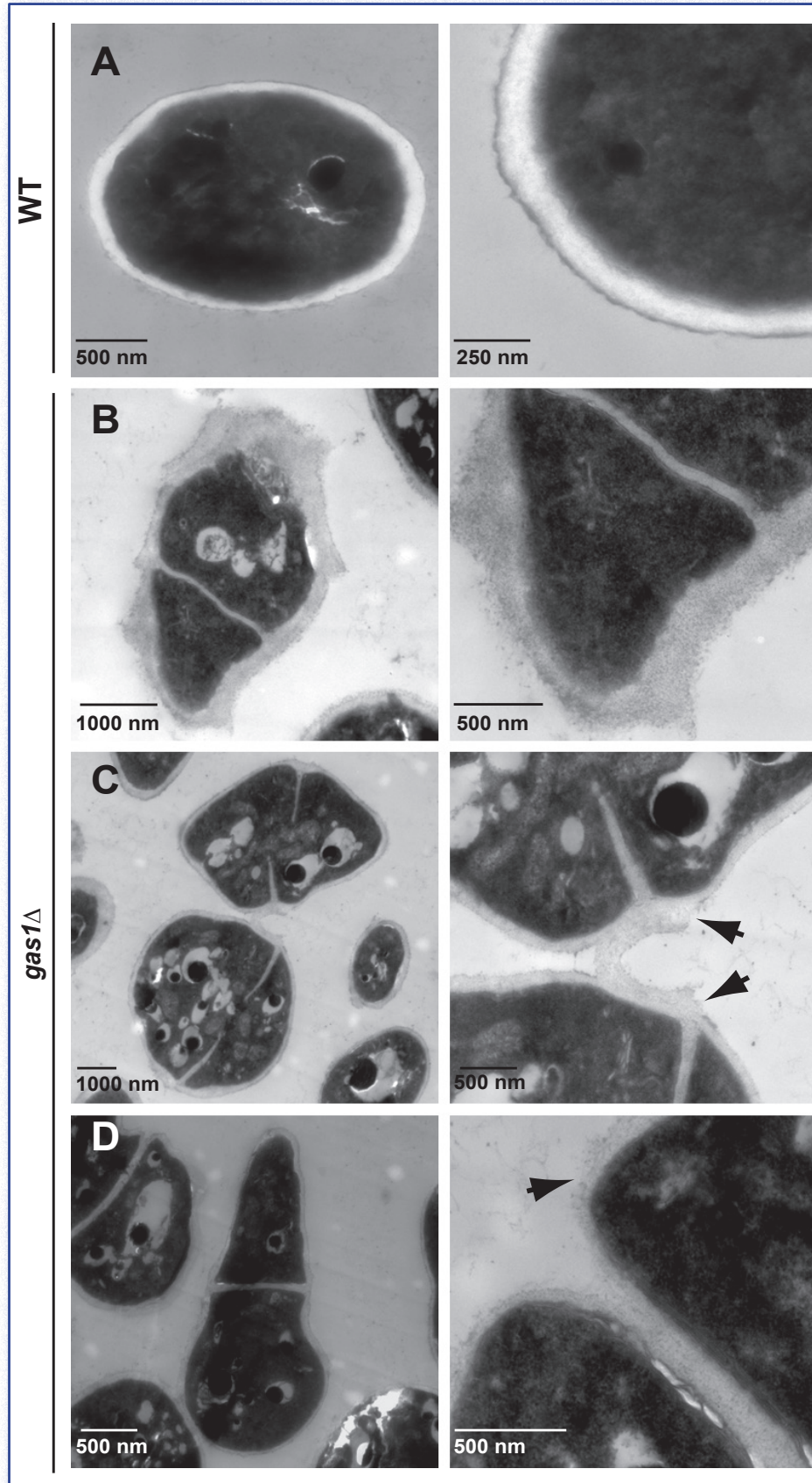


Figure 44. Absence of *gas2p* and/or *gas5p* does not significantly alter cell wall structure. *gas2Δ*, *gas5Δ* and *gas2Δ gas5Δ* mutant strains show a cell wall structure very similar to the wild-type cells. Samples of cells growing in rich media (YES) were taken and fixed with OsO_4 . (A) Wild-type (h20) strain, in which the electron-lucent and electron-opaque material are present. (B) In *gas2Δ* cells, the α -galactomannan layer is slightly thinner than in wild-type cells. (C) *gas5Δ* mutants possess a wild-type cell wall structure. (D) *gas2Δ gas5Δ* double mutant does not display defects in its cell wall.

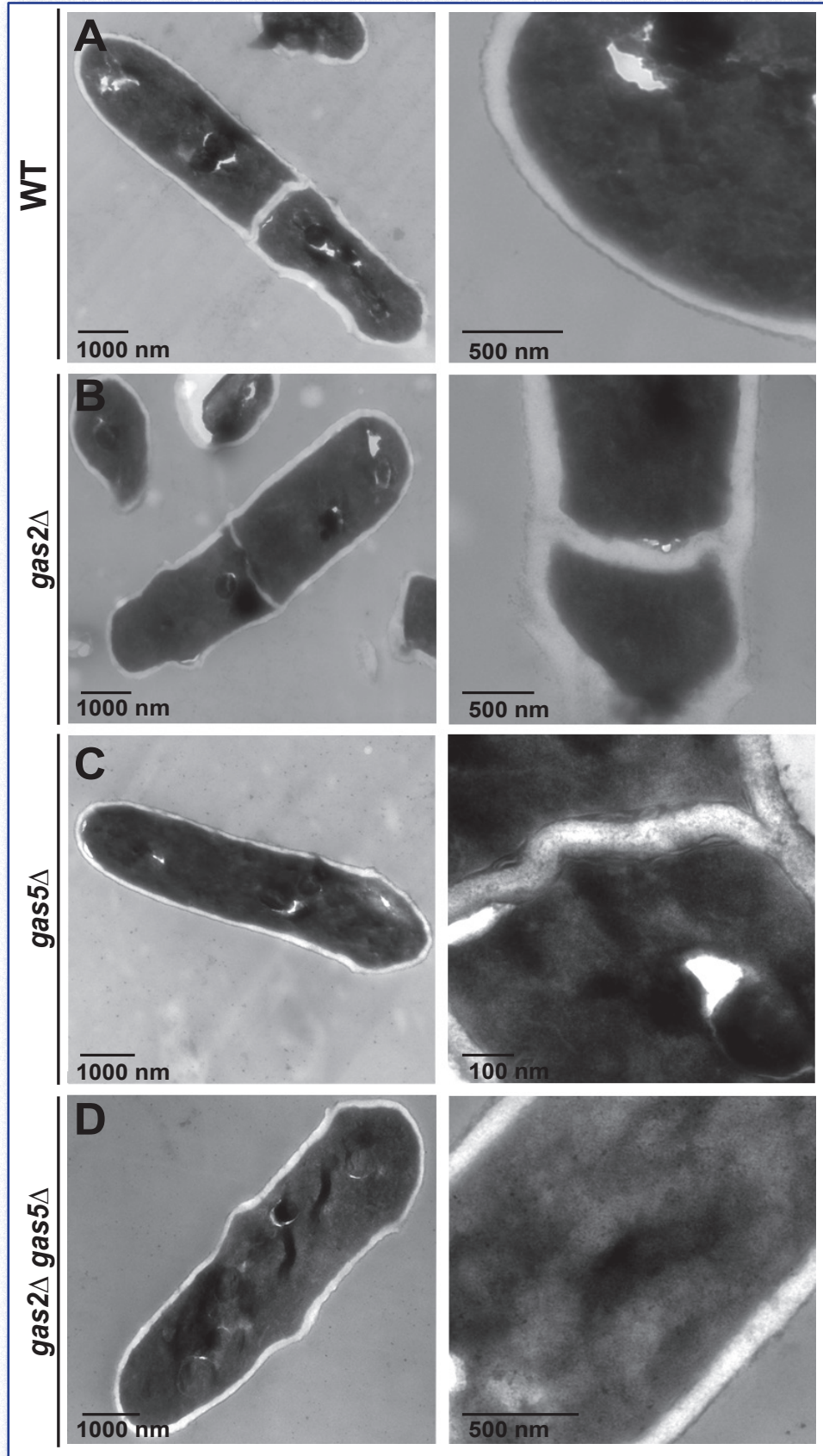


Table 4. Incorporation of radioactivity from ^{14}C -glucose into cell wall polysaccharides of *S. pombe* wild type and *gasΔ* strains grown at 30°C during 6 h. Values indicate percentages of the total ^{14}C -glucose incorporated in each cell wall polymer and are the mean from at least three independent experiments (standard deviations are also indicated). Media used for incubation of each strain is indicated in parentheses.

STRAIN	% Cell wall	% Mannan	% α -glucan	% β -glucan
wt (YES)	39.9 \pm 5.8	16.2 \pm 6.5	33.6 \pm 1.2	45.8 \pm 6.5
<i>gas2Δ</i> (YES)	39.4 \pm 3.4	18.1 \pm 3.9	39.4 \pm 6	46.8 \pm 4.2
<i>gas5Δ</i> (YES)	36.9 \pm 0.6	19.0 \pm 1.5	34.6 \pm 4.3	51.1 \pm 5.1
<i>gas2Δ gas5Δ</i> (YES)	35.6 \pm 14.5	12.8 \pm 9	40.9 \pm 8.5	44.7 \pm 9.7
wt (YES + SORB)	12.6 \pm 1.4	7,3 \pm 3.8	35.7 \pm 4.5	54.8 \pm 4.4
<i>gas1Δ</i> (YES + SORB)	15.6 \pm 3.6	13.3 \pm 5.9	40.4 \pm 4.5	49.9 \pm 9.4

(XIV)- 5. Cell wall composition of the *gasΔ* mutant strains during vegetative growth

To analyse the chemical composition of the cell wall, cells from wild-type and mutant strains were labelled with radioactive glucose ($\text{U-}^{14}\text{C}$, $1\mu\text{Ci/mL}$) and fractionated. In our protocol for cell wall polymer fractionation, labelled cell walls were digested with recombinant β -1,3-glucanase (Quantazyme). Thus, the pellet obtained corresponds to the α -1,3-glucan plus mannan fraction, while the supernatant represents the β -1,3-glucan. Labelled cell walls were also digested with Zymolyase 100T, which consists of β -1,3-glucanase, mannanase and protease activities. Thus, the pellet obtained correspond to the α -1,3-glucan fraction, while the supernatant represents the β -1,3-glucan plus mannan fraction. The mannan content can be deduced subtracting the Zymoliase 100T pellet from the Quantazyme pellet (Pérez and Ribas, 2004). In vegetative cells, β -1,3-glucan content is usually higher than the α -1,3-glucan content (García, 2006; Manners and Meyer, 1977).

The data obtained showed the absence of significant differences between the wild-type and *gas2Δ*, *gas5Δ* and *gas2Δ gas5Δ* mutant strains (Table 4). This is not a surprising result, since no defects were observed in these strains. Conversely, analysis of *gas1Δ* cell walls showed differences with the wild-type strain. First, incorporation of radioactive material in the *gas1Δ* mutant cell wall was higher than in the wild-type

strain (15.6% vs. 12.6). Second, a reduction in the β -glucan fraction was observed (49 % vs. 54%), and this was compensated by an increase in the amount of α -glucan and mannan (53% vs. 43). These results suggest that there is a defect in the cross-linking of β -glucan with other components of the cell wall, and that a fraction could be released to the culture medium, as it has been described for the *S. cerevisiae gas1Δ* mutant (Ram *et al.*, 1998). In budding yeast, the decrease in β -glucan is compensated by an increase in chitin (Popolo *et al.*, 1997; Valdivieso *et al.*, 2000), while in fission yeast the increase is observed in the α -glucan and mannan fractions.

(XIV)- 6. GH72 proteins localize to the cell periphery during vegetative growth.

In order to determine the subcellular location of *gas1p*, *gas2p* and *gas5p*, we tagged those proteins with fluorescent proteins. Since the N-terminal signal sequence and the putative C-terminal GPI anchor site could be important for correct localization of the proteins, the fluorescent protein was inserted in different regions of the GH72 proteins.

For the *gas1+* gene, the coding sequence was cloned into a plasmid and the YFP (*yellow fluorescent protein*) sequence was inserted between the putative signal sequence and the

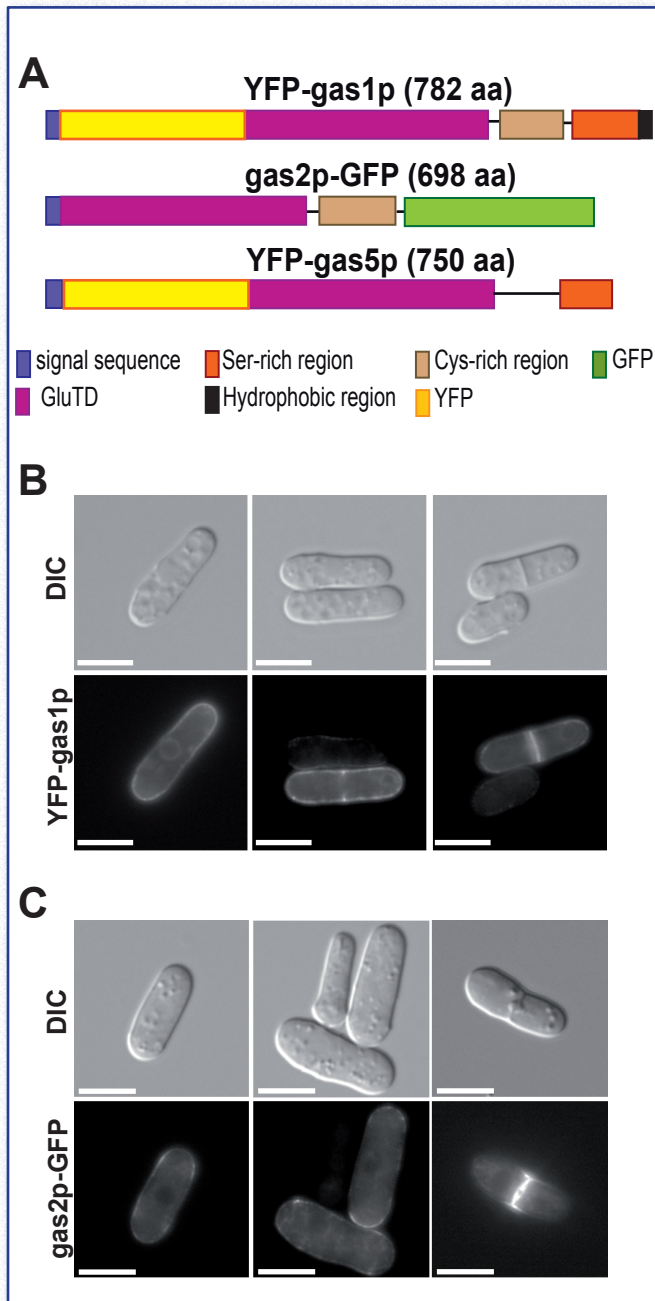


Figure 45. *gas1p* and *gas2p* localize to the cell periphery. (A) YFP-*gas1p*, *gas2p*-GFP, YFP-*gas5p* and *gas5p*-YFP constructs. (B) Localization of YFP-*gas1p* in a wild-type strain. Wild-type cells carrying YFP-*gas1p* on a plasmid were grown to early-log phase before differential contrast microscopy (DIC) and YFP fluorescence (YFP-*gas1p*) images were obtained. (C) Localization of *gas2p*-GFP in a wild-type strain. Wild-type cells carrying *gas2p*-GFP at the *gas2*⁺ locus were grown to early-log phase before differential contrast microscopy (DIC) and GFP fluorescence (*gas2p*-GFP) images were obtained. Scale bars, 10 μ m.

GluTD by recombinant PCR (Fig. 45A). The resulting plasmid (pMMR18) was transformed into two wild-type haploid cell. Microscopic observation of vegetative growing cells revealed that YFP-*gas1p* localizes to the cell periphery and, more precisely, to regions where active growth is taking place (poles and/or septum) (Fig. 45B).

Since *gas2*⁺ lacks the putative C-terminal GPI anchor signal, the GFP (green fluorescent protein) coding sequence was fused in frame to the C-terminus of *gas2p*, using one of the cassettes described by Bähler and co-workers (1998) (Fig. 45A), which was integrated in the genome generating strain YMMR105. The *gas2p*-GFP fusion protein also localized at the cell periphery, with a pattern similar to that of *gas1p* (poles and septum) (Fig. 45C).

For *gas5p*, as its modular structure is very close to that of *gas1p* (N-terminal signal sequence and a putative C-terminal GPI-anchor site), the *gas5*⁺ gene was cloned on a plasmid and the YFP coding sequence was inserted between the putative signal sequence and the GluTD (Fig. 45A). The resulting plasmid was introduced in a wild-type strain. However, no clear localization for *gas5p* could be observed, as the YFP-*gas5p* fusion protein seemed to be unstable and the fluorescence was confined in vesicles (data not shown). We therefore studied more carefully the globular structure of native *gas5p*, using the Globplot program (<http://globplot.embl.de/>). According to the distribution of the globular domains proposed by this software, the insertion of the YFP coding region immediately before the GluTD should not have interfered with protein folding. Additionally, another region near the C-terminus (around nucleotides 1170-1230) was also a possible site for insertion of the fluorescent protein. This region possesses a high number of serine and threonine residues, a pattern commonly present in secreted proteins and which usually confers a stiff conformation to the protein (not a clear secondary structure) (Stratford, 1994). A new construct in which the YFP was introduced after residues P405-G406-P407 was cloned in a vector (Fig. 46) and the resulting plasmid was introduced in a wild-type strain. Nevertheless, only diffuse fluorescent in the cytoplasm and some vesicles spots were observed (data not shown).

These data suggest that *gas1p* and *gas2p* are localized to the cell periphery (presumably to the cell wall). The *S. pombe gas1p* contains a predicted

sequence for GPI addition at the C-terminus, but lacks the dibasic-motif before the cleavage signal, which is necessary to retain the GPI-proteins at the plasma membrane (Caro *et al.*, 1997; Frieman and Cormack, 2003). What is more, a recent work describes the isolation of gas1p from purified *S. pombe* cell wall and its identification by mass spectrometry (de Groot *et al.*, 2007). All together, these data suggest that gas1p might be directed to the cell wall, where it would be attached to the β -1,6-glucan through the GPI moiety. As for gas2p, its modular structure did not show a canonical/classic sequence for GPI-addition, although it could not

be excluded that gas2p contains a non-canonical GPI-anchoring signal. However, the fact of the gas2p-GFP fusion localizes to the cell periphery, as expected for a putative β -1,3-glucanosyl-transferase, suggests that gas2p can reach this localization in the absence of a GPI moiety. Finally, although we were unable to determine gas5p localization by microscopic observation, de Groot *et al.* (2007) also identified it as a covalently bound *S. pombe* cell wall protein by mass spectrometry. Whether its localization is restricted to particular regions of the cell wall or not would need further studies.

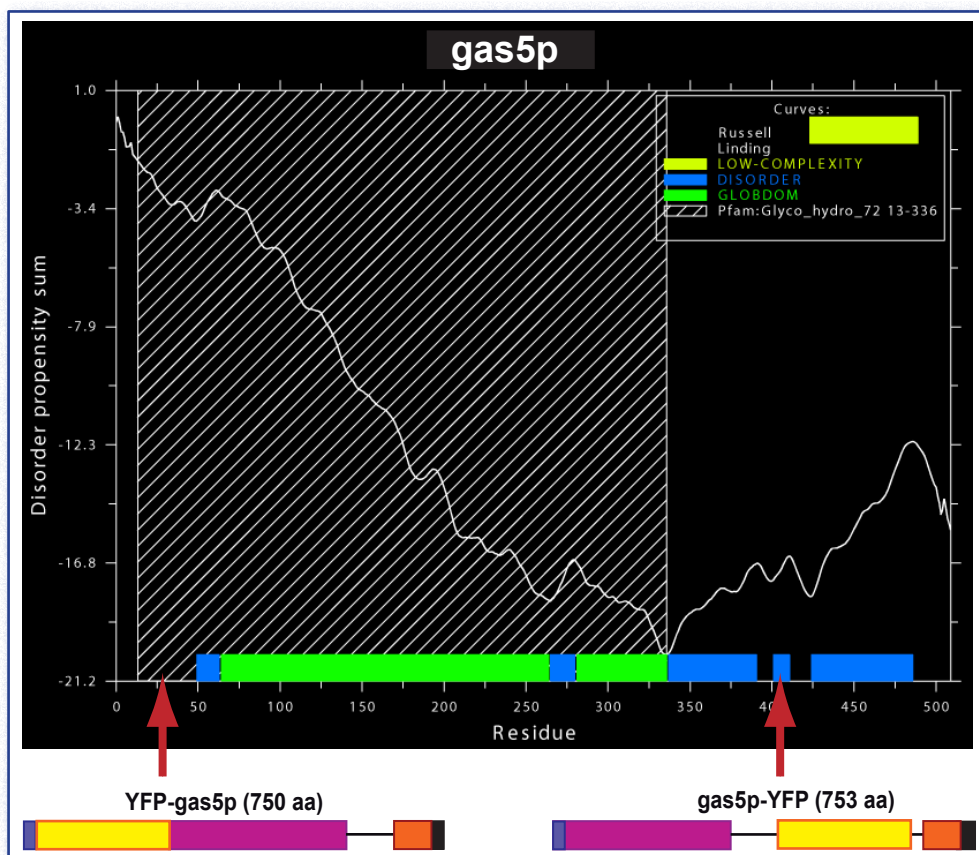


Figure 46. Globular domains of gas5p. gas5p sequence was analyzed with the Globplot software. The result is shown in this figure. Arrows indicate the sites where the yellow fluorescent protein (YFP) was inserted for each one of the constructs.

(XV)- RESULTS

**Characterization of *S. pombe* GH72
genes during sporulation**

(XV)- RESULTS: Characterization of *S. pombe* GH72 genes during sporulation

(XV)- 1. *gas4p* synthesis peaks during the sporulation process

Our preliminary results had shown that *gas4Δ* cells have a wild-type phenotype during vegetative growth. Therefore, we decided to investigate whether *gas4⁺* has any role in cell wall remodelling during other differentiation processes. As pointed out in the previous chapter, *gas4⁺* expression is induced during sporulation and peaked in meiosis II, similar to the meiosis-specific genes classified as the late group (Mata *et al.*, 2002).

To analyze *gas4p* abundance during sporulation, specific anti-*gas4p* antibodies were raised using purified recombinant *gas4p* produced in *Pichia pastoris* (see "Materials and Methods" and the following chapter). First, antibody specificity was assayed by Western-blot analysis using protein extracts from wild-type (*h⁺/h⁺ pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32*)

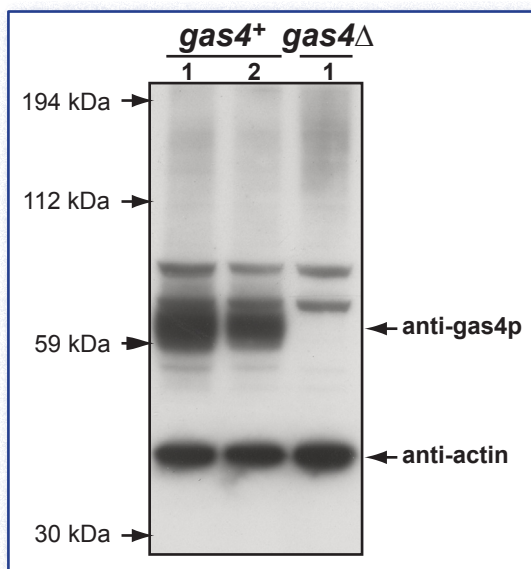


Figure 47. Anti-*gas4p* antibodies are specific. Protein extracts from wild type (*gas4⁺/gas4⁺*, lanes 1 and 2) strain and from a *gas4Δ/gas4Δ* strain (lane 3) were analyzed by Western-blot with anti-*gas4p* antibodies. The more intense specific band was only present in lanes corresponding to the wild-type strain. Actin levels are shown as a loading control.

ura4Δ18/ura4Δ18) and null mutant (*h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 gas4Δ::KanMX4/gas4Δ::KanMX4 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4Δ18/ura4Δ18*) sporulating cells. Bands appeared in lanes corresponding to both wild-type and null mutant cells (Fig. 47). However, the stronger signal was only present in the lane corresponding to wild-type cells. Therefore, we conclude that antibodies were specific for *gas4p*. The abundance of *gas4p* was analyzed by Western-blot in a meiotic time-course of *pat1-114* diploid cells (Fig. 48A). The kinetics of *gas4p* production was similar to that described above for *gas4⁺* mRNA (Fig. 48B); that is, *gas4p* was first detected 4.5 hours after the cells entered the meiotic program. Maximum levels were reached at 5.5-6 hours, when diploid cells had already accomplished meiosis II and ascospore development had started. Then, *gas4p* levels started to decrease gradually, although the protein was still detected 12 hours

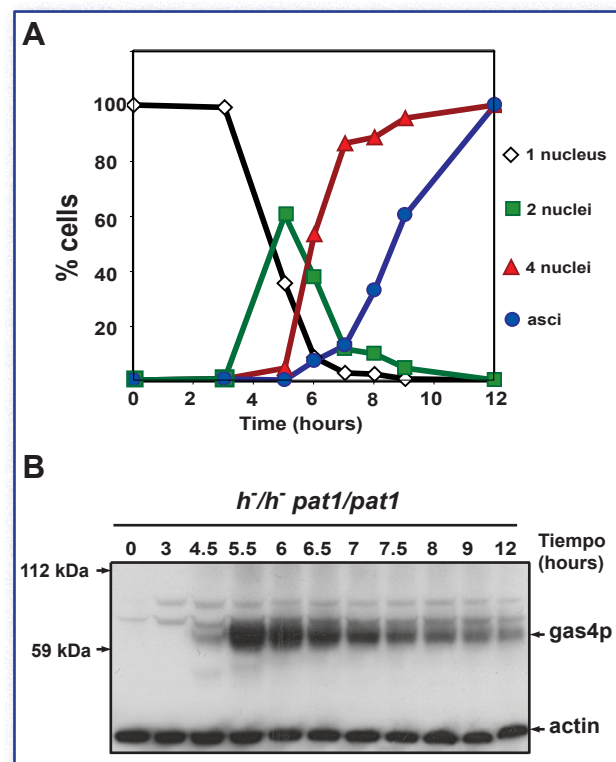


Figure 48. *gas4p* accumulates during sporogenesis. (A) Synchronous meiosis of strain S964. Meiotic progression was monitored by DAPI staining, and sporulation was checked by microscopic observation of asci. The percentage of mononucleate, binucleate, and tetranucleate cells and spores at each time-point are represented. (B) Western-blot analysis of *gas4p* during synchronous meiosis of strain S964. Samples were collected at the indicated times after induction of sporulation to prepare protein extracts. Polyclonal anti-*gas4p* antibody was used. Actin was used as a loading control.

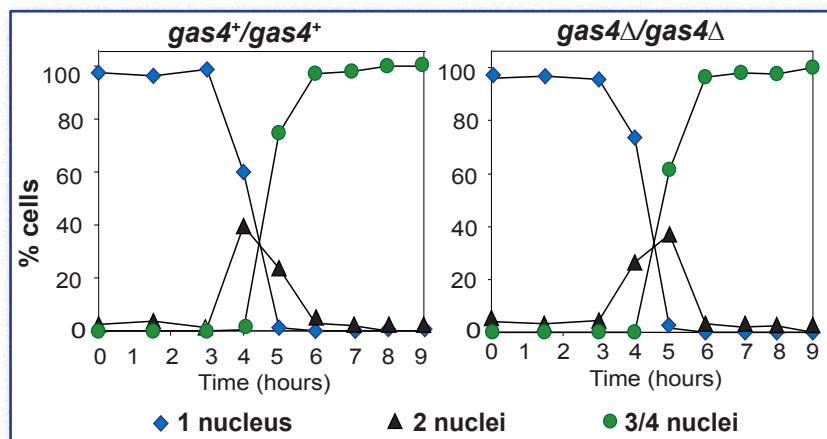


Figure 49. *gas4p* is not necessary for meiotic progression. Meiotic progression of *pat1-114/pat1-114 gas4+/gas4+* and *pat1-114/pat1-114 gas4Δ/gas4Δ* strains. Samples were collected at different times after induction of sporulation and stained with DAPI. The percentage of uninucleate, binucleate and tetranucleate cells at each point is indicated. At least 200 cells were counted for each point.

after the induction of meiosis, a moment roughly coinciding with the appearance of mature asci. The experimental molecular weight deduced from the analysis (Figs. 47 and 48A) was significantly higher than the estimated molecular weight (59 kDa). This difference could be attributed to the presence of glycosylation, since *gas4p* contains 7 putative sites for N-linked glycosylation (NXS/T) and a Ser-rich region close to the C-terminus that could be O-glycosylated.

No protein was detected at time 0, even with longer exposures. Since *gas4+* mRNA was present at low levels during vegetative growth, we tested whether there was a small amount of *gas4p* in non-sporulating conditions. Protein extracts from vegetatively growing cells were analyzed by Western-blot using anti-*gas4p* antibodies. However, no band corresponding to *gas4p* could be detected, even after longer exposures. Thus, *gas4p* is absent during vegetative growth or there is a very small amount that is not detectable with our antibodies.

(XV)- 2. *gas4p* is involved in ascospore maturation in *S. pombe*

The previous observations indicated that *gas4+* is induced during the meiotic program and that the protein accumulates when the spore wall is being synthesized. In order to elucidate whether *gas4+* plays any role during meiosis, we analyzed

the meiotic progression of the homozygous diploid *h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 gas4Δ/gas4Δ*. To this end, *gas4+* was deleted in haploid *h⁻ pat1-114* strains and a diploid strain was constructed by protoplast fusion. The diploid wild-type and mutant strains were induced to sporulate by nitrogen starvation and temperature inactivation of the *pat1p* kinase. To test whether *gas4p* was necessary for progression through meiosis, samples collected at different times after induction of sporulation were stained with DAPI and the number of uni-, bi- and tetranucleate cells was counted at each time-point. As expected for a putative cell wall-remodelling protein, no significant differences in progression along meiosis were found between the wild-type and the *gas4Δ/gas4Δ* mutant, since both strains reached similar levels of tetranucleate cells at the same time after the induction of sporulation (Fig. 49).

To test whether *gas4p* might play some functional role in the morphogenetic processes that occur after meiosis -either the synthesis or maturation of the spore wall- we analyzed the morphology of the spores of strains lacking this gene. *gas4+* was deleted in haploid strains of opposite mating types and the resulting mutants were induced to mate and sporulate. Mutant spores had an irregular morphology and were less refractile than those of the wild-type strain (Fig. 50), suggesting a defect in spore wall maturation. Therefore, *gas4p* is not required for meiotic progression, but it is necessary for the formation of mature spores.

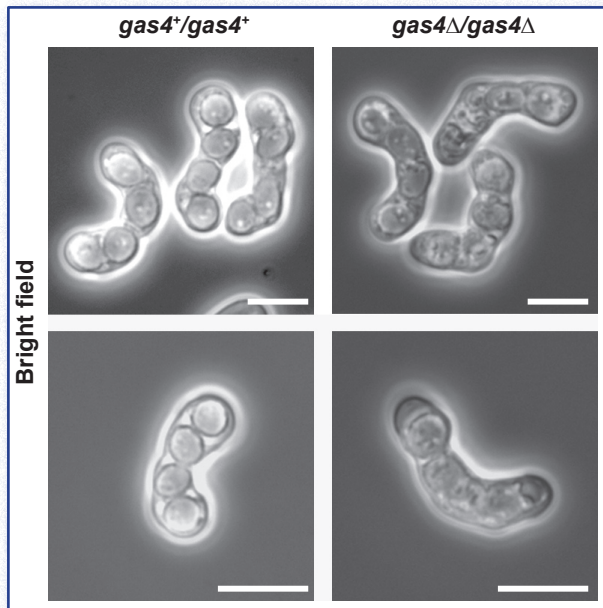


Figure 50. *gas4p* is necessary for proper maturation of the spores and for generation of viable spores. Phase contrast microscopic aspect of wild-type (*gas4⁺/gas4⁺*) and *gas4Δ* mutant asci. Scale bars, 10 μ m.

(XV)- 3. *gas4Δ* spores are unviable

The morphological defect of *gas4Δ* spores suggested that they could also be more sensitive to stress conditions, such as glucanase treatment or exposure to heat. To test this possibility, we first analyzed the ability of the mutant spores to germinate and their viability in comparison with the wild-type strain. The haploid *gas4Δ* null mutants were crossed on YPD agar plates and incubated at 25°C for 2-4 days. The parental haploid wild-type strains were used as controls. Spores were separated by micromanipulation on YES agar plates and incubated for 4 days at 32°C. After this time, around 80% of the wild-type spores had germinated and had formed visible colonies, while less than 1% of the *gas4Δ* mutant spores (5 out of 511 spores) were able to form visible colonies. Colony morphology was analyzed by light microscopy, and the results indicated that *gas4Δ* mutant spores were unable to germinate (data not shown). Plates were incubated for three additional days (one week after tetrad dissection), but the result was the same, ruling out the possibility of a delay in germination.

Sporulation and germination was carried out in osmotically supported medium to determine whether this would increase the survival rate

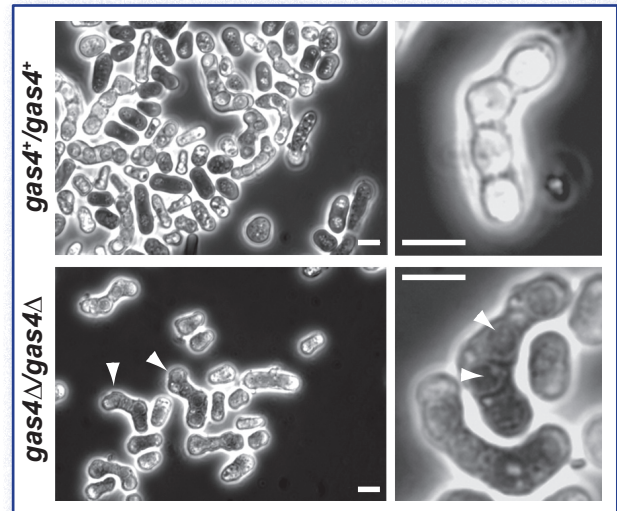


Figure 51. *gas4Δ* ascospores are more permeable than the wild-type spores. Wild-type and *gas4Δ* mutant asci were incubated with 0.6% methylene blue for 2 minutes before phase contrast images were taken. Arrowheads indicate some *gas4Δ* spores that were stained with this product. Scale bars, 10 μ m.

of the spores. However, *gas4Δ* spores were unable to germinate when incubated in medium supplemented with sorbitol. The sporulation of heterozygous crosses (*gas4⁺* x *gas4Δ*) generated normal asci, with four refractile spores with similar viability to that of the wild-type strain, indicating that *gas4Δ* is recessive and that the defect is spore-independent. As additional confirmation that the spores were dead and that germination was not the problem, we stained wild-type and mutant asci with methylene blue. This vital dye is normally used to distinguish between live and dead cells, since it only stains the cytoplasm of the latter. We found that this stain was only incorporated in the epiplasm and ascospore cytoplasm of *gas4Δ* spores, but not in wild-type asci (Fig. 51). Taken together, these results suggest that *gas4p* is necessary for the proper maturation of the spore wall and for the generation of viable spores.

(XV)- 4. *gas4p* is necessary for correct formation of the spore wall

To further assess the nature of the defect of *gas4Δ* mutants, transmission electron microscopy was used to compare the morphology of the spore wall between wild-type and *gas4Δ* mutant strains. The four spores of a wild-type ascus were round

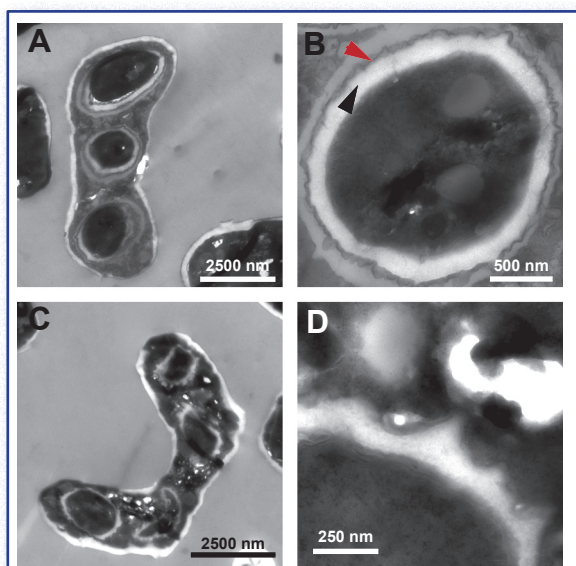


Figure 52. *gas4p* is necessary for correct cell wall synthesis. Electron microscopy ultrastructure of wild-type and *gas4Δ* mutant spores. (A) Three out of four spores in the wild-type ascus are shown in this section. The electron-opaque material forms a thin layer around the 1,3- β -glucan layer. (B) Detail of the spore cell wall of the wild-type strain. Red arrowhead indicates the amylose-like material in the outermost layer of the spore wall. Black arrowhead marks the inner glucan layer. (C) *gas4Δ* mutant ascus with four immature spores. (D) Magnification of a *gas4Δ* mutant ascospore, where the outer layer is not well defined.

and had a regular shape and size (Fig. 52A), while the spores of a *gas4Δ* ascus were smaller and more irregular in size and shape (Fig. 52C). Furthermore, the cytoplasmic material that was not included in the spores was darker than in the wild-type. The spore wall of wild-type cells appeared to have both electron-lucent and electron-opaque material (Fig. 52B). The electron-lucent material represented the inner spore wall and contained β -1,3-glucan (black arrowhead), while the electron-opaque material represented the outer spore wall, mainly composed by amylose-like material, galactomannans, and cell wall proteins (white arrowhead). In *gas4Δ* mutant spores, the thickness of the cell wall was irregular and the difference between the two layers was not clearly defined. The outer layer could not be distinguished from the surrounding cytoplasm, as though it had been incorrectly attached to the inner layer (Fig. 52D). However, asci from *gas4Δ* cells were positive for the iodine-staining assay, indicating that the amylose-like material was present in the spores (data not shown). Together, these data suggest that *gas4Δ* mutants have a severe defect in spore maturation and that the ascospore wall is not assembled correctly.

(XV)- 5. Spore wall composition is similar in wild-type and *gas4Δ* ascospores.

To analyze the chemical composition of the spore wall, asci from wild-type and *gas4Δ/gas4Δ* diploid cells were labelled and fractionated (see Experimental procedures). In our protocol of spore wall polymer fractionation, labelled cell walls were digested with recombinant β -1,3-glucanase (Quantazyme). Thus, the pellet obtained corresponds to the α -1,3-glucan plus mannan fraction, while the supernatant represents the β -1,3-glucan (Pérez and Ribas, 2004). Total incorporation in the cell walls was slightly higher in *gas4Δ* mutant asci compared with the wild-type ($26\pm 4.5\%$ versus $23.2\pm 5\%$, respectively). As previously described, the amount of α -1,3-glucan plus mannan in the spore wall of wild-type and mutant asci was significantly higher than in vegetative cells (García *et al.*, 2006). The absence of *gas4p* induced a decrease of β -1,3-glucan (29.5% versus 24.5%), which was compensated by an increase in α -glucan plus mannan fraction.

(XV)- 6. Putative catalytic residues of *gas4p* are important for its biological function

Sequence alignment of GH72 proteins has previously shown that two glutamic acid residues (indicated by asterisks) are perfectly conserved in the sequences (A/S)GNE*(V/I) and SE*(Y/F)GC (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000b; Papaleo *et al.*, 2006). It has been proposed that these residues might form the catalytic pair involved in the transfer reaction for catalysis. Indeed, the replacement of E160 and E261 with Leu and Phe, respectively, eliminates the *in vitro* catalytic activity of *AfGel1p* (Mouyna *et al.*, 2000b), and replacement of E161 and E262 by two glutamine residues totally abolishes the *in vitro* catalytic activity of *ScGas1p* (Carotti *et al.*, 2004). To test the importance of glutamates E157 and E257 for the biological function of *gas4p*, we constructed

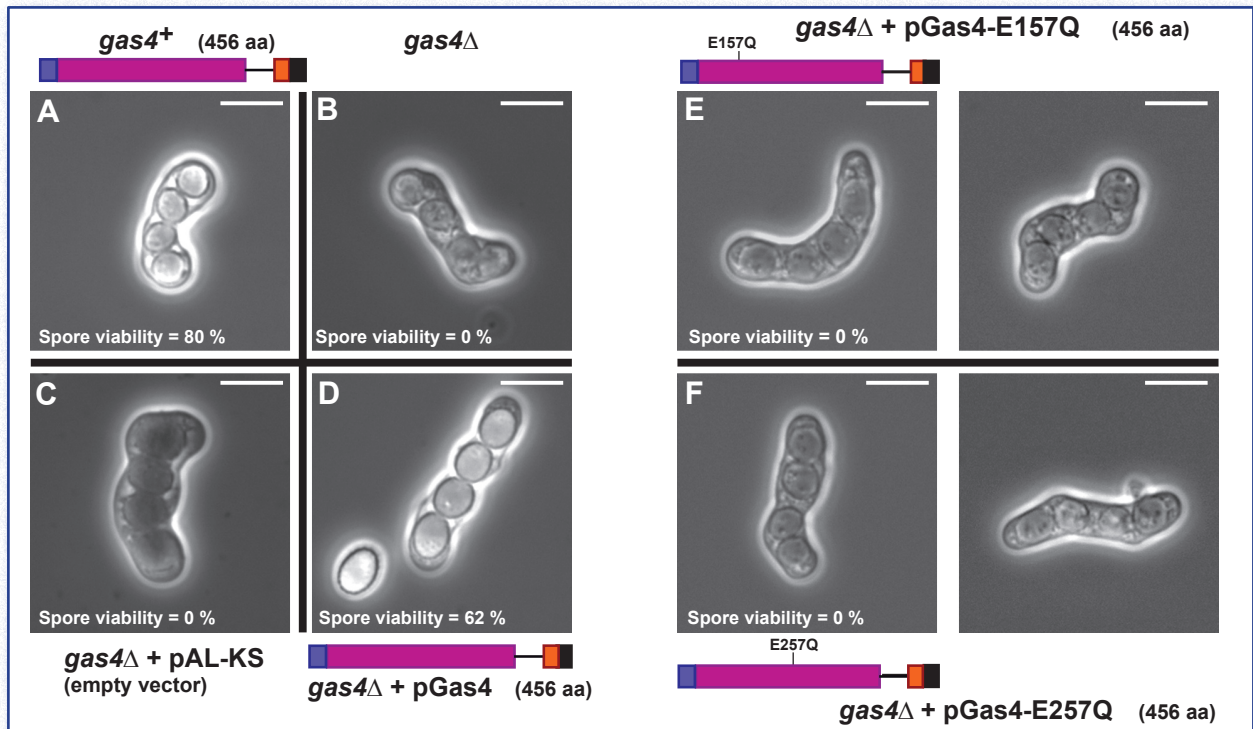


Figure 53. The glutamic acid E157 and E257 residues are necessary for the biological function of *gas4p*. The wild-type strain (A), the null mutant strain (B) and the *gas4*Δ strain harbouring pAL-KS (C), pMMR14 (D), pMMR30 (E) and pMMR29 (F) were induced to sporulate on MEA plates. Photographs of bright field phase contrast microscopy are shown. The viability of the spores of each strain is indicated in each image. Symbols of the *gas4p* domains are as in Figure 25. Scale bars, 10 μm.

two mutant forms of this protein -*gas4p*-E157Q and *gas4p*-E257Q- by replacing the glutamic acid residues with the structurally similar glutamine residues. In order to analyze spore morphology and viability, these mutant alleles were cloned into plasmids under the control of the native promoter and transformed into *h*⁺ and *h*⁻ *gas4*Δ strains. The morphology of the spores generated by these strains was analyzed by phase contrast microscopy and compared with those from the *gas4*Δ mutant transformed with the vector (negative control) or the wild-type *gas4*⁺ gene. In addition, the parental haploid wild-type strains were used to compare the sporulation efficiency of the strains harbouring the different plasmids. The results indicated that only the strains carrying the native *gas4p* were able to form wild-type spores, with their characteristic refractility (Fig. 53A and D). The morphology of the spores of strains containing *gas4p*-E157Q or *gas4p*-E257Q (Fig. 53E and F) was similar to that observed in the mutant (Fig. 53B and C) and lacked any refractility. Furthermore, the spores produced by strains containing *gas4p*-E157Q or *gas4p*-E257Q were unable to germinate, and spore

viability was similar to that of the *gas4*Δ mutant (Fig. 53). Both results (abnormal morphology and unviable spores) suggest that the two conserved glutamic acid residues are important for the biological function of *gas4p* during *S. pombe* sporulation. Furthermore, since these residues are part of the catalytic pair of other members of this family of proteins, it is very likely that *gas4p* β-1,3-glucanosyl-transferase activity would play an essential role in the synthesis and maturation of the spore wall.

(XV)- 7. *gas4p* localizes to the ascospore periphery

In order to determine the subcellular location of *gas4p* during sporulation, we tagged *gas4p* with the YFP. As described in the previous chapter for *gas1p* and *gas5p*, since the N-terminal signal sequence and the putative C-terminal GPI-anchor site could be important for correct localization of the protein, the *gas4*⁺ gene was cloned into a plasmid and the YFP was inserted between

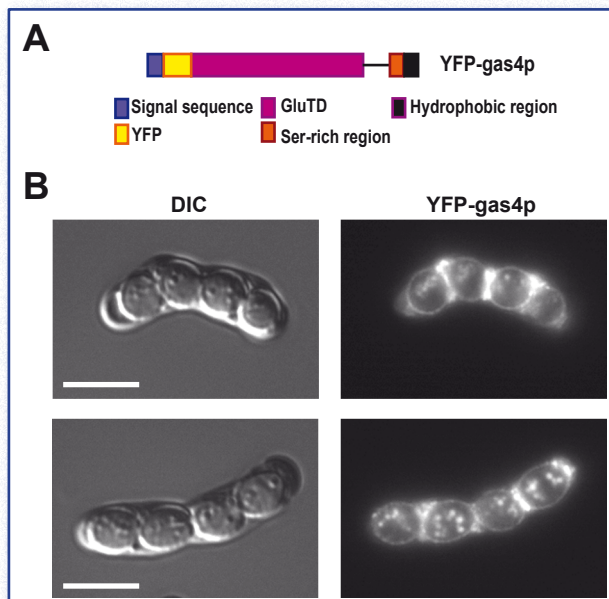


Figure 54. *gas4p* localizes to the ascospore wall. (A) Schematic representation of the YFP-*gas4p* fusion protein present in plasmid pMMR19. (B) Localization of YFP-*gas4p* in wild-type spores. Wild-type haploid cells of opposite mating types carrying YFP-*gas4p* on a plasmid were grown to early-log phase and then induced to sporulate by transferring them to MEA plates. Plates were incubated at 25°C for two days before differential contrast microscopy (DIC) and YFP fluorescence (YFP-*gas4p*) images were obtained. Scale bars, 10 μ m.

the putative signal sequence and the GluTD by recombinant PCR (Fig. 54A). The resulting plasmid (pMMR19) was transformed into two wild-type haploid strains of opposite mating types and the transformants were placed under conjugation-sporulation conditions. Microscopic observation of sporulating cells revealed that YFP-*gas4p* localized to the ascospore periphery (Fig. 54B), either to the membrane or to the spore wall.

(XV)- 8. The GPI anchor is important for *gas4p* localization and function *in vivo*

Removal of the GPI-anchor did not affect the catalytic activity of *gas4p* *in vitro*, since the recombinant protein expressed in *P. pastoris* lacked the GPI-moiety (see the next chapter). We analyzed whether the GPI attachment might be important for *gas4p* function or for its localization *in vivo*. Thus, we constructed a truncated form of *gas4p* (*gas4p*- Δ GPI, Fig. 55A) in which the C-terminal hydrophobic sequence was deleted,

cloned it into a plasmid under the control of the *gas4⁺* promoter (pMMR26), and transformed the plasmid into two *gas4* Δ mutant haploid strains of opposite mating types. The resulting strains were induced to conjugate and sporulate on solid media and the morphology and viability of the spores were analyzed. Similar to the analysis of the mutations in the putative catalytic residues, we compared the phenotype of the asci produced by a wild-type strain with those of the null mutant carrying the vector, *gas4⁺*, or *gas4*- Δ GPI. The results indicated that the spores produced by cells carrying the truncated version were similar to those of the null mutant and that they were non-refractile (Fig. 53 and 55A). Moreover, the *gas4p*- Δ GPI protein was unable to complement the viability defect of *gas4* Δ spores, since none of the ascospores lacking the GPI was able to germinate. Taken together with the data from the activity analysis (next chapter), these results suggest that the GPI anchor is not necessary for the catalytic activity, but the addition of a GPI attachment to the protein is important for *in vivo* functionality.

Since the *gas4p*- Δ GPI protein shows catalytic activity *in vitro*, one hypothesis to explain the absence of complementation could be that the GPI anchor would be necessary for the localization of the protein to the spore periphery. To test this hypothesis, a YFP-tagged version of the *gas4p*- Δ GPI was also constructed and introduced into two haploid wild-type strains, which were then induced to mate and sporulate on MEA plates over 48 hours. The results of these experiments indicated that the truncated protein was not retained at the ascospore periphery, in contrast to the wild-type YFP-*gas4p*, and that most of the YFP-*gas4p*- Δ GPI protein accumulated in the epiplasm surrounding the ascospores (Fig. 55C, arrowheads). Furthermore, when the ascus wall underwent endolysis to release the ascospores, fluorescence was readily detected in the outline of spores carrying YFP-*gas4p* (Fig. 55D, lower panel), while fluorescence was never found to be associated with the spores carrying YFP-*gas4p*- Δ GPI (Fig. 55D, upper panel). Thus, the GPI attachment is not necessary for *gas4p* catalytic activity, but it is essential for the retention of the protein in the spore periphery, and

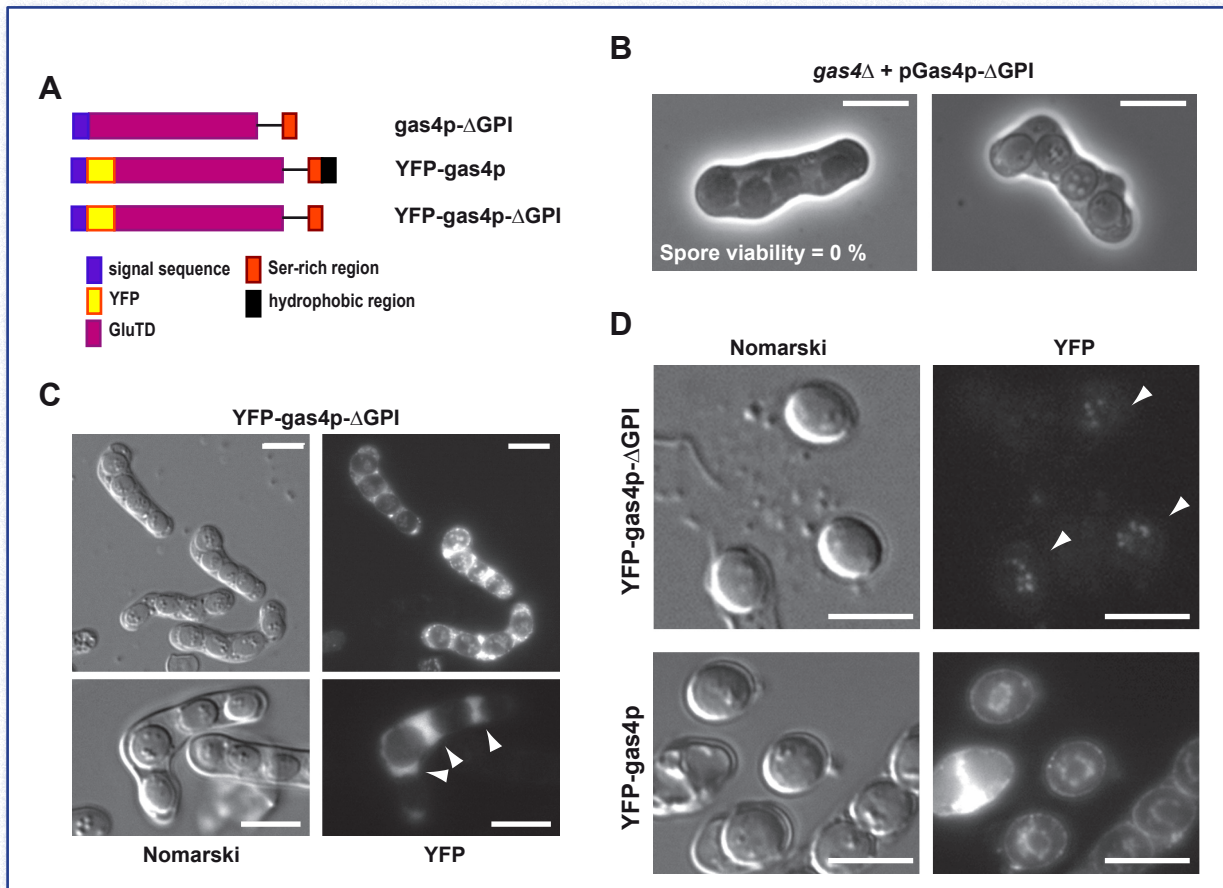


Figure 55. The GPI attachment is required for gas4p functionality in vivo. (A) Schematic representation of truncated gas4p forms used for this assay. (B) The *gas4Δ* strain harbouring plasmid pMMR26 (*gas4p-ΔGPI*) was induced to sporulate on MEA plates. Phase contrast microscopy photographs of the spores after two days of sporulation are shown. Controls are the same as in Figure 53. (C) The GPI moiety is responsible for gas4p localization to the spore outline. The wild-type strain carrying *YFP-gas4p-ΔGPI* was induced to sporulate on MEA plates for two days. Photographs of differential interference contrast microscopy (DIC) and YFP fluorescence (YFP) are shown. Scale bars, 10 μ m. (D) Photographs of released spores of the wild-type strain carrying *YFP-gas4p-ΔGPI* (upper panels) or *YFP-gas4p* (lower panels) after two days of sporulation. Arrowheads indicate spore outline. Scale bars, 10 μ m.

a proper localization of gas4p to the spore outline is required for the correct assembly of a functional spore wall.

(XV). 9. The *gas4⁺* gene complements the sporulation defect of *S. cerevisiae gas2Δ gas4Δ*

A recent work described the function of two GH72 genes during sporulation in *S. cerevisiae* (Ragni *et al.*, 2007a). *ScGAS2* and *ScGAS4* are expressed exclusively during sporulation. Their mRNA levels peak at 7 h after induction of sporulation and then decrease. The double *gas2Δ gas4Δ* diploid mutant shows a severe reduction in sporulation efficiency, an increase in permeability

to exogenous substances, and production of inviable spores. An analysis of spore ultrastructure indicated that loss of *ScGas2p* and *ScGas4p* affects the proper attachment of the glucan to chitosan layers.

Since *gas4⁺* is involved in spore wall construction and its modular structure is similar to *ScGas4p*, and also shows a high level of sequence identity to *ScGas4p*, we investigated whether *gas4p* was able to complement the sporulation defect of budding yeast *gas2Δ gas4Δ* mutants. In order to allow the expression of the *S. pombe gas4⁺* gene in budding yeasts, it was cloned in a plasmid under the control of the *ScSPO20* promoter (P_{SPO20}) (plasmid pRS424- P_{SPO20}). *SPO20* is a sporulation-specific gene that is induced with a kinetics similar to the middle genes (Chu *et al.*, 1998). The resulting plasmid was termed pMMR38 (Fig. 56). The

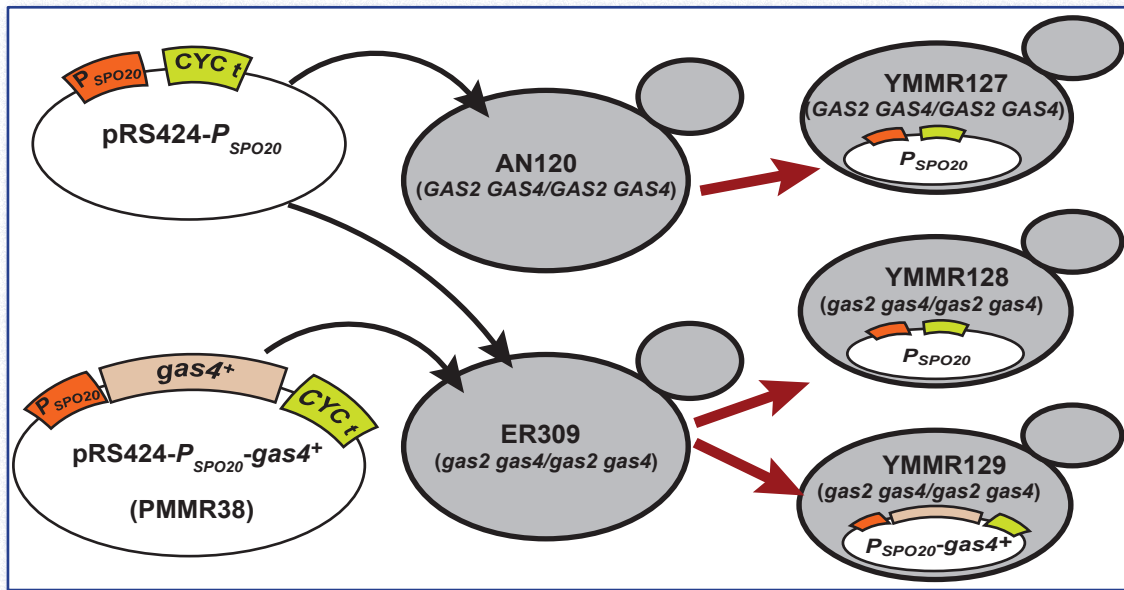


Figure 56. Experimental design to analyze whether *gas4p* is able to complement the *S. cerevisiae gas2Δ gas4Δ* mutant phenotype. *S. pombe gas4⁺* was cloned under the control of the *SPO20* promoter (vector pRS424- P_{SPO20}), resulting in plasmid pMMR38. Vector and plasmid were introduced in a homozygous *S. cerevisiae gas2Δ gas4Δ* mutant strain (ER309), and the resulting strains were named YMMR128 e YMMR129, respectively. Also, the wild-type strain (AN120) was transformed with the pRS424- P_{SPO20} , generating the YMMR127 strain.

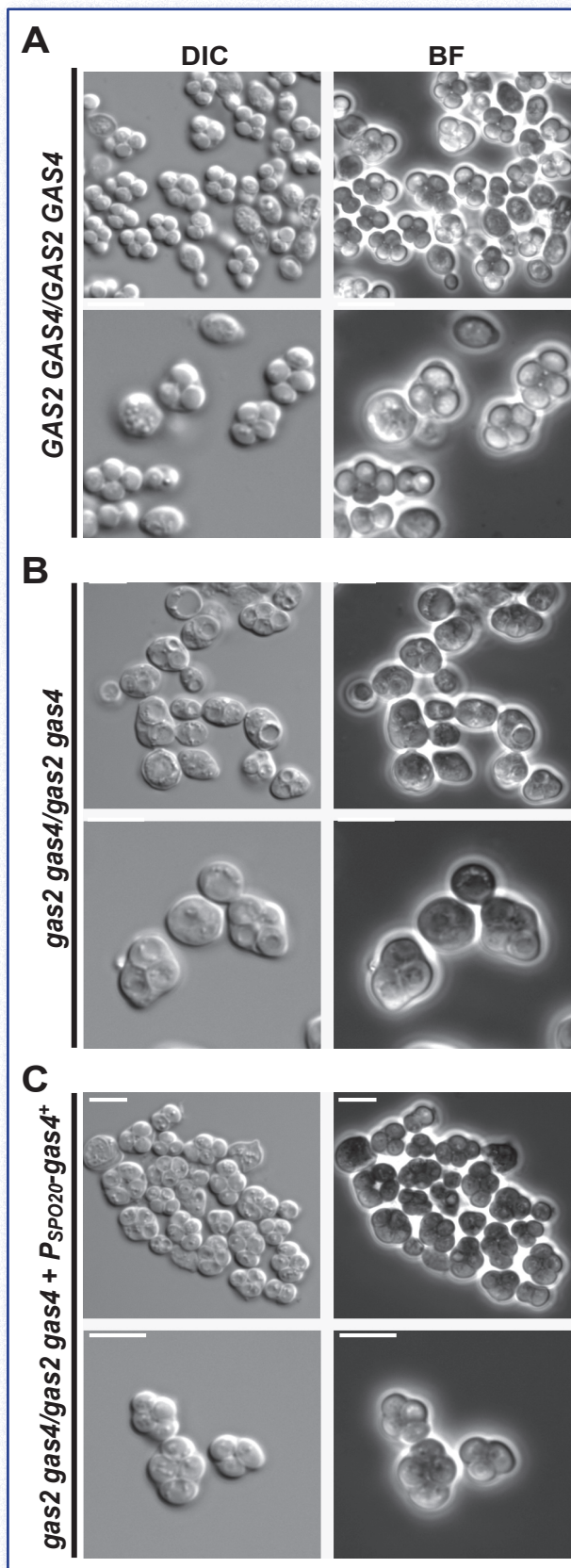
P_{SPO20} -*gas4⁺* plasmid was introduced in the ER309 strain (*gas2Δ gas4Δ/gas2Δ gas4Δ*); the resulting strain was named YMMR129. Strains E309 and its isogenic wild-type AN120 carrying the pRS424- P_{SPO20} vector were used as controls. These two strains were termed YMMR128 and YMMR127, respectively (Fig. 56).

The morphology of sporulating cells from the different strains was studied by phase contrast and DIC microscopic observation. The results showed that wild-type spores carrying the vector were round, arranged in the typical diamond-shape and also showed the characteristic refractility (Fig. 57A). In contrast, *gas2Δ gas4Δ* mutant spores carrying vector (YMMR128 strain) appeared less bright and refractile, the internal separation of the cytoplasm was unclear, and many granules were present. Moreover, mature spores were difficult to observe, since spore edges were not clearly visible or were very thin (Fig. 57B). These results were consistent with those previously described by Ragni and coworkers (2007a). Finally, when mutant spores carrying the *gas4⁺* gene (YMMR129) were analyzed, spores recovered their typical diamond disposition and part of the refractility (Fig. 57C). Also, these spores seemed to be more mature than those of the double mutant. In order to quantify the extent of the complementation, the

number of asci with at least one mature spore after 24 hours of sporulation was calculated. The published sporulation efficiencies for the wild-type (AN120) and the homozygous *gas2 gas4* mutant (ER309) strains were 73% and 30%, respectively (Ragni *et al.*, 2007a). In our experiment, the sporulating efficiencies for those strains carrying vector were similar to previous results (71% and 21%). As shown in Figure 58A, *gas4⁺* expression complemented the sporulation efficiency of the double *gas2 gas4* mutant to levels similar to the wild-type. These results indicated that *gas4⁺* gene is able to complement, at least to a great extent, the morphologic defects in spore maturation in a *S. cerevisiae* homozygous *gas2Δ gas4Δ* mutant strain.

In order to confirm whether the complementation was completely functional, two different experiments were carried out with strains YMMR127, YMMR128 and YMMR129. First, spores were stained with methylene blue, a vital dye used to indicate defects in cell viability. Microscopic analysis indicated that mutant spores carrying vector were stained with the dye in contrast to those expressing fission yeast *gas4⁺* (Fig 57B-C). This result indicated that budding yeast *gas2 gas4* mutant spores have severe defects in cell permeability and that this defect can be complemented by the fission yeast *gas4p*.

Figure 57. *gas4p* partially complements phenotypic defects of the *S. cerevisiae gas2Δ gas4Δ* mutant. Strains depicted in Figure 56 were incubated in Ack to induce sporulation. After 24 hours, samples were taken, exposed to methylene blue 0.6% and observed at the microscope using either Nomarski (DIC) or phase contrast techniques (Bright Field, BF). (A) Wild-type spores carrying the pRS424-*P_{SP020}* vector display normal morphology, with the characteristic refractility, and are not permeable to methylene blue. (B) *gas2Δ gas4Δ* mutant spores do not attain maturity and they are permeable to the vital dye. (C) *Spgas4p* partially rescues the phenotypic defects of sporulating *gas2Δ gas4Δ* mutants. Scale bars, 10 μ m.



Second, *S. cerevisiae* mutant *gas2Δ gas4Δ* spores have a reduced viability when compared to wild-type ascospores, and they are also more sensible to Zymolyase treatment as a consequence of defects in spore wall maturation (Ragni *et al.*, 2007a). In order to elucidate whether *S. pombe gas4p* also restored viability, we used a Zymolyase resistance assay. Zymolyase hydrolyzes the β -1,3-glucan layer of the ascus wall and releases the spores but is not able to degrade the glucan layer of the spore wall, since the chitosan and dityrosine layers limit its accessibility. Thus, the loss of the ability to form colonies after Zymolyase treatment is an index of increased spore wall permeability to Zymolyase. Quantitative Zymolyase sensitivity assays of sporulated cells after 24 h of incubation in sporulation medium were performed. The CFU values at different times after exposure to Zymolyase were compared to the value at time zero for each strain. The results showed that untreated *gas2Δ gas4Δ* spores have reduced viability when compared to the wild-type strain (2% vs 81%) and that *Spgas4p* can partially rescue this reduced viability (37%) (Fig. 58B, time 0). The wild-type spores were resistant to Zymolyase treatment and maintained a viability of 80% along the experiment. In contrast, *gas2Δ gas4Δ* mutant spores presented a strongly reduced viability (1-2%) and the effects of the enzymatic treatment were very hard to evaluate. Finally, *gas2Δ gas4Δ* mutant spores bearing *Spgas4p* were more resistant than the mutant spores (40%), but did not behaved completely as wild-type cells. Additionally, after 40-50 minutes of exposure to Zymolyase, there was a reduction in the number of viable colonies, indicating that the ascospore wall was not properly assembled and was not completely functional (Fig. 58B). Taking together, these experiments indicate that *gas4p* partially complements the sporulation defect of a *S. cerevisiae gas2Δ gas4Δ* mutant, suggesting that these proteins are functional homologues.

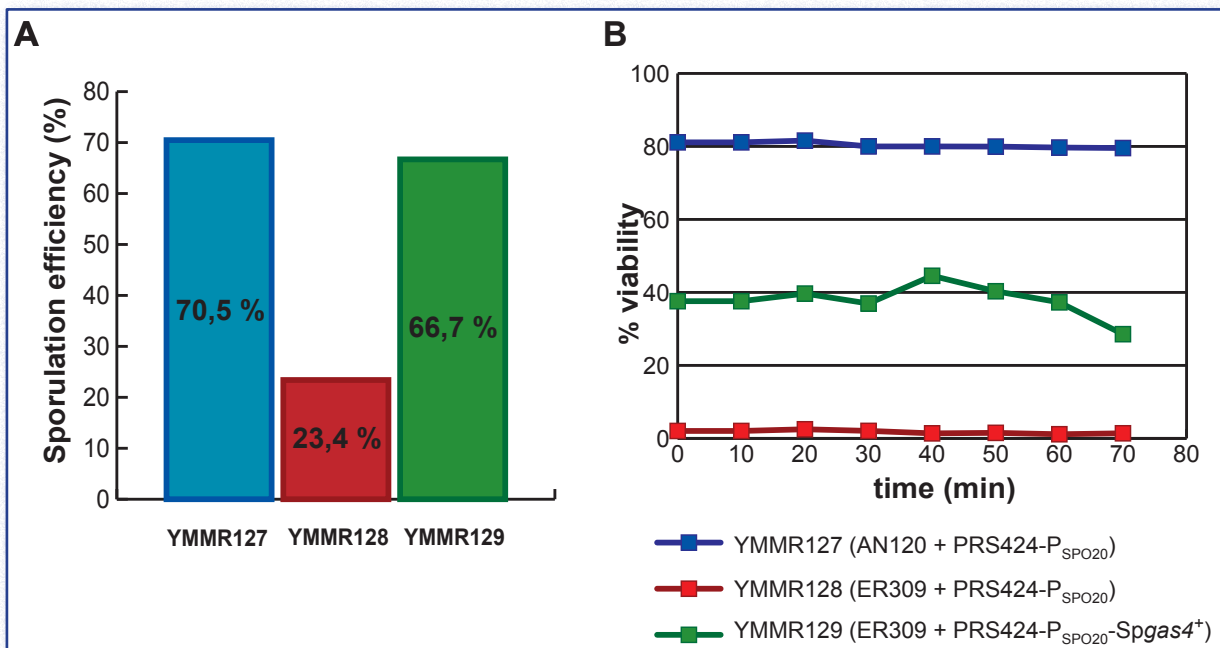


Figure 58. *gas4p* partially reverts defects in sporulation efficiency and inviability of *S. cerevisiae gas2 gas4* mutants. (A) Ectopic expression of *Spgas4p* in the budding yeast *gas2 gas4* mutant allows results in sporulation efficiencies similar to the wild-type strain (AN120). Strains YMMR127, YMMR128 and YMMR129 were induced to sporulate in AcK 2% for 24 hours. The number of mature asci was calculated (considering asci those structures containing at least one mature spore). (B) Zymolyase sensibility assay. Cells from different strains were exposed to Zymolyase for the indicated times and, then, plated in rich media to calculate the number of viable cells. For each strain, viability is expressed as the percentage of viable colonies with respect to the total number of plated cells (5000 cells per plate).

(XVI)- RESULTS

Characterization of the catalytic activity of *S. pombe* GH72 proteins

(XVI)- RESULTS: Characterization of the catalytic activity of *S. pombe* GH72 proteins

(XVI)- 1. Election of the protein expression system

The sequence similarity between gas1p, gas2p, gas4p and gas5p and other GH72 proteins, and the conservation of the sequence around the two aspartic acids that form the catalytic pair –FF(A/S)GNE*V (the acid-base donor) and F(F/L)SE*(Y/F)GCN (the nucleophilic residue) (Mouyna *et al.*, 2000b; Papaleo *et al.*, 2006)- suggested that *S. pombe* gas proteins could also display β -1,3-glucanase activity. Therefore, this part of the experimental work focused on the characterization of the enzymatic activity of fission yeast GH72 proteins.

As a general rule, a significant amount of pure protein is required to study its biochemical properties. Therefore, we designed an experimental procedure to produce large amounts of the proteins of interest and to eliminate contaminant proteins. Traditionally, the bacteria *E. coli* and the budding yeast have been used as systems for protein expression, as they are easy to manipulate. However, when selecting an organism for heterologous expression of proteins, it is important that protein folding and post-translational modifications are as similar as possible to the native organism. Since we were studying fission yeast, the expression system should be a eukaryotic cell, such as *S. cerevisiae*. However, *S. pombe* is closer to higher eukaryotes than the budding yeast, the post-translational modifications of proteins are different. Therefore, we considered to use another yeast, *Pichia pastoris*.

P. pastoris has many advantages of higher eukaryotic expression systems, such as protein processing, protein folding and post-translational modifications, but it is also easy to manipulate

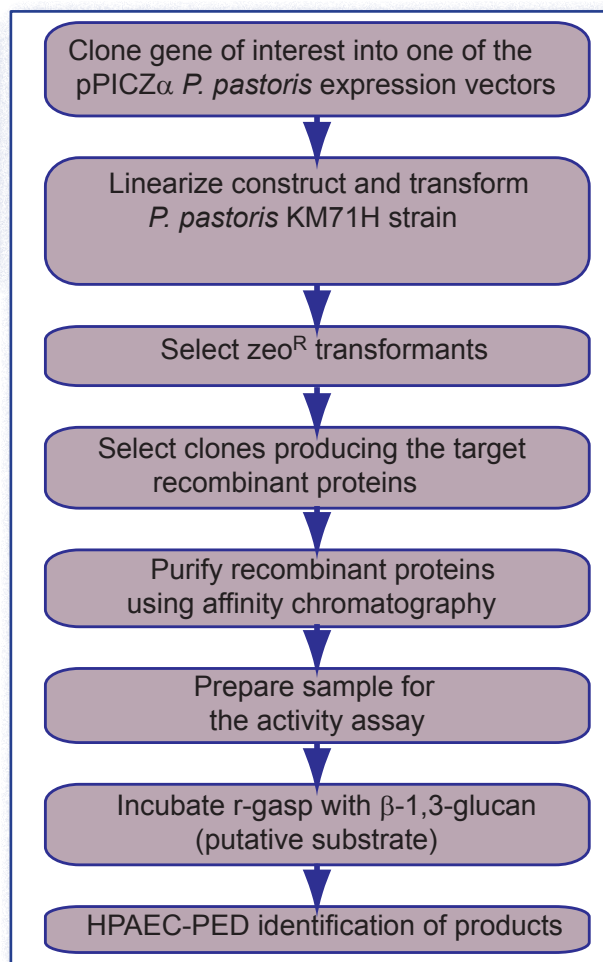


Figure 59. Overall experimental process for purification of recombinant proteins and analysis of catalytic activity.

as *S. cerevisiae*. As a yeast, it shares with *Saccharomyces* the advantages of molecular and genetic manipulations, but it provides a higher expression level (10- to 100-fold higher). These features make *Pichia* a very useful protein expression system.

The experimental design to express and purify the proteins and analyze their catalytic activity is depicted in Figure 59. More information about *Pichia pastoris* as expression system can be found in the literature (Higgins, 1995).

(XVI)- 1.1. *P. pastoris* as a methylotrophic yeast

P. pastoris is a methylotrophic yeast, capable of metabolizing methanol as its sole carbon source. The first step in methanol metabolism is the oxidation of ethanol to formaldehyde by the alcohol oxidase. In addition to formaldehyde, this reaction

generates hydrogen peroxide. To avoid hydrogen peroxide toxicity, methanol metabolism takes place within a specialized cell organelle, called the peroxisome, which sequesters toxic by-products away from the rest of the cell. Alcohol oxidase has a poor affinity for O₂ and *P. pastoris* compensates this by generating large amounts of the enzyme. The promoter regulating the production of alcohol oxidase is used to drive heterologous protein expression in *Pichia*.

(XVI)- 1.2. Two alcohol oxidase proteins

P. pastoris contains two genes coding for alcohol oxidase, *AOX1* and *AOX2*. The majority of alcohol oxidase activity in the cell is attributable to the product of the *AOX1* gene. Expression of the *AOX1* gene is tightly regulated and strongly induced by methanol, typically >30% of the total soluble protein of the cells. The *AOX1* gene has been isolated and a plasmid-borne version of the *AOX1* promoter is used to control expression of the gene of interest (Ellis *et al.*, 1985; Koutz *et al.*, 1989; Tschopp *et al.*, 1987a).

(XVI)- 1.3. *AOX1* expression

Expression of *AOX1* is controlled at the transcriptional level. In methanol, approximately 5% of the polyA⁺ RNA corresponds to the *AOX1* gene. It is regulated by two mechanisms, repression/derepression and induction (similar to the *Saccharomyces GAL1* gene; Johnston, 1987). Briefly, growth on glucose represses transcription, even in the presence of the inducer methanol. For this reason, growth on glycerol is recommended for optimal induction with methanol. The inducer, methanol, is necessary for high levels of expression (Ellis *et al.*, 1985; Koutz *et al.*, 1989; Tschopp *et al.*, 1987a).

(XVI)- 1.4. Intracellular and secretory protein expression

Heterologous expression in *P. pastoris* can be either intracellular or secreted. Secretion requires the presence of a signal sequence on the expressed protein to target it to the secretory

pathway. While several different secretion signal sequences have been used successfully, including the native secretion signal present on some heterologous proteins, the signal sequence from the *S. cerevisiae* α -factor prepro-peptide is normally used (Cregg *et al.*, 1993; Scorer *et al.*, 1993).

The major advantage of expressing heterologous proteins as secreted proteins is that *P. pastoris* secretes very low levels of native proteins. That means that the secreted heterologous protein is the majority of the total protein in the medium and this serves as the first step in the purification (Barr *et al.*, 1994).

(XVI)- 1.5. Post-translational modifications

In comparison to *S. cerevisiae*, *Pichia* has the advantage that the glycosylation level is lower. Both *S. cerevisiae* and *P. pastoris* have a majority of N-linked glycosylation of the high-mannose type; however, the length of the oligosaccharide chains to proteins in *Pichia* (average 8-14 mannose residues per side chain) is much shorter than those in *S. cerevisiae* (50-150 mannose residues) (Grinna and Tschopp, 1989; Tschopp *et al.*, 1987b). Very little O-glycosylation has been observed in *Pichia*.

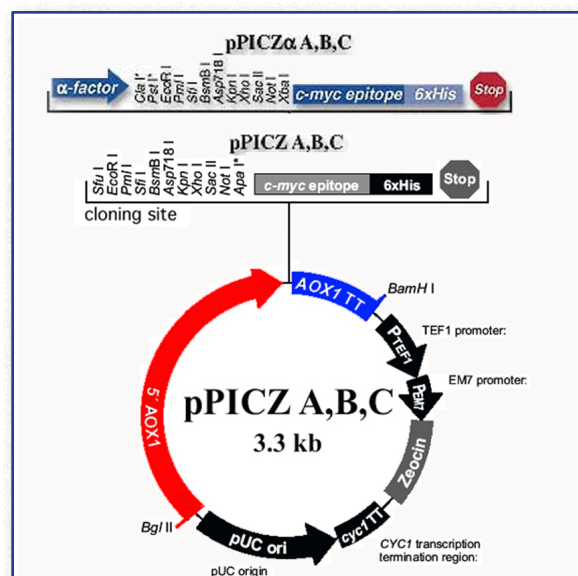


Figure 60. pPICZ and pPICZ α vectors. Maps of vectors from the EasySelectTM Expression Kit (Invitrogen). Both contain sequences to target integration of the gene of interest to the 5' *AOX1* region. Additionally, pPICZ α vector contains the coding sequence of the α -factor signal peptide.

(XVI)- 2. Selection of vector, cloning and transformation

The *EasySelect™ Expression Kit (Invitrogen)* provides two series of vectors for protein expression. The pPICZ series is used to express intracellular proteins, whereas the pPICZ α series is used for secreted proteins, as it contains the *S. cerevisiae* α factor signal sequence (Fig. 60). Both vector series contain the *c-myc* epitope (for

Western-blot detection) and the 6xHis epitope (for protein purification) after the multicloning site.

Two different aspects were considered when cloning the *S. pombe* GH72 proteins in the pPICZ α vectors. First, *S. pombe* proteins contain their own signal sequence at the N-terminus. Therefore, *S. pombe* GH72 proteins were cloned without their endogenous signal sequences, fusing the α -factor signal sequence before the GluTD regions of each protein. Second, gas1p, gas4p and gas5p

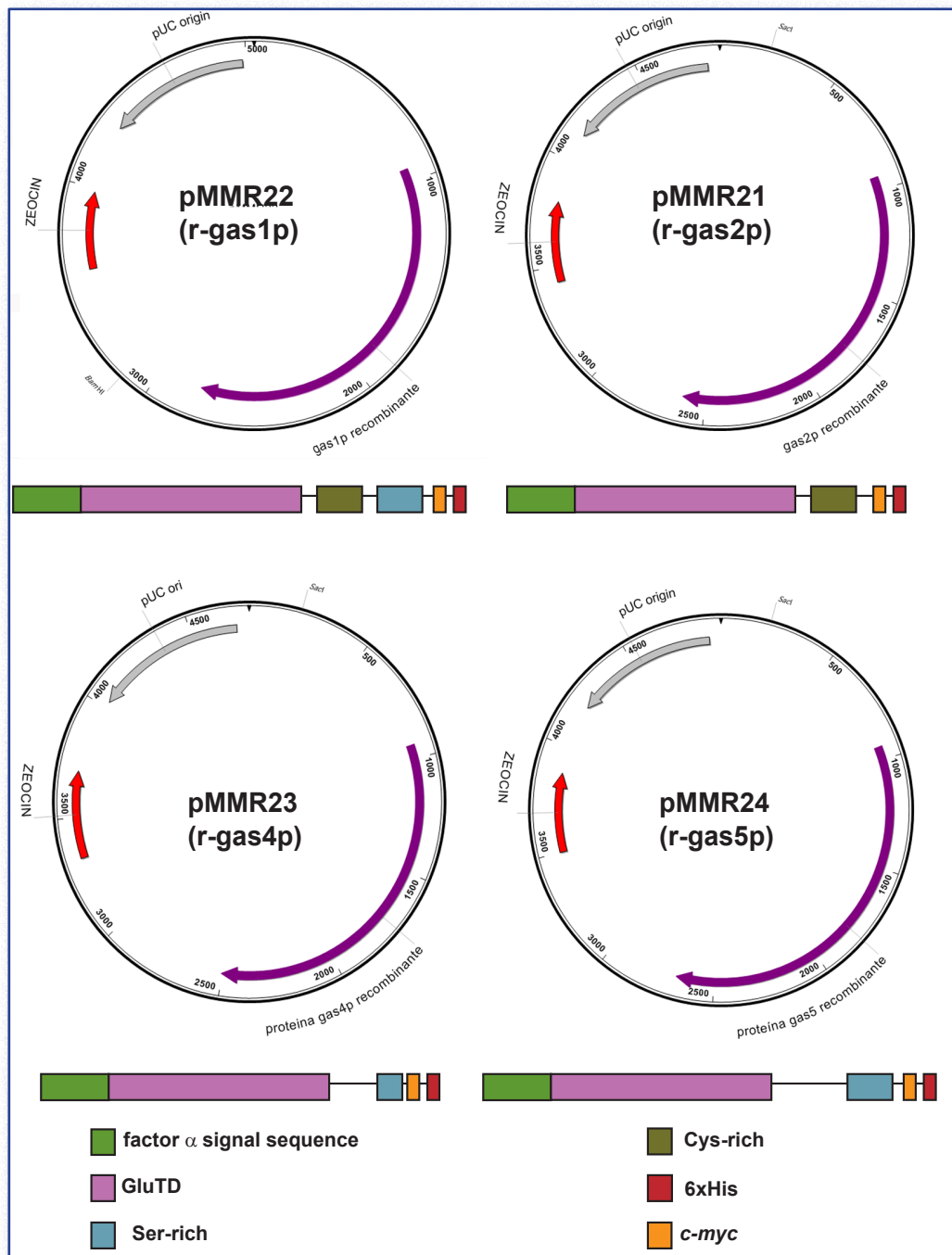


Figure 61. Plasmids pMMR21, pMMR22, pMMR23 and pMMR24. Schematic representation of plasmids generated for expression of the recombinant proteins (r-gas2p, r-gas1p, r-gas4p and r-gas5p) in *P. pastoris*. Schematic representation of the recombinant protein encoded in each plasmid is represented below them.

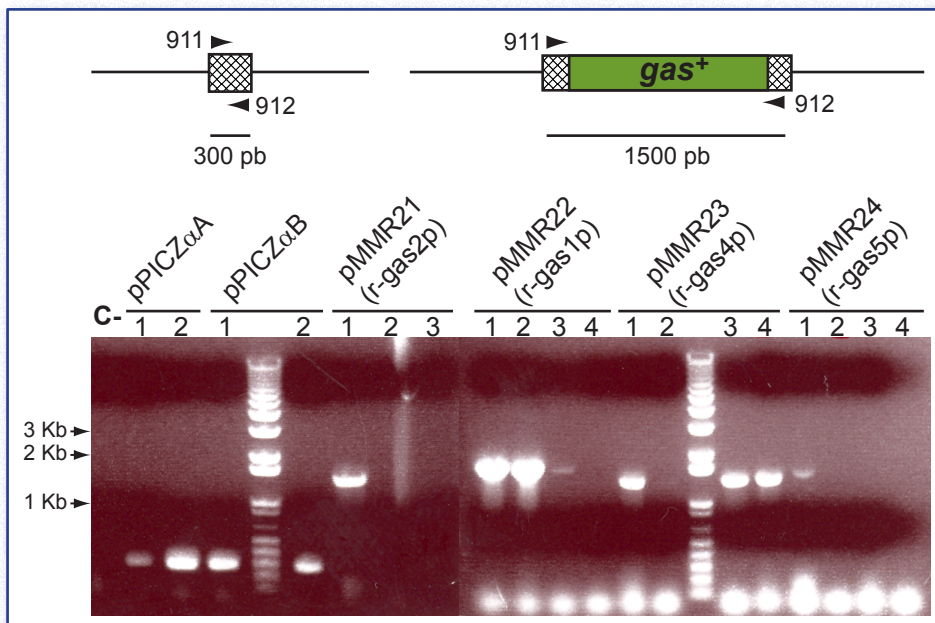


Figure 62. Confirmation of *P. pastoris* transformants by PCR. Transformants obtained after introducing each plasmid in the KM71H strain were analyzed by PCR using the primers 911 and 912. Transformants containing vector should generate fragments of 300 bp, while those carrying the recombinant plasmids should generate 1.5 Kb bands. The parental wild-type strain was used as a negative control. The vector or plasmid integrated in each transformant is indicated.

contain a putative GPI anchor, which may retain proteins at the membrane or cell wall. Since we intended to express these proteins in the culture supernatants to facilitate their purification, the GPI anchor was also removed. It has been shown that a recombinant form of the *A. fumigatus* Gel1p lacking the GPI signal has the same β -1,3-glucanosyl-transferase activity as the full-length protein (Mouyna *et al.*, 2000a). Thus, the *gas1⁺*, *gas4⁺* and *gas5⁺* were cloned without the GPI anchor signal, and containing 6xHis at the C-terminus. Since *gas2⁺* lacked the GPI anchor signal, the epitopes were fused to the last codon. The resulting plasmids were sequenced to confirm that the genes were cloned in frame, and they were termed pMMR21, pMMR22, pMMR23 and pMMR24 (for *gas2⁺*, *gas1⁺*, *gas4⁺* and *gas5⁺*, respectively) (Fig. 61).

The four plasmids and their corresponding vectors were linearized by *SacI* digestion and introduced in *P. pastoris* KM71 strain. Transformants were selected on YEPD + Zeocin and confirmed by PCR using primers 911 and 912. Integration of the vector (either pPICZ α A or pPICZ α B) should generate a 300 pb band in the PCR reaction, while 1.5 Kb DNA fragments should be amplified in those transformants containing the heterologous constructs. As it is shown in Figure 62, several clones from the different constructs were obtained. They were termed the strains YMMR53, YMMR54, YMMR62, YMMR55,

YMMR57 and YMMR58 (containing pPICZ α A, pPICZ α B, r-gas1p, r-gas2p, r-gas4p and r-gas5p, respectively).

(XVI)- 3. Selection of *P. pastoris* clones expressing the fission yeast GH72 proteins

Successful integration of the target construction into the *Pichia* genome does not guarantee proper protein expression. So, the next step was to confirm that the transformants were able to produce r-gas1p, r-gas2p, r-gas4p or r-gas5p. Expression was induced by incubation with methanol 1% for three days. Then, culture supernatants were assayed by SDS-PAGE. Proteins were visualized either by AgNO₃ staining (Fig. 63A) or by Western-blot using anti-*myc* antibodies.

The pattern of secreted proteins was compared to that of the wild-type strain (strains YMMR53 and YMMR54). Indeed, we observed the existence of clones producing r-gas1p, r-gas42p and r-gas5p proteins, which were not present in wild-type supernatants (Fig. 63A, C and D). Unfortunately, no specific band was detected in the culture medium of the YMMR55 clones assayed (Fig. 63B). The molecular weights of the proteins observed in the electrophoresis were significantly higher than the estimated molecular weight (Fig. 63). These

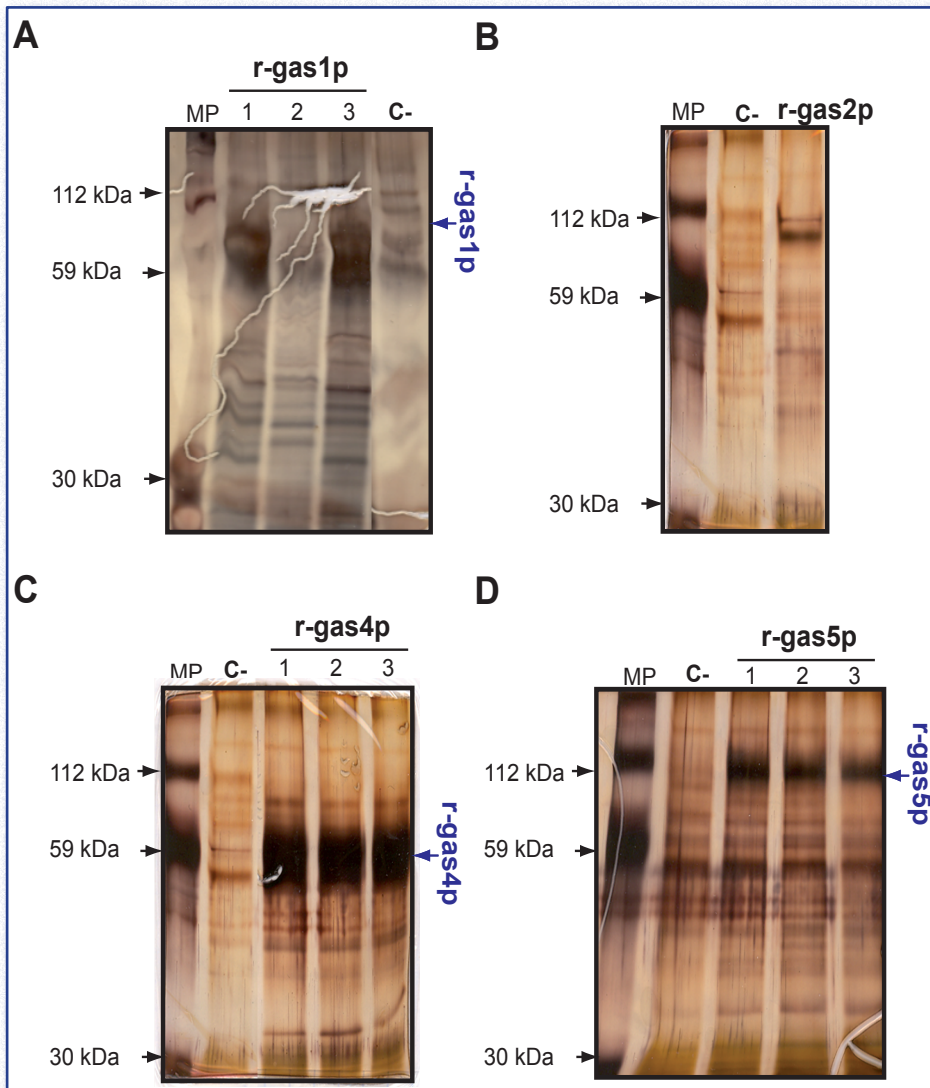


Figure 63. Clones producing recombinant proteins. Transformants were incubated with methanol 1% for 3 days and assayed for protein expression. The culture filtrates were analyzed by SDS-PAGE and stained with AgNO_3 . Culture supernatants of the KM71H strain carrying an integrated vector were used as a negative control (C-). The recombinant proteins accumulated in culture supernatants of the YMMR62 strain (A; r-gas1p), YMMR57 (C; r-gas4p) and YMMR58 (D; r-gas5p). r-gas2p was not detected in culture medium from the YMMR55 strain (B).

differences could be attributed to the presence of glycosylation, as these proteins contain putative sites for N-linked glycosylation (NXS/T) and a Ser-rich region close to the C-terminus that could be O-glycosylated.

In order to confirm the identity of the r-gas1p, r-gas4p and r-gas5p proteins identified by SDS-PAGE and AgNO_3 staining, Western-blot analysis using anti-*myc* antibodies was used (Fig. 64). As shown in the figure, the main bands observed in the gels were indeed the desired recombinant proteins. Both assays also pointed out another interesting data: r-gas5p molecular size was higher than r-gas1p, although both proteins have similar number of amino acids (614 aa for r-gas1p and 578 for r-gas5p). This fact suggests that the r-gas5p is more glycosylated than r-gas1p.

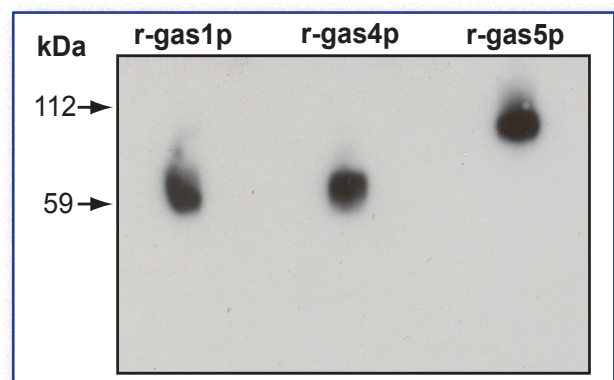


Figure 64. Western-blot analysis to confirm r-gas1p, r-gas4p and r-gas5p identity. Culture supernatans from YMMR62, YMMR57 and YMMR58 were analyzed by Western-blot using anti-c-*myc* antibodies. Bands of the same molecular weight as the major bands detected by SDS-PAGE were observed.

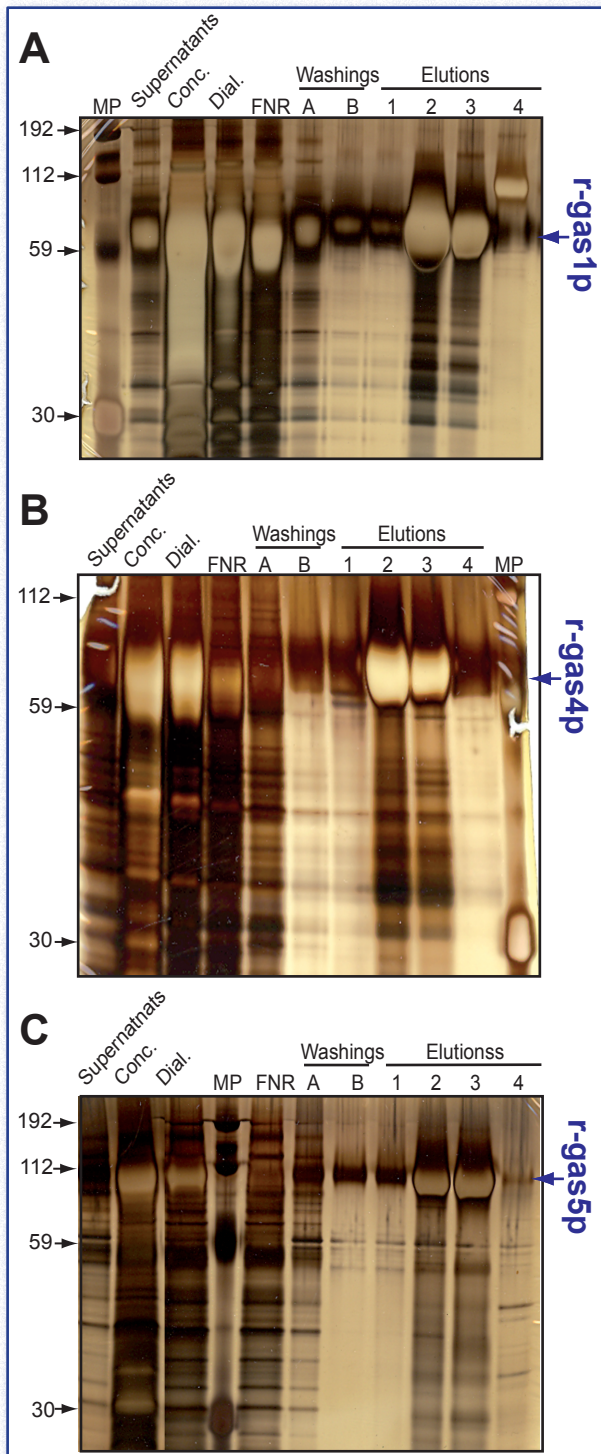


Figure 65. Analysis of purified recombinant proteins using SDS-PAGE and AgNO₃ staining. 5 μ L aliquots were collected after each purification step: culture supernatants, culture filtrates, dialyzed filtrates, not-retained fraction, washes A and B, and elutions 1-4. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained with AgNO₃. (A) r-gas1p purification. The majority of r-gas1p was present in elutions 2 and 3. (B) Purification of r-gas4p. (C) Purification of r-gas5p.

(XVI)- 4. Purification of r-gas1p, r-gas4p and r-gas5p

To assay the enzymatic activity, purification of the recombinant proteins was necessary since endogenous 1,3- β -glucanase and 1,3/1,6- β -glucanosyl-transferase activities are secreted to the culture medium by *Pichia*. Although they are only present in low amounts in comparison to the recombinant protein, their presence would interfere with the enzymatic determination of the activity, since these enzymes also act on the laminarioligosaccharide substrate (Goldman *et al.*, 1995; Mouyna *et al.*, 1998). The 6xHis tag was used for the purification steps.

Culture filtrates were subjected to affinity chromatography using the Ni-NTA His-Bind[®] Resin. The Ni²⁺ cations retained proteins containing the 6xHis epitope until they were eluted with an imidazol-containing buffer. Eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by AgNO₃ staining to test the degree of purification of the recombinant proteins (Fig. 65).

Although not completely pure, recombinant proteins present in fractions 2 and 3 (in each case) were significantly enriched to assay their catalytic activity. Once purified, proteins were dialyzed against acetate buffer prior to the enzymatic assays.

(XVI)- 5. Construction of a *P. pastoris* clone producing r-gas2p

Since no transformants expressing r-gas2p were obtained, one possibility was that the construct contained any non-sense mutation, preventing protein expression. Therefore, the *gas2*⁺ coding region cloned in pMMR21 was sequenced, but no error was found (data not shown), discarding this possibility. Another possible explanation was that r-gas2p was retained within *P. pastoris* cells. Western-blot of protein extracts from YMMR62 was performed, but r-gasp was not detected. Therefore, we decided to design a new construct to express r-gas2p in *P. pastoris*.

(XVI)- 5.1. r-gas2p', a new construct for gas2p

We decided to express r-gas2p without its C-terminus. *gas2+* sequence coding from Y20 to S450 (lacking the final 9 amino acids) was cloned in the pPICZ α A vector (Fig. 66A). The resulting plasmid was named pMMR34, linearized and integrated in the KM71H *P. pastoris* strain, obtaining the YMMR110 strain, which was confirmed by PCR (Fig. 66B).

Then, YMMR110 was assayed for r-gas2p expression in the supernatants cultures. Results

are shown in Figure 66C. YMMR110 supernatants contained big amounts of a protein that was not present in culture supernatants from the wild-type strain. Western-blot analysis using anti-*myc* confirmed that the band detected by SDS-PAGE was a recombinant form of gas2p (Fig. 66D).

(XVI)- 6. Purification of r-gas2p'

Since YMMR110 produced and secreted r-gas2p' to the culture medium, a purification procedure similar to that described for r-gas1p,

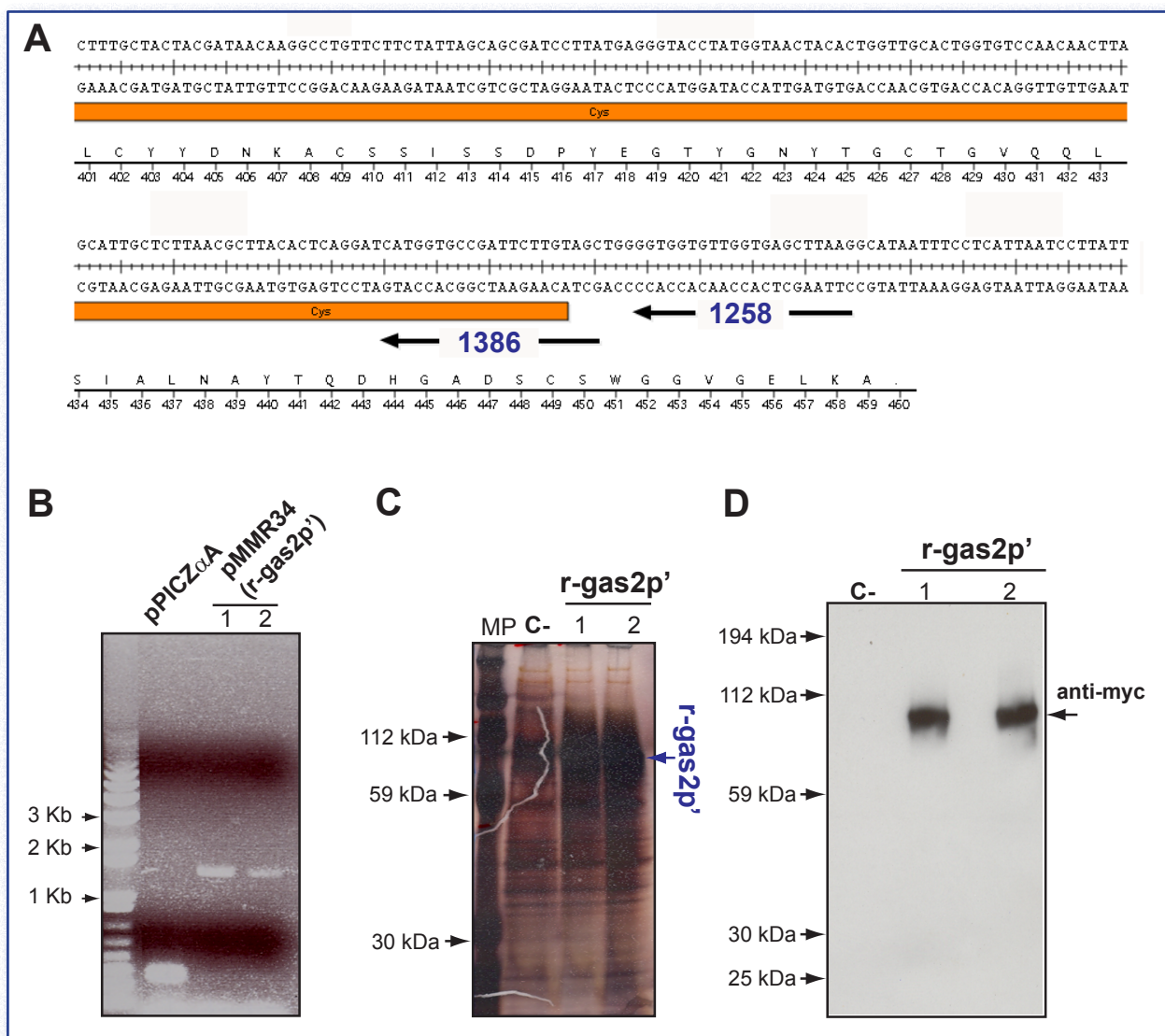


Figure 66. YMMR110 strain expresses a new recombinant form of gas2p. (A) Schematic representation of primers annealing in the 3' region of *gas2+* used for r-gas2p and r-gas2p' construction. To construct r-gas2p, primers 1257-1258 were used, and to construct r-gas2p', 1257-1386. The picture shows the *gas2+* region where primers 1258 and 1386 anneal. (B) Linearized pMMR34 (r-gas2p') was correctly integrated in strain YMMR110. Oligonucleotides 911 and 912 amplified a 1.5 Kb fragment, indicative of a correct integration. (C) YMMR110 strain secretes r-gas2p' to the culture medium when incubated in methanol 1%. Culture supernatants were analyzed by SDS-PAGE and AgNO₃ staining. YMMR110 culture supernatants contain a band absent in lanes corresponding to the control strain. (D) The protein is r-gas2p'. A Western-blot analysis using anti-*myc* antibodies confirmed the presence of the protein in culture supernatants of YMMR110 strain. C- corresponds to a wild-type strain culture supernatants.

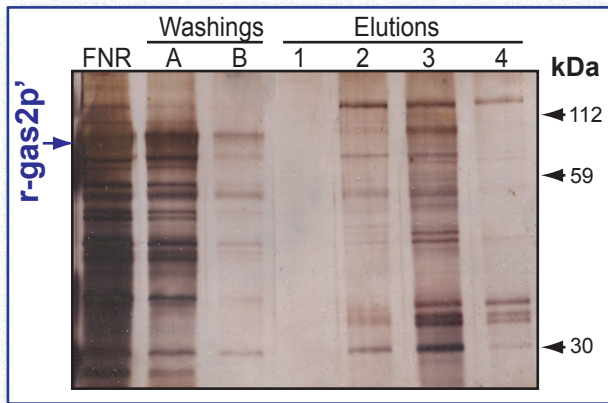
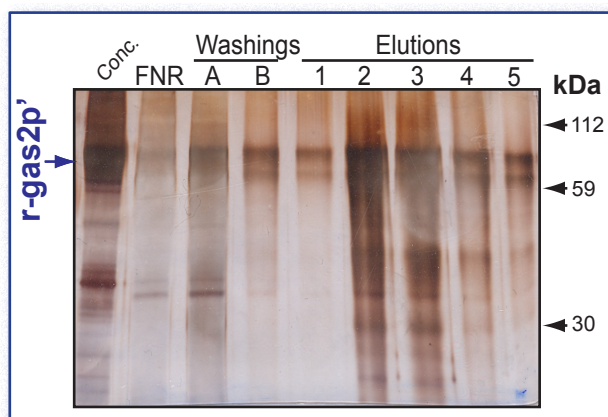


Figure 67. Native r-gas2p' does not display affinity for Ni-NTA resin. Culture supernatants were dialyzed against bind buffer and incubated with Ni-NTA resin before loading onto the chromatographic column. Not-retained fraction (FNR), washings A and B, and elutions 1-4 were recovered. The majority of r-gas2p' was eluted in fractions FNR and washings A.

r-gas4p and r-gas5p was performed. The eluted fractions were analyzed to test which one of them contained r-gas2p'. Surprisingly, the recombinant protein was not retained by the resin (Fig. 67).

As the 6xHis epitope should be responsible for retention of the protein, we hypothesized that this tag might not be properly exposed at the protein surface. When purification was done using denaturing conditions (urea 8 M pH8), r-gas2p' was retained in the resin until it was eluted with an acidic buffer (urea 8 M, pH 4.5) (Fig. 68). Renaturalization of r-gas2p' was done following the protocols based on Rudolph and Lilie's results (1996). Thus, r-gas2p' was dialyzed against a renaturing solution (TrisHCl 0.4 M pH 8, EDTA 5 mM, GSH 5 mM and GS-SG 1 mM) for 26 hours and then against an 50 mM acetate buffer. Catalytic activity of renaturalized r-gas2p' was tested with a qualitative glucanase assay, but no activity was detected.



(XVI)- 7. Two new recombinant forms of gas2p

Two new variant forms of r-gas2p were designed in an attempt to expose the 6xHis epitope at the protein surface.

(XVI)- 7.1. r-6xHis-gas2p and r-gas2p-ES-6xHis constructs

The first approach was to add an additional 6xHis tag at the N-terminus. *gas2+* was PCR-amplified using primers 1395 (introducing the 6xHis epitope) and 1386, and it was cloned between the *EcoRI* and *XbaI* in the pPICZαA vector. This new construct was termed "r-6xHis-gas2p" and the resulting plasmid, pMMR35 (Fig. 69A).

The second approximation introduced a spacer motif between the last serine residue of gas2p (S450) and the first residue of the c-myc epitope. This spacer consisted of Ala-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Ala sequence. The *gas2+* coding sequence was PCR-amplified using primers 1257-1396, cloned between the *EcoRI* and *XbaI* sites of the pPICZαA vector and the resulting plasmid was termed pMMR36. This construct was named "r-gas2-ES-6xHis" (Fig. 69B).

pMMR35 and pMMR36 were linearized, introduced in a KM71H *P. pastoris* strain and the transformants were confirmed by PCR (Fig. 69C). The resulting strains were termed YMMR124 (r-6xHis-gas2p construct) and YMMR125 (r-gas2-ES-6xHis construct).

Figure 68. Ni-NTA retains denatured r-gas2p'. Culture supernatants were dialyzed against a denaturing buffer (containing 8 M urea) and incubated with Ni-NTA resin. The sample was loaded onto the chromatographic column and not-retained fraction (FNR), washings A and B, and elutions 1-4 were recovered. The majority of r-gas2p' was present in elution fractions number 2 and 3.

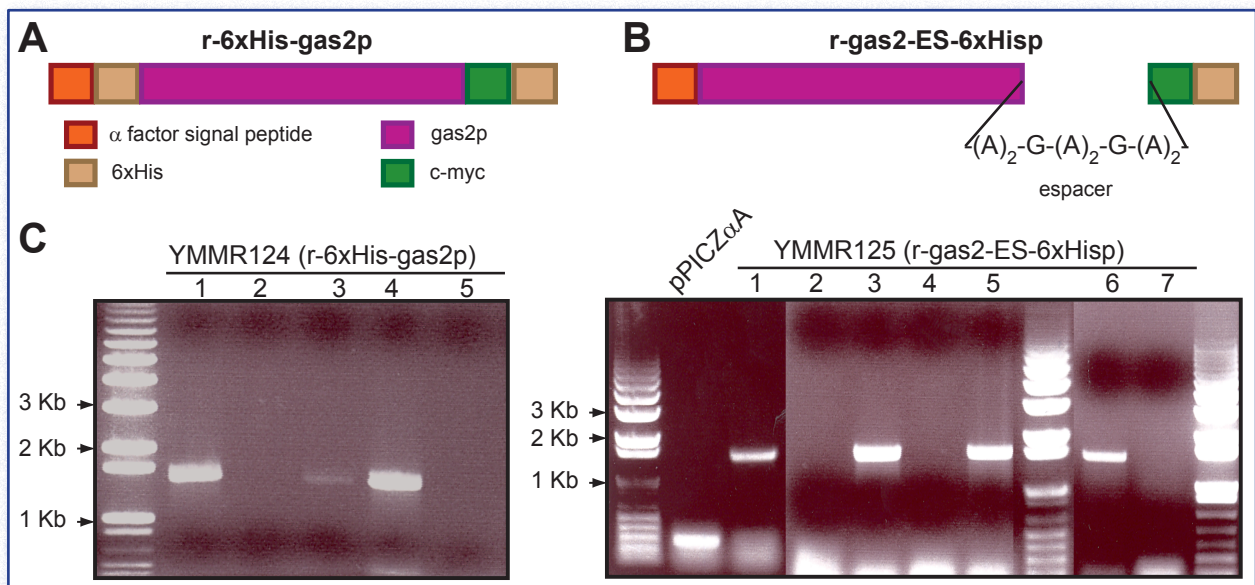


Figure 69. New recombinant forms of gas2p. (A) r-6xHis-gas2p construct. Schematic representation of the modular structure of r-gas2p bearing an extra 6xHis epitope between the α -factor signal peptide and the GluTD. It was cloned in plasmid pMMR35. (B) r-gas2-ES-6xHis construct. Schematic representation of the modular structure of r-gas2p bearing a spacer motif of 8 amino acids between gas2p and the 6xHis epitope. The spacer sequence is (Ala)₂-Gly-(Ala)₂-Gly-(Ala)₂. This construct was cloned in pMMR36. Color legend is similar to (A). (C) YMMR124 and YMMR125 strains contain constructs corresponding to r-6xHis-gas2p and r-gas2p-ES-6xHis, respectively. pMMR35 and pMMR36 were linearized and introduced in KM71H. Transformants were confirmed by PCR. The 1.5 Kb band was indicative of clones carrying integrated the constructs in their genome, and were termed YMMR124 and YMMR125, respectively.

(XVI)-7.2. Selection of clones expressing r-6xHis-gas2p and r-gas2-ES-6xHis

YMMR124 and YMMR125 were tested for protein expression in the culture media. For that purpose, YMMR124, YMMR125 and YMR53 (negative control) were incubated in methanol-containing medium for three days before culture supernatants were assayed by Western-blot using anti-*myc* antibodies (Fig. 70). As shown in the Figure, both strains produced the new recombinants forms of r-gas2p', but YMMR124 secreted higher amounts of the recombinant protein than YMMR125. So, strain YMMR124 was chosen for r-6xHis-gas2p purification.

(XVI)- 7.3. r-6xHis-gas2p purification

The new recombinant protein r-6xHis-gas2p was purified using Ni-NTA His-Bind[®] Resin in native conditions. The different fractions recovered from the column were analyzed by SDS-PAGE to test whether this recombinant form was retained by the resin. In contrast to r-gas2p', r-6xHis-gas2p was efficiently retained by the resin until the elution buffer was added (Fig. 71). A fraction of r-6xHis-gas2p was present in the not-retained fraction and washes, perhaps due to the fact that the amount of protein loaded saturated the binding ability of the resin.

In contrast to r-gas1p, r-gas4p and r-gas5p, which mainly eluted in fractions 2 and 3 (Fig. 65), r-6xHis-gas2p appeared in fractions 1 and 2. This fact suggested that the affinity of this recombinant form of gas2p is lower than the other recombinant proteins. Finally, purified r-6xHis-gas2p was dialyzed against 50 mM acetate buffer.

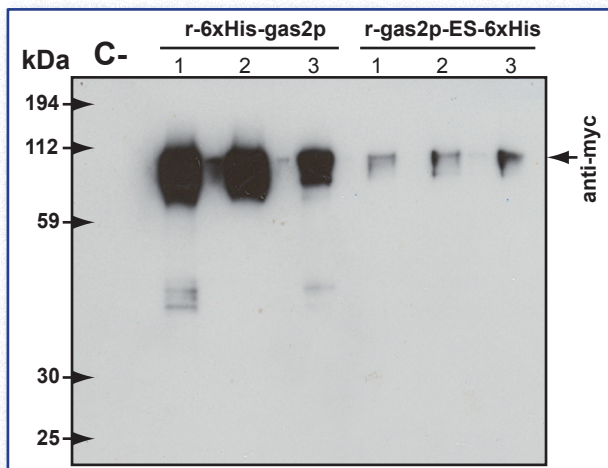


Figure 70. YMMR124 and YMMR125 express the new recombinant forms of *gas2p*. Cells from YMMR124 and YMMR125 strains were incubated in methanol 1 % for 3 days to induce r-6xHis-*gas2p* and r-*gas2p*-ES-6xHis expression. Then culture supernatants were recovered and analyzed by Western-blot analysis using anti-*cmyc* antibodies. All the clones produced recombinant proteins, although in different amounts.

(XVI)- 8. *S. pombe* gas proteins are β -1,3-glucanosyl-transferases

Catalytic activity of other GH72 family members has been determined previously, and the enzymes have been characterized as β -1,3-glucanosyl-transferases (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007b). These results suggested that an enzymatic assay discriminating between a hydrolytic or a transferase activity was needed.

When characterizing the catalytic activity of glycosyl-hydrolase enzymes, the assays are based on their ability to increase the number of free reducing ends. For example, β -1,3-endoglucanase activity of *Speng1p*, *ScEng1p* and *ScEng2p* can be assayed incubating them with reduced laminarioligosaccharides (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008). Due to their endohydrolytic action, the newly generated reducing ends can be measured by a colorimetric reaction (PABAH reaction), in which the amount of colour represents the amount of new reducing ends.

Since β -1,3-glucanosyl-transferases transfer an oligosaccharide from a donor to an acceptor oligosaccharide, the number of reducing ends remain constant. Thus, to measure the activity of

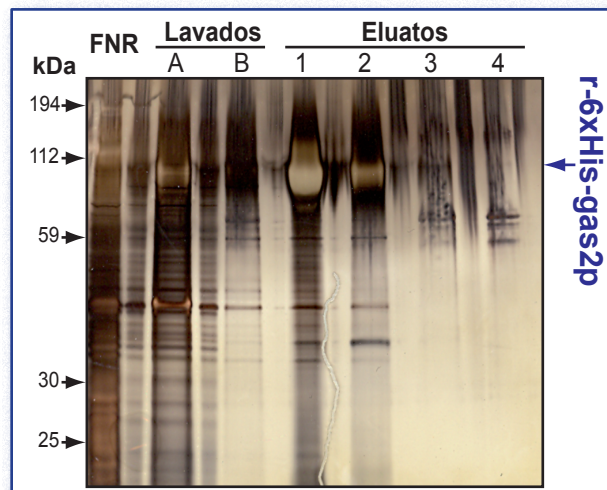


Figure 71. Native r-6xHis-*gas2p* displays affinity for the *Ni-NTA* resin. Culture supernatants from strain YMMR124 were concentrated, dialyzed against the bind buffer and incubated with *Ni-NTA* resin. The sample was loaded onto the chromatographic column and not-retained fraction, washings A and B, and elutions 1-4 were recovered. The majority of the recombinant protein was recovered in eluted fractions 1 and 2.

these proteins, a method allowing the separation and detection of the products of the reaction was used. This method is based on High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using a resin for anionic exchange (HPAEC), coupled to a Pulse Electric Detector (PED). This technique allows the analysis of the size of the products, as the oligosaccharides are eluted from the column progressively depending on their size, that is, smaller molecules are eluted first than the bigger ones.

In order to study the catalytic activity of *S. pombe* GH72 proteins, they were incubated with reduced laminarioligosaccharides of 13 glucose units (G_{13r}) for different times, before the newly generated products were analyzed by HPAEC-PED. Incubation of r-*gas1p*, r-*gas4p* and r-*gas5p* incubated with G_{13r} generated a set of new β -1,3-glucan products after 30 minutes of incubation, and the amount of products increased with the incubation time, and the amount of products increased with the incubation time (Fig. 72). The resulting products were smaller and larger than the starting substrate, indicating that the protein was catalyzing a transfer reaction.

The results revealed that the products of r-*gas1p* and r-*gas4p* were very similar to those generated by *ScGas1p*, *ScGas4p*, *AfGel1p* and

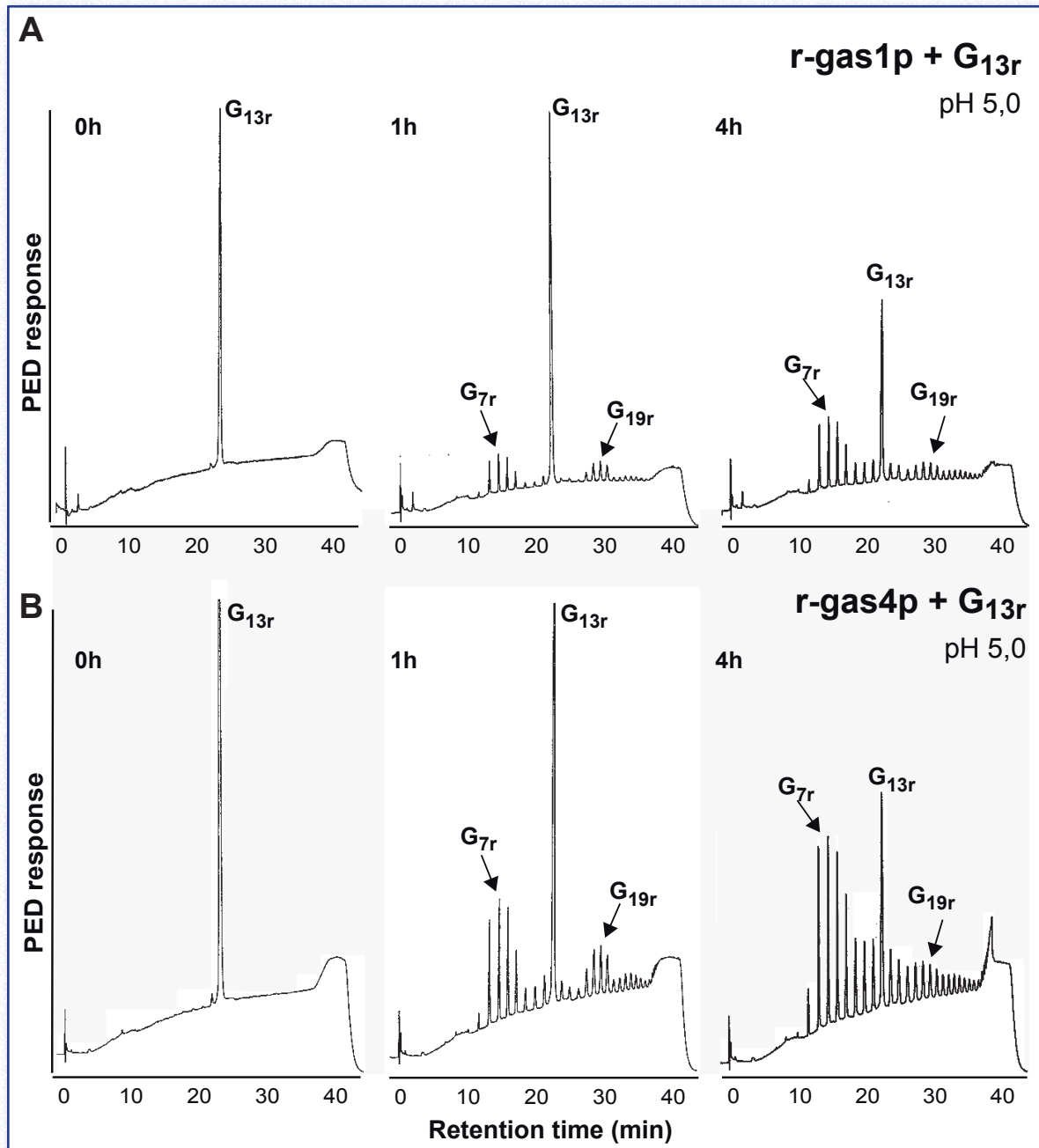


Figure 72. gas1p and gas4p display β -1,3-glucanosyl-transferase activity *in vitro*. Recombinant gas1p (A) and gas4p (B) expressed in *P. pastoris* were incubated with reduced G13 (G_{13r}) in 100 mM acetate buffer (pH 5.0) for the indicated times. The reaction products were analyzed by HPAEC and the major products are indicated.

AfGel2p (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007b) (Fig. 72A-B). The chromatogram shows that the enzyme preferentially released an oligosaccharide of 6-7 glucose units from the non-reducing end of the donor molecule and transferred it to the acceptor laminarioligosaccharides. Thus, the main products were G_{7r}, G_{8r} and G_{19r}, according with the two-step reaction described by Hartland and co-workers (1996) (Fig. 75).

Analysis of r-gas5p indicated that it was also able to use G_{13r} as a substrate, but generated different reaction products. These were G_{9r} and G_{17r}, indicating that gas5p catalyzes the transfer of an oligosaccharide of 4 glucose units between two β -1,3-glucan chains (Fig. 75). Interestingly, a similar transfer pattern was recently described for its closest homolog in *S. cerevisiae*, ScGas5p (Ragni *et al.*, 2007b).

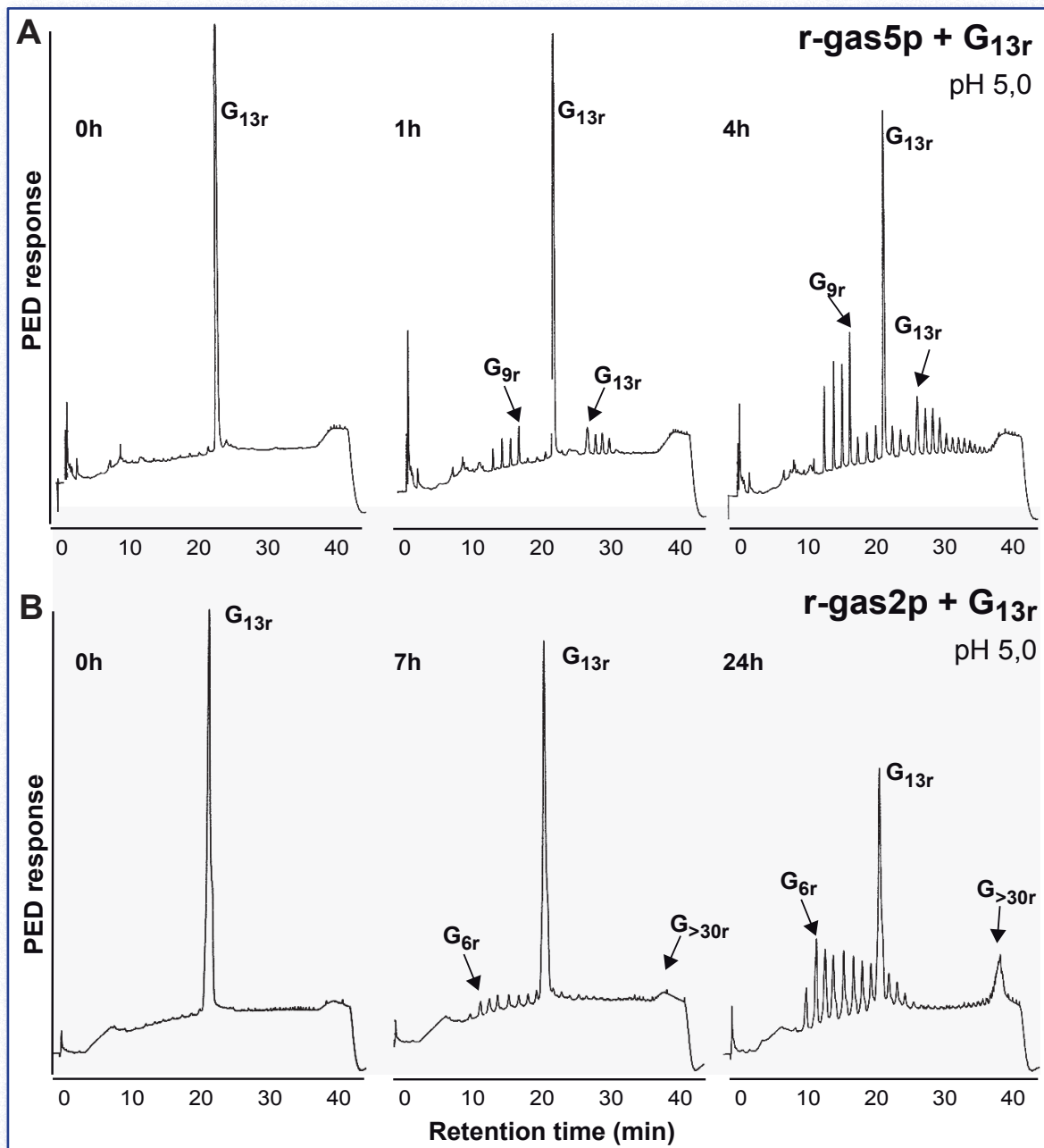


Figure 73. gas5p displays β -1,3-glucanosyl-transferase activity *in vitro*. Recombinant gas5p (A) and gas2p (B) expressed in *P. pastoris* were incubated with reduced G13 (G_{13r}) in 100 mM acetate buffer (pH 5.0) for the indicated times. The reaction products were analyzed by HPAEC and the major products are indicated.

Several interesting results were obtained when r-gas2p was incubated with G_{13r}. First, it was necessary to use higher amounts of the recombinant protein to observe transfer products (20 mg/mL of r-gas2p vs 0.06 mg/mL of r-gas1p, r-gas4p or r-gas5p). Second, the pattern of products was very different to those generated by all other GH72 proteins analyzed when incubated with G_{13r}. The initial products were smaller than the reaction substrat, their polymerization degree ranging from 6 to 9 glucose units, but the expected transfer products -glucan chains of 17-19 glucoses- were

absent. Transfer products only appeared after 24 h of incubation, but they had a polymerization degree higher than 30 (Fig. 73B). This result suggested that G_{13r} might not be the optimum substrate for r-gas2p. Therefore, r-gas2p was incubated with laminarioligosaccharides of 19 glucose units (G_{19r}) for different times, and the reaction products were analyzed by HPAEC-PED. This time, a symmetric pattern of cleavage and transfer was generated (Fig. 74). Interestingly, gas2p catalyzed the transfer an oligosaccharide of 11 units between the donor and acceptor molecules, as the main

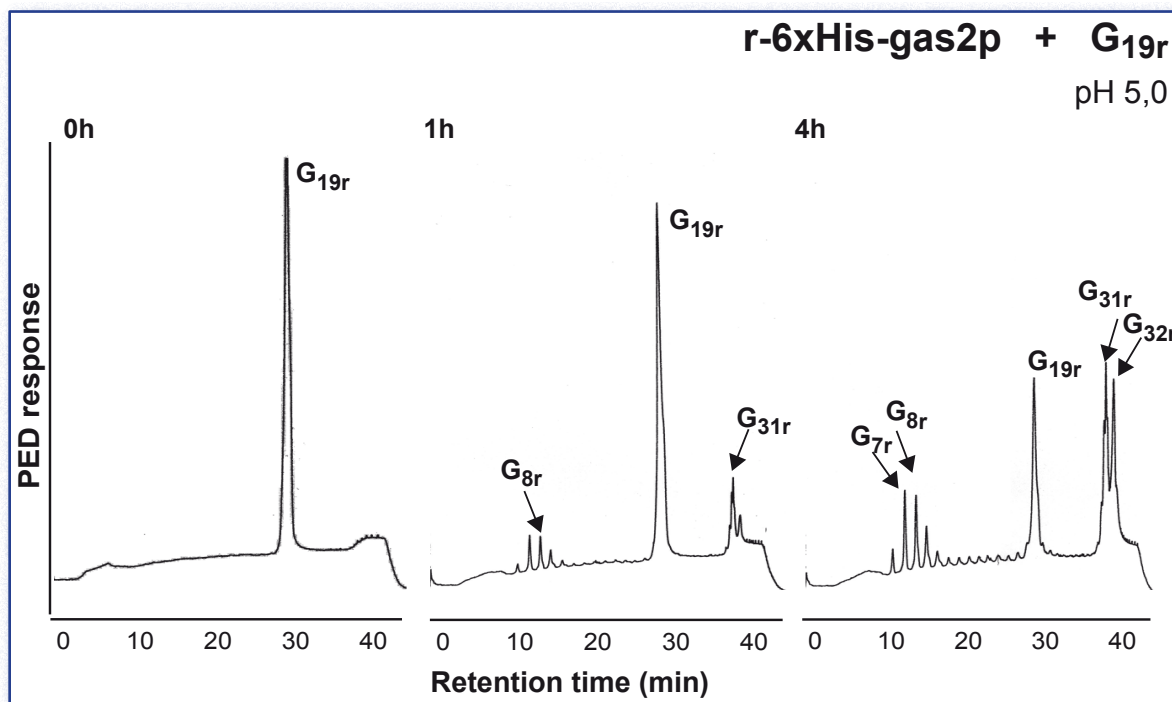


Figure 74. gas2p is also a β -1,3-glucanosyl-transferase. r-6xHis-gas2p expressed in *P. pastoris* was incubated with G_{13r} in 100 mM acetate buffer (pH 5.0) for the indicated times. The reaction products were analyzed by HPAEC and the major products are indicated.

reaction products were G_{8r} and G_{31r} (Fig. 75). The complex pattern observed after prolonged incubation times indicated that the initial transfer products could be subsequently reused either as donors or acceptors, resulting in a broad range of transfer products of increasing size (degree of polymerization >30) until they became alkali-insoluble. Comparison of the HPAEC pattern with control laminarioligosaccharides showed that all products contained only β -1,3 linkages, because

the introduction of a linkage other than β -1,3 results in a change in the retention time of the branched oligosaccharide (Koizumi *et al.*, 1989; Mouyna *et al.*, 1998). The minimum oligosaccharide that could be used in the reaction was an oligosaccharide of 9 glucose units (data not shown), and the optimum pH was slightly acid: pH 5.0. These results indicate that the β -1,3-glucanosyltransferase activities of *S. pombe* GH72 proteins are similar to that of other proteins of the GH72 family.

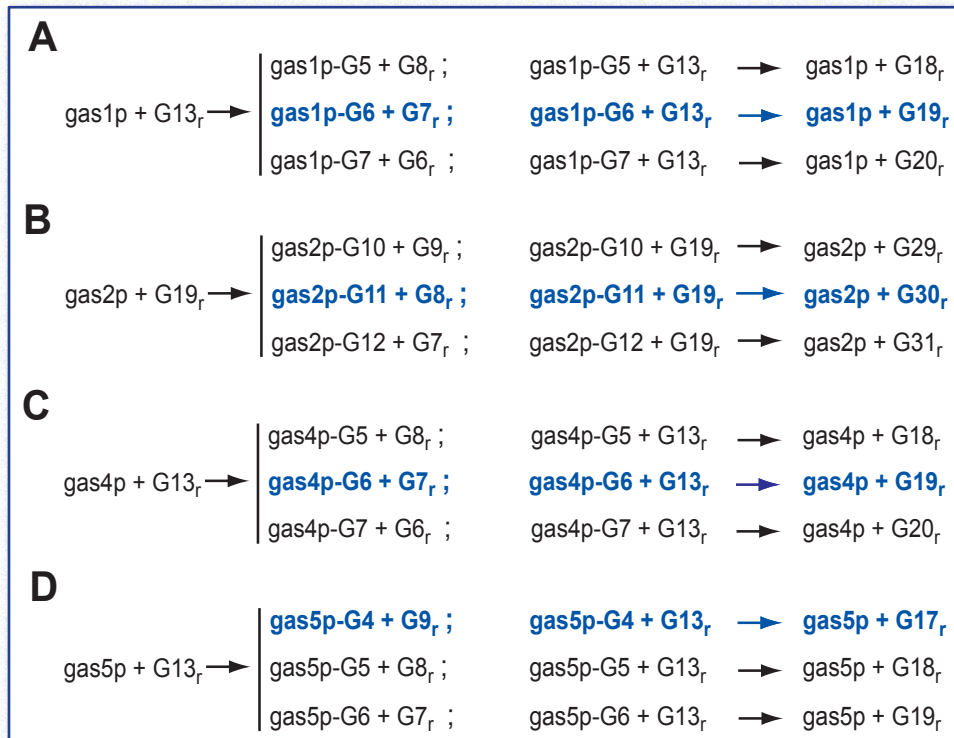


Figure 75. Major two-step reactions catalyzed by *S. pombe* GH72 proteins. The main reaction is indicated in blue for each protein.

(XVII)- DISCUSSION

DISCUSSION

S. pombe is an attractive morphogenetic model for understanding how fungi, and cells in general, regulate their polarized growth (Brunner and Nurse, 2000; Chang, 2001; Fischer *et al.*, 2008; Mata and Nurse, 1998; Verde, 1998) and cytokinesis through the cell cycle (Balasubramanian *et al.*, 2004; Barr and Gruneberg, 2007; Chang and Peter, 2003; Guertin *et al.*, 2002; Hayles and Nurse, 2001; Krapp *et al.*, 2004; McCollum and Gould, 2001). Interest has also focused on the biosynthesis and remodelling of the cell wall (Arellano *et al.*, 1999; Cabib *et al.*, 1998; Cabib *et al.*, 2001). However, little is known about how fission yeast synthesizes and regulates its cell wall components during these processes; in particular β -1,3-D-glucan synthesis as the main structural polysaccharide of the vegetative cell wall and one of the most abundant polymers in the ascospore wall.

Growth and remodelling of the β -1,3-glucans of the fungal cell wall through the cell cycle involves the synthesis of linear chains by the β -1,3-glucan-synthase complex (β GS) and their cross-linking to other polymers of the cell wall (chitin, α -1,3-glucan, β -1,3-glucan, β -1,6-glucan or proteins). This latter step needs, on the one hand, the hydrolysis of pre-existing polymers by hydrolytic enzymes such as endo- and exo-glucanases and, on the other hand, the attachment of the new components to other components by action of glucosyl-transferases.

Concerning the enzymes involved in the non-degradative remodelling of the cell wall polysaccharides, many studies have focused on the identification of the proteins involved in the branching of the β -1,3-glucans to form the β -1,6-branched- β -1,3-glucan. However, these efforts have been unsuccessful, although they allowed the identification and description of ScBgl2p and their homologs in *A. fumigatus* and *C. albicans* (Goldman *et al.*, 1995; Kalebina *et al.*, 2002; Mouyna *et al.*, 1998; Mrsa *et al.*, 1993; Sarthy *et al.*, 1997). These enzymes, belonging to the GH17 family, are able to introduce a β -1,6-linkage in the β -1,3-glucan chain. Additionally, GH72 proteins might help in

1,3-glucan remodelling, by elongating side chains. The best characterized proteins of this family are ScGas1p, AfGel1p and CaPhr1p (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000a; Popolo and Vai, 1999). In spite of the large number of studies on the function and biochemical characteristics of these proteins, cell wall composition in *S. pombe* differs from these species, since fission yeast cell wall contains α -1,3-glucan, the β -1,6-glucan (diglucan) is different from other yeast and no significant amount of chitin is present (Klis *et al.*, 2006; Lesage and Bussey, 2006). These differences prompted us to undertake the present research project, in order to determine whether fission yeast had any GH72 proteins, as they might not be required in this organism due to its different cell wall composition. Also, to study whether they perform the same biological function, since differences in *S. pombe* and *S. cerevisiae* life cycles and previous results from our laboratory showed that results obtained in budding yeast cannot always be extended to fission yeast.

A search of the *S. pombe* database (Wood *et al.*, 2002) for proteins with sequence similarity to the *S. cerevisiae* glucanosyl-transferase ScGas1p allowed the identification of four enzymes with a domain homolog to the GluTD characteristic of GH72 family members. These proteins were named gas1p, gas2p, gas4p and gas5p. This work focuses on the characterization of the *S. pombe* GH72 proteins, especially of gas1p and gas4p and their contribution to the cell wall organization during vegetative growth and sporulation.

(XIV)- 1. gas1⁺, gas2⁺, gas4⁺ and gas5⁺ code for proteins homologues to ScGas1p in *S. pombe*

S. pombe GH72 genes are homologs to the *GAS/PHR/EPD/GEL* genes, which code for a family of GPI-proteins required for proper morphogenesis in fungi and yeasts (Caracuel *et al.*, 2005; Carotti *et al.*, 2004; Fonzi, 1999; Hartland *et al.*, 1996; Mouyna *et al.*, 1998; Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005; Popolo and Vai, 1999; Ragni *et al.*, 2007a; Ragni *et al.*, 2007b). GH72

proteins present a modular structure in which the catalytic domain (GluTD) might be followed by several regions at the C-terminal end (Papaleo *et al.*, 2006). This modular structure (with its variations) is also shared by the *S. pombe* GH72 proteins. For example, gas1p displays a serine-rich region and a cysteine-rich region, while gas2p has only the Cys-box and gas5p has the serine repeats. In contrast, gas4p does not show any of these additional regions (it only contains a short Ser-rich domain) (Fig. 25).

Before analyzing and characterizing their biological functions, the four putative ORFs were confirmed to be real (transcribed) genes and not pseudogenes. The fact of all of them being transcribed during vegetative growth, although to different extent, indicated they were real genes. A detailed study revealed that expression of the different genes varied along the life cycle (vegetative growth and sporulation), and it also oscillated periodically through cell cycle in some cases (Fig. 28B and 29C-D). This tight transcriptional regulation for the different genes suggested that they are indeed real ORFs and not pseudogenes. *gas1⁺* and *gas5⁺* transcripts accumulate prior to septation, while *gas2⁺* mRNA levels are higher after anaphase. Finally, transcription of these three genes decreased during sporulation, whereas *gas4⁺* mRNA levels increased progressively and peaked during spore wall synthesis (de Medina-Redondo *et al.*, 2008).

In *S. pombe*, members of several gene families, such as the β -1,3-glucan synthase family, have specialized functions during the life cycle of this yeast. Thus, while *cps1p/bsg1p*, *bgs3p* and *bgs4p* are indispensable for vegetative growth, only *bgs2p* is required for the synthesis and maturation of the ascospore wall (Cortés *et al.*, 2002; Cortés, 2005; Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000; Martín, 2002; Martín *et al.*, 2003). Similarly, within the *S. pombe* GAS gene family, *gas4p* is essential for spore maturation and viability, while the other three members -*gas1p*, *gas2p* and *gas5p*- could perform their function during the vegetative cycle.

Interestingly, *gas4⁺* mRNA size was higher than expected (Fig. 28A). According to the information from *GeneDB*, *gas2⁺* and *gas4⁺* have similar number of nucleotides. Therefore, their transcripts are expected to have a similar size and to generate proteins of similar molecular weight. However, Northern-blot analysis indicated that *gas4⁺* transcript was higher than *gas2⁺* mRNA. This phenomenon was not further studied, but a possible explanation is that genes expressed during sporulation might be differently regulated from vegetative genes. One of these differences could be the transcription start point, so that the 5'-UTR region would be longer in *gas4⁺* than in *gas2⁺*. However, when *gas4⁺* was cloned in plasmids for several experiments (containing only a 500 bp region before the ATG codon 500 nucleotides after the stop codon), the protein was efficiently expressed from these plasmids. Thus, the *gas4⁺* promoter should be contained within this 500 bp 5'UTR, although mRNA length was not studied in these experiments, and it is also possible that the transcripts generated from such plasmids would be shorter than those generated from the genomic *locus*.

(XIV)- 2. *gas2p* is an unusual member of the GH72 family

A striking observation is that *S. pombe gas2p* is annotated in the database as a protein lacking a GPI attachment signal, which is a feature present in all other known GH72 members. Recently, Ragni and co-workers (2007b) suggested that *gas2p* could be either non-functional or an unusual secreted protein, since it not only lacks the hydrophobic sequence at the C-terminus, but also contains a truncated Cys-box. Indeed, *gas2p* clusters with the GH72⁻ subfamily in spite of the presence of a Cys-rich region.

The Cys-box, annotated as Pfam X8 (Pfam PF07983) in the databases, is shared by some plant proteins, such as Ole e 9 and Ole e 10, a family GH17 β -1,3-glucanase and a lectin, respectively (Barral *et al.*, 2005; Huecas *et*

al., 2001). This domain was recently classified as CBM43 in the CAZy carbohydrate binding modules (CBMs) database. It has recently been described that the ScGas2p Pfam X8 domain contains 8 Cys residues which form four disulfide bridges, allowing this domain to fold in a similar way to that of plant proteins (Popolo *et al.*, 2008). Additionally, this domain is required for a stable protein conformation.

The simplest explanation for the absence of a GPI attachment signal is the *gas2⁺* gene is not correctly annotated in the database and it actually contains a hydrophobic C-terminal region. Two different approaches ruled out this possibility: sequencing of the genomic *locus* from a wild-type strain and visualization of the fusion protein *gas2p*-GFP. The first experiment revealed that the database annotation was correct. Therefore, if *gas2p* were a functional protein with β -1,3-glucanase activity, it would be a peculiar GH72 family member lacking the GPI anchor. The second approach indicated that a *gas2*-GFP⁺ fusion was able to induce the expression of a protein which localized at the cell periphery, the expected location for a protein involved in cell wall remodelling. The addition of an epitope at the C-terminal end of GPI-proteins usually interferes with their processing in the Golgi apparatus, preventing them from reaching their final destination and, in most of cases, fluorescence remains confined in intracellular vesicles, such as for *adg2p* (Alonso-Núñez *et al.*, 2005). Therefore, *gas2p*-GFP localization at the periphery suggests the absence of a GPI-anchoring signal. An additional observation confirming these data is that *r-gas2p* expressed in *P. pastoris* (similar to native *gas2p*, except for the last 9 amino-acids) results in its liberation to the culture supernatants, instead of remaining attached to the plasma membrane or cell wall. However, we cannot confirm that this observation is extrapolable to fission yeast, due to differences in cell wall composition between both yeast species, which may interfere with this protein retention.

Last, but not least, an additional observation that confirms that *gas2p* sequence is correct is the presence of ortholog proteins in the genome

of other *Schizosaccharomyces* species, which have been recently sequenced: *S. japonicus* and *S. octosporus* (Broad Institute; <http://www.broad.mit.edu>). These yeasts also contain four genes belonging to the GH72 family with high identity to *S. pombe* proteins (Fig 76A). Multiple sequence alignment and analysis of their modular structure suggest that proteins encoded by *SJAG_01835* and *SOC_c188* are the *gas2p* orthologs in *S. japonicus* and *S. octosporus*, respectively (Fig. 76B). Comparison of these three proteins to ScGas2p shows that they share high sequence identity through all the protein, although the *Schizosaccharomyces* proteins are shorter than ScGas2p, lacking part of the Pfam X8 domain and the end of the protein (Fig. 76C). Thus, none of them contain the hydrophobic region required for GPI addition at their C-terminal ends (according to GPI-SOM). What is more, only 6 out of 8 Cys residues present in the Pfam X8 domain are conserved. It has recently been reported that ScGas2p has 7 disulfide bridges clustered into two subgroups, the first one in the GluTD (3 bonds) and the second one in the Cys-box (4 bridges) (Fig. 77A) (Popolo

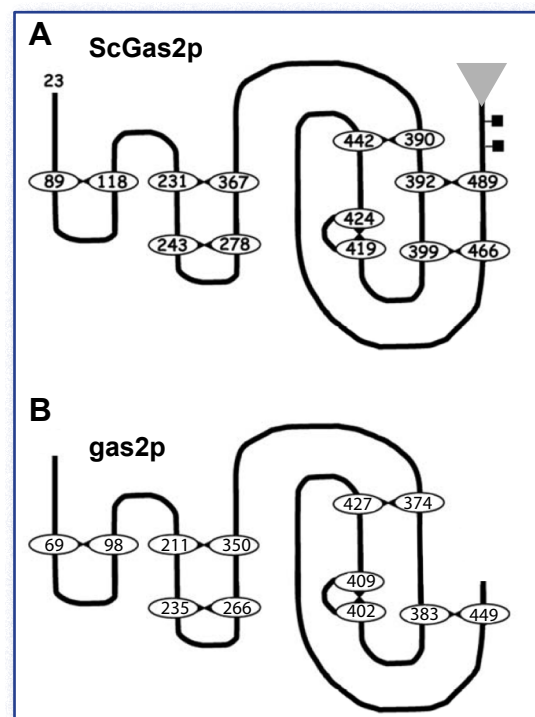


Figure 77. Schematic representation of ScGas2p and gas2p. (A) Schematic display of the disulfide bonds of ScGas2p experimentally determined (Popolo *et al.*, 2008). Cys residues are shown as numbered ovals, black boxes indicate putative N-glycosylated residues and the grey triangle, the GPI-anchoring. (B) Putative structure of *gas2p*.

et al., 2008). It is worth to notice that the two Cys residues not conserved in *Schizosaccharomyces* proteins form one of the disulfide bridges in the Pfam X8 domain, so it could be assumed that *Schizosaccharomyces* gas2 proteins might have a general structure similar to ScGas2p, differing basically in their C-terminal ends (Fig. 77B).

All these observations indicate that gas2p is a peculiar β -1,3-glucanoyl-transferase, differing from the other GH72 family members present in other species because of its structure (lack of the GPI anchor and a short Pfam X8 domain) and for its catalytic activity (as it will be discussed later). Additionally, gas2p is conserved in the three *Schizosaccharomyces* species, suggesting it could perform a specific role in cell wall construction in the *Shizosaccharomycetaceae* family.

(XIV)- 3. gas proteins are β -1,3-glucanoyl-transferases

When *S. pombe* gas proteins were purified and their catalytic activity was assayed *in vitro*, they displayed the same β -1,3-glucanoyl-transferase activity reported for other GH72 members (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000a; Ragni *et al.*, 2007b). That is, they catalyze the transfer of an oligosaccharide (4-11 glucose units) from the non-reducing end of a β -1,3-glucan donor molecule to the non-reducing end of an acceptor glucan molecule. The analysis of the resulting products showed that the newly generated bonds were also β -1,3, indicating these enzymes are not responsible for the introduction of branching points in linear β -1,3-glucan molecules. The chromatograms also indicated that the number of reducing and non-reducing ends remained constant. Therefore, Spgasp are able to elongate pre-existing glucan chains, but do not generate new non-reducing ends (similar to other GH72 family members whose catalytic activity had already been studied).

The analysis of the reaction products indicated that, despite the fact that all of them are β -1,3-glucanoyl-transferases, there are differences in the length of the oligosaccharide transferred from

one glucan molecule to another. For example, r-gas1p and r-gas4p display the same catalytic activity, being the main products G_{7r} , G_{8r} , G_{18r} and G_{19r} (that is, they transfer β -1,3-hexasaccharides), while r-gas5p preferentially catalyzes the transfer of molecules of 4 glucose units. It is interesting to note that the same variation in length of the transferred oligosaccharide has been described for ScGasp (Ragni *et al.*, 2007b). ScGas1p and ScGas2p display the same glucanoyl-transferase activity than r-gas1p and r-gas4p, and ScGas5p is similar to r-gas5p (Table 5). Additionally, other members of this family, such as AfGel1p, AfGel2p, CaPhr1p and CaPhr2p display similar activity to ScGas1p, being their main reaction products G_{6r} , G_{7r} , G_{8r} , G_{18r} , G_{19r} and G_{20r} when they are incubated with G_{13r} (Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae*, it has been postulated that the differences in activity of each protein might be due the presence/absence of the Cys-rich region, since ScGas1p and ScGas2p share the same activity, but differ from other proteins (Ragni *et al.*, 2007b). However, the fact that gas4p, which lacks the Cys-box, shows a similar activity to gas1p, ScGas1p and ScGas2p (which contain the Cys-rich region) indicates that there is not a correlation between this two facts and that proteins belonging to either GH72⁺ or GH72-subfamilies may catalyze the same transfer reaction.

For gas2p, the results were also exceptional. Although it has been suggested that it is a non-functional protein (Ragni *et al.*, 2007b), this work has proved that r-gas2p also has β -1,3-glucanoyl-transferase activity. However, this protein showed affinity for longer substrates than other members of this family when assayed *in vitro*, and transferred a oligosaccharide of 11 glucose units between two β -1,3-glucan molecules. This catalytic activity has not previously been reported for any other GH72 protein, indicating that the peculiar structural characteristics of this protein might allow a unique mode of interaction with its substrates.

Sequence alignment of GH72 proteins has previously shown that two glutamic acid residues (indicated by asterisks) are perfectly conserved in the sequences (A/S)GNE*(V/I) and SE*(Y/F)GC (Carotti *et al.*, 2004; Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*,

Table 5. Comparison of the catalytic activity of *S. cerevisiae* and *S. pombe* GH72 proteins.

<i>S. cerevisiae</i>	Cys-box	Transferred oligosaccharide	<i>S. pombe</i>	Cys-box	Transferred oligosaccharide
ScGas1p	YES	G6	gas1p	YES	G6
ScGas2p	YES	G6	gas2p	YES	G11
ScGas3p	YES	Not determined	-	-	-
ScGas4p	NO	G6/G7	gas4p	NO	G6
ScGas5p	NO	G4	gas5p	NO	G4

2000b; Papaleo *et al.*, 2006). Those amino acids, constituting the catalytic pair, are 100 residues apart and they are situated at the end of β -sheets 4 and 7 in the *TIM barrel* structure predicted for the GluTD region (Gaboriaud *et al.*, 1987; Papaleo *et al.*, 2006). These glutamic acids are also present in *S. pombe* GH72 proteins and occupy similar positions to that reported for other members of the family. Mutation of the two conserved glutamic residues in gas4p (gas4p-E157Q and gas4p-E257Q forms) generated two proteins devoid of biological activity (de Medina-Redondo *et al.*, 2008). The glutamine residues used to substitute the glutamic acids possess similar characteristics, so the three-dimensional structure of mutant forms should be similar to the native gas4p. Despite the fact that we have not checked the catalytic activity of the mutant forms, other authors have shown that the replacement of E160 and E261 with Leu and Phe, respectively, eliminates the *in vitro* catalytic activity of AfGel1p, and replacement of E161 and E262 by two glutamine residues totally abolishes the *in vitro* catalytic activity of ScGas1p (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000b). Therefore, it is very likely that the mutant forms gas4p-E157Q and gas4p-E257Q are devoid of β -1,3-glucan transferase activity. Taken everything into account, we can hypothesize that gas4p has not a structural role for other cell wall polymers, but that its enzymatic activity is essential for ascospore maturation in *S. pombe*. Moreover, it is likely that the E157-E258, E156-E263 and E159-E261 residues (from gas1p, gas2p and gas5p, respectively) are also the responsible for the catalytic activity of these proteins.

(XIV)- 4. gas proteins localize to active growth sites

As stated above, *S. pombe* gas⁺ genes differed in their expression pattern through the life cycle. These differences in gene expression suggest that the encoded proteins might have similar functions (transfer of oligosaccharide between β -1,3-glucan chains), but in distinct localizations and/or moments of the fission yeast life cycle. To test whether the gas proteins had different localization, they were fused to YFP or GFP for *in vivo* examination. As the C-terminal hydrophobic region is essential for proper localization of GPI proteins and also proteolytically cleaved during protein processing (Pittet and Conzelmann, 2007), the YFP coding sequence was inserted in the N-terminal region, between the signal sequence and the GluTD, so that it would not interfere with protein localization and function. As for gas2p, lacking the GPI-anchoring signal, the GFP coding sequence was fused at the C-terminus.

The results showed that *S. pombe* GH72 proteins localize to the cell periphery, although there are some differences depending on the exact moment of the cell cycle at which each gene is expressed. For example, gas1p and gas2p localize to the periphery of vegetative cells, preferentially to active growth regions (poles and septum), whereas gas4p is found at the ascospores envelope. From the three proteins produced during mitotic growth, we were only able to visualize YFP-gas1p and gas2p-GFP. Despite the fact that their mRNA levels peak at different moments of the cell cycle, both proteins show the same localization pattern, that

is, at the poles and septum where active growth is taking place, although a fainter fluorescent signal was present all around the cell. As for gas4p, the fusion protein localized to the ascospore periphery and the fluorescent signal could not be detected in vegetative cells. gas4p was also not detected during vegetative growth by Western-blot using anti-gas4p antibodies. Thus, the three proteins localize to active growing sites in the vegetative cell wall (gas1p and gas2p) or ascospore wall (gas4p), accordingly to a role in the biosynthesis and remodelling of this structure.

The gas1p, gas4p and gas5p proteins contain a GPI-anchor signal at the carboxylic end, but they lack the dibasic motif required for retention of GPI-proteins at the plasma membrane (Caro *et al.*, 1997; Frieman and Cormack, 2003). Indeed, a recent work has identified gas1p and gas5p covalently associated cell wall proteins, using mass spectrometry (de Groot *et al.*, 2007). These authors were unable to detect gas4p in cell wall of vegetative cells, according to our results indicating that *gas4⁺* is expressed during sporulation and the protein accumulates at the last stages of sporogenesis (Fig. 29C and Fig. 48B). gas2p was not detected as a GPI-cell wall protein (GPI-CWP) or as an alkali-sensitive-linkage cell wall protein (ASL-CWP). These results indicate that gas2p is present in small amounts in the cell wall (in spite that the expression level is similar to *gas1⁺*) or, alternatively, that it is not associated to the cell wall by this type of linkages, according to our observations. It is interesting to note that there are other CWP not covalently linked to the cell wall that were not identified in the same analysis, such as eng1p or agn1p. Taking everything into account, these observations indicate that gas1p and gas5p could be directed to the cell wall, where they would be attached to the β -1,6-glucan through the GPI moiety and localizing preferentially to growth active sites, and that gas4p could have a equivalent fate in ascospore wall.

In contrast, gas2p lacks a characteristic sequence for GPI-anchor signal, although *a priori* we could not rule out that gas2p contains a non-canonical signal for this processing. However, the fact that gas2p-GFP localizes to the cell periphery

similarly to gas1p suggest that this protein is also directed to the cell wall and that it really lacks the GPI moiety. At this point, a question might arise: how gas2p has a similar fate to gas1p even though it lacks the hydrophobic region for GPI addition? One possible answer is that gas2p might be a transmembrane protein, but its hydrophobic profile does not show any possible transmembrane regions. Another explanation is that gas2p is an ASL-CWP. However, it was not detected as ASL-CWP in de Groot and co-workers' report (de Groot *et al.*, 2007). A final possibility is that gas2p might be able to interact with cell wall polymers through the Pfam X8 domain. In order to test whether this domain is required for interaction with cell wall polysaccharides, carbohydrate binding assays were performed using the purified r-gas2p. However, we were unable to detect any interaction with soluble β -1,3-glucan (laminarin) by gel retardation assays or with insoluble polysaccharides from the *S. pombe* cell wall by precipitation assays (data not shown), similarly to what has been recently described for ScGas1p (Popolo *et al.*, 2008). Therefore, all these results suggest that gas2p is a β -1,3-glucanoyl-transferase that exerts its function at the cell wall without being covalently bound to it.

We were unable to observe the localization of gas5p-YFP, even though two different constructs were used. In *S. pombe* GH72 proteins, the cleavage point for the signal sequence is close to the first block of conserved amino-acids of the GluTD (only 6-10 residues apart). In the first construct (YFP-gas5p), the fluorescent protein might prevent proper protein folding and/or the correct processing of the signal peptide. So, the YFP sequence was cloned in a low-complexity non-globular region of the protein, according to the predictions of *Globplot* (<http://globplot.embl.de/>), to avoid interference with protein folding and processing. However, this alternative construction did not allow the observation of gas5p localization either. In this second construct, the YFP coding sequence was inserted in the Ser-rich region, which might be O-glycosylated. It has been postulated that O-glycosylation may act as a checkpoint of proper folding for secreted proteins (Fernandez *et al.*, 1996; Gemmill and Trimble, 2004). Therefore,

the YFP insertion in this region might result in an abnormal glycosylation pattern, a signal indicating protein mis-folding, which would prompt the cell to degrade it immediately. Despite of our inability of determine the exact localization of *gas5p in vivo*, this protein has also been identified as a GPI-CWP (de Groot *et al.*, 2007), although it is not known whether its localization is restricted to particular zones of the cell wall.

The functionality of the fusion proteins was also assayed. Whereas YFP-*gas1p* was able to revert the phenotypic defects of *gas1Δ* cells, the YFP-*gas4p* was non-functional, as *gas4Δ* asci harbouring this construct did not display the characteristic refractility of wild-type spores, being more similar to mutant ascospores. *gas4Δ* mutant spores harbouring YFP-*gas4p* were unable to germinate. Both observations might invalidate the data obtained for *gas4p* localization. However, as the localization of the fusion protein corresponds to the expected for a protein acting on ascospore wall synthesis, the inability to complement the ascospore maturation defect cannot be attributed to a localization defect of the fusion protein. In *gas4p*, the separation between the signal peptide and the GluTD was also small, as occurred for *gas5p*. What is more, immediately behind the signal sequence cleavage point there is a block of highly conserved amino acids in all GH72 family members. These sequences might be important for proper folding of the polypeptide chain, so the insertion of the YFP in this point would interfere protein folding, moving further away the catalytic residues (McCarter and Withers, 1994). Alternatively, the YFP sequence might be obstructing or blocking protein-substrate interaction, abolishing the enzymatic activity of the fusion protein. In both cases, as *gas4p*-YFP possessed the signal peptide and the hydrophobic region for GPI attachment, the fusion protein might be reaching its correct destination, but lacking catalytic and biological activity.

(XIV)- 5. The GPI moiety is required for the biological function

A question arising after determining the localization of *S. pombe* *gas* proteins, and moreover after proving that *gas2p* lacks a GPI-moiety, concern the biological role of the GPI anchor for *gas1p*, *gas4p* and *gas5p*. As indicated in Chapter VI, soluble recombinant forms were purified to analyze their catalytic activity. The *gas4p* and *gas5p* were expressed as soluble forms, lacking the GPI moiety. Even though they were truncated proteins, all of them displayed enzymatic activity *in vitro*. It has been described that *AfGel1p-ΔGPI* also displays the same activity as the native protein (Mouyna *et al.*, 2000a). Additionally, *r-gas2p* is also active in *in vitro* assays, although it lacks the GPI anchor. Therefore, we conclude that GPI attachment to the cell wall is not required for the enzymatic activity of GH72 family members.

In contrast, the GPI-anchoring to the cell periphery is required for proper localization and biological functionality. As it has been reviewed by Drs. Laura Popolo and Marina Vai (1999), *ScGas1p* does not need the GPI anchor for the catalytic activity, but the truncated form *ScGas1p-ΔGPI* does not correctly interact with its substrates at the cell wall and that it is abnormally secreted to the culture medium, where it accumulates. Additionally, the secreted (truncated) forms are unable to rescue the *gas1Δ* mutant phenotype, indicating that localization at the cell surface is indispensable for its biological function. Similarly, truncation of the hydrophobic C-terminal region of *gas4p* results in localization defects, and the protein is not retained at the ascospore surface. Additionally, this localization defect also results in inability to complement the *gas4Δ* mutant defect, suggesting that the catalytic activity must be properly localized to specific regions of the ascospore wall to accomplish its biological function (de Medina-Redondo *et al.*, 2008). Similar assays to assess the importance of the GPI moiety for *gas1p* and *gas5p* were not performed, but it can be inferred that the GPI anchor is also required for proper localization and function of both proteins.

(XIV)- 6. GH72 proteins participate in synthesis or remodelling of the cell wall

Due to the complexity of the fungal cell wall, its biosynthesis is a process involving several steps and different enzymatic activities. Although the manner in which this structure is assembled is not well understood, it has been postulated that several steps, summarized in Figure 78, should be necessary (Mouyna *et al.*, 2000a). After synthesis of linear β -1,3-glucan chains by the β -1,3-glucan-synthase (β GS) complex, the nascent chains should be linked to the rest of the cell wall components. First, a glucose should be attached through a β -1,6 linkage to some monomers of the nascent chains β -1,3-chains. Then, this side glucoses should be elongated by addition of β -1,3-oligosaccharides in order to generate the β -1,6-branched- β -1,3-glucan. Finally, other components of the cell wall (β -1,6-glucan, chitin, CWP) should be attached to the non-reducing ends of the β -1,3-glucan (either main chain or side chains). This model would also be applicable to the ascospore wall biosynthesis, at least for the inner layers, whose composition is similar to the vegetative cell wall (Egel, 2004).

In *S. pombe*, *bgs1⁺*, *bgs3⁺* and *bgs4⁺* have been reported to be three putative catalytic subunits of the β GS complex, involved in the synthesis of β 1,3-glucan during vegetative growth and cytokinesis. *bgs2⁺* codes for the fourth protein of this family in

fission yeast, responsible of the synthesis β -1,3-glucan in the ascospore (Cortés *et al.*, 2002; Cortés, 2005; Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2000; Martín, 2002; Martín *et al.*, 2003). To date, despite several efforts, the branching enzyme responsible of the ramification of the linear β -1,3-glucan chains has not been identified. However, it has been postulated that the *AfGel1p* β -1,3-glucanosyl-transferase activity may be responsible of side chains elongation, resulting in branched β -1,3-glucans (Mouyna *et al.*, 2000a). It has also been suggested that *C. albicans* Phr proteins may process β -1,3-glucans in order to generate new acceptor sites available for the attachment of β -1,6-glucanos (Fonzi, 1999). In fission yeast there are other glycosyl hydrolases which might be involved in cell wall polymer remodelling, although their function still remains unknown. For example, three genes displaying homology to *ScEXG1* and coding for proteins belonging to the GH5 family have been identified in our laboratory (SPBC1105, SPAC12B10.11 and SPBC2D10.05, termed *exg1⁺*, *exg2⁺* and *exg3⁺*, respectively). In contrast to their *S. cerevisiae* homologs, *exg1p* and *exg3p* display β -1,6-glucanase activity and *exg1p* shows an endo-hydrolytic mode of action (E. Dueñas, personal communication).

A reasonable hypothesis for the biological function of *S. pombe* GH72 proteins is that they would also be involved in the elongation of β -1,3-

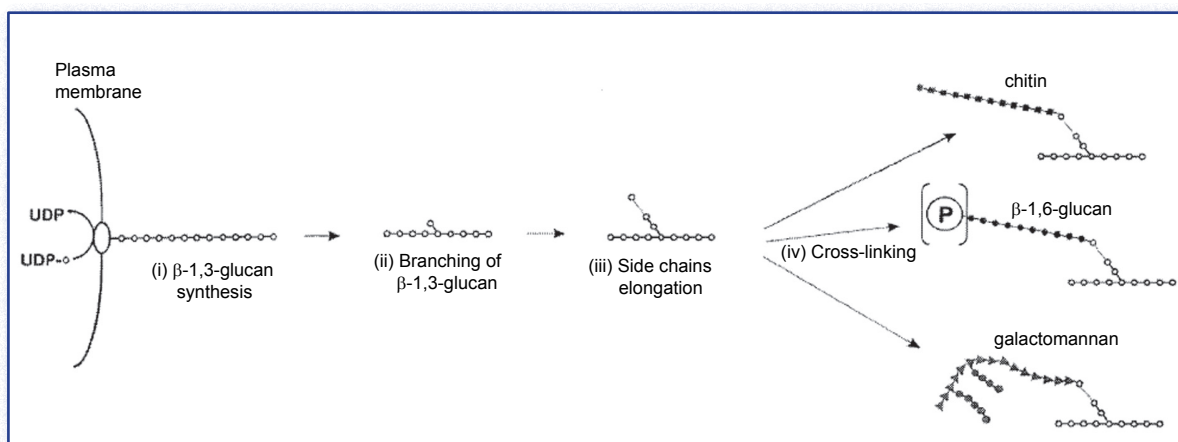


Figure 78. Hypothetical steps for the synthesis of the β -1,3-glucan and its remodelling. (i) Biosynthesis of linear β -1,3-glucan chains; (ii) branching through the introduction of β -1,6 linkages; (iii) side chain elongation; and (iv) establishment of cross-links to other cell wall polymers (chitin and galactomannan in *A. fumigatus*; chitin, β -1,6-glucan and proteins in *S. cerevisiae*) on the non-reducing ends of the β -1,3-glucan side chains. P stands for proteins (adapted from Mouyna *et al.*, 2000a).

glucan side chains, without generating new non-reducing ends. The presence of short β -1,3-glucan side chains will result in less flexibility, preventing their cross-linking with other polysaccharides or CWPs. The experimental data obtained in this work indicates that at least two of the *S. pombe* GH72 proteins are required for cell wall maturation, either during vegetative growth or the sporulation process.

First, *gas1* Δ mutant cells were unable to maintain the typical rod-shape of *S. pombe* cells. Additionally, in the absence of osmotic support, the majority of mutant cells lysed during septum dissolution, although in some cases lysis took place in isolated cells. The first observation prompted us to hypothesize that a softened or improperly assembled cell wall would be more sensitive to the glucanases involved in cell separation (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Dekker *et al.*, 2004; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003), so that lysis occurred mainly during septum dissolution. However, *eng1p* deletion did not complement the lytic phenotype of *gas1* Δ mutants. On the other hand, homozygous diploid *gas4* Δ mutant cells are unable to generate refractile spores after incubation in sporulation medium, although they complete the meiotic divisions properly.

Second, analysis of the ultrastructure of the *gas1* Δ cell wall and *gas4* Δ spore wall showed that β -1,3-glucanoyl-transferase activity is essential for proper cell wall synthesis in both cases. During vegetative growth, the lack of *gas1p* originates severe defects, such as an amorphous glucan layer and discontinuous galactomanan layer. Cell walls of *gas2* Δ , *gas5* Δ and *gas2* Δ *gas5* Δ mutant cells did not show significant differences when compared to the wild-type strain, which suggest that these protein contribution to the cell wall assembly is minor or that they exert a redundant function with *gas1p*. Electron microscopic examination of the asci of mutant strains revealed the formation of four compartments inside each ascus, although the outer, electron-opaque layer was thinner and less defined than in wild-type spores. The appearance of the mutant spores was always very similar, indicating that they had been arrested at the same stage of spore wall maturation.

Third, cell wall fractionation experiments in vegetative cells or spores indicated that there were some variations of the relative amounts of the different cell wall polysaccharides in *gas1* Δ and *gas4* Δ mutants. In the vegetative cell wall of *gas1* Δ mutants, there was an increase in the radioactivity incorporated in the cell wall in relation to the total incorporation. In addition, there was a reduction in the β -1,3-glucan fraction that was compensated by an increase in the α -glucan plus mannan content. Similarly, in the spore wall of *gas4* Δ mutants, a slight reduction in β -1,3-glucan was detected, accompanied by an increase in the α -glucan plus mannan fraction (de Medina-Redondo *et al.*, 2008, and this work). No significant differences were observed when the cell wall composition of *gas2* Δ , *gas5* Δ or *gas2* Δ *gas5* Δ was analyzed, suggesting that these enzymes might perform a minor role in cell wall synthesis. Biochemical studies of the cell wall composition in a *Scgas1* Δ strain had previously shown that although the total β -1,3-glucan content is similar to that of the wild-type strain, there are some changes in its distribution between the alkali-soluble and alkali-insoluble fractions and also an increase of chitin occurs, which suggests that there are differences in the cross-linking of the different cell wall polymers (Popolo *et al.*, 1997; Valdivieso *et al.*, 2000). Alkali/acid extraction (Kapteyn *et al.*, 1997) is rather harsh for *S. pombe* cell wall analysis due to the absence of chitin, responsible for the alkali-insoluble fraction of the β -1,3-glucan (Pérez and Ribas, 2004). Therefore, it is possible that in fission yeast the absence of *gas1p* also results in a defect in the degree of branching or in the length of the lateral chains, and that the increase in α -glucan observed is a response to a weakened cell wall, similar to the increase in chitin reported for *S. cerevisiae*, to avoid cell lysis.

Finally, lysis of *gas1* Δ cells during cell separation occurs even with osmotic support, and the fact of *gas4* Δ mutant spores are unable to generate viable descendants even in the presence of sorbitol, suggest that proper cell wall maturation is required for maintenance of cell viability in both stages of *S. pombe* life cycle. This idea relies on the fact that *gas1* Δ cells and *gas4* Δ spores are stained with methylene blue, indicating that the

absence of these proteins results in the inability to maintain cell integrity. Interestingly, a phenotype similar to the fission yeast *gas4Δ* mutant has been described in the budding yeast *gas2 gas4* strain. ScGas2p and ScGas4p are two β -1,3-glucanoyl-transferases specific for sporogenesis and involved in ascospore wall maturation (Ragni *et al.*, 2007a). *gas2Δ* or *gas4Δ* simple mutants have no phenotype, but the double mutant *gas2Δ gas4Δ* produces spores with severely reduced viability, suggesting that ScGas2p and ScGas4p have redundant roles in the ascospore wall assembly. In fission yeast there is not such a redundancy, since this function is exerted by a single protein, gas4p. However, *S. cerevisiae* and *S. pombe* proteins are true functional homologs, as gas4p is able to complement the sporulation defects of the *gas2Δ gas4Δ* strain.

Another interesting observation is that *gas1Δ* and *gas4Δ* mutant phenotypes are similar to those described for *bgs4Δ* and *bgs2Δ* mutant cells, respectively. These genes code for the putative catalytic subunits of the β GS complex responsible of the synthesis of the secondary septum and ascospore wall, respectively (Cortés, 2005; Cortés *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2000). These data indicate that not only the synthesis of linear β -1,3-glucan chains bgs2p and bgs4p-dependent, but also their maturation by gas proteins (through the cross-link to other cell wall components) is required for the proper cell/ascospore wall assembly and maintenance of cell and ascospore viability.

(XIV)- 7. From a common structure to different functions in vivo

As it has been reported in this work, *S. pombe* GH72 proteins share a similar modular structure, but possess different biological significance. These differences can be achieved through differential expression of proteins with identical enzymatic activity, slightly variations in the catalytic mechanism and/or differences in protein localization.

The two proteins whose absence generates the most severe phenotype (*gas1p* and *gas4p*) catalyze the same enzymatic reaction (transfer of

hexa/heptasaccharides between glucan chains). Therefore, this suggests that the transference of medium length oligosaccharides is essential for cell wall integrity. However, both functions are not redundant, as *gas1p* and *gas4p* are synthesized in different moments of the life cycle. Additionally, *gas1p* and *gas4p* differ in the structure, since *gas1p* contains a Pfam X8 domain followed by a Ser-rich region whereas both domains are absent in *gas4p* (just a short Ser-rich region can be found in the latter enzyme). These regions are usually O-glycosylated, and the protein adopts a linear conformation, separating the end attached to the plasma membrane or cell wall from the catalytic domain (Stratford, 1994). Therefore, it can be speculated that the difference in the length of the Ser-rich region might result in different relative positions of their catalytic domains within the cell wall, *gas4p* being closer to the plasma membrane. Indeed, an important fact is that the ascospore wall is assembled *de novo* inside the forespore membrane, while vegetative growth implies the extension of the pre-existing cell wall, so the β -1,3-glucanoyl-transferase activity would be required in different spatial positions. Since these proteins catalyze the same reaction *in vitro*, an interesting question is whether they are able to complement the absence of each other. An affirmative answer would imply that the Pfam X8 domain and the Ser-rich region are not essential for the biological function of *gas1p*. At present, we are performing some experiments which should shed light into this question.

An example of homolog proteins expressed at the same moment during vegetative growth and presumably localizing to the same cellular structures are *gas1p* and *gas5p*. However, both proteins transfer oligosaccharides different in length (only 4 monomers for *gas5p*). This fact may result in subtle differences in the length of the β -1,3-glucan side chains. Additionally, it seems that *gas5p* acts more slowly than *gas1p* (data not shown). Both observations may explain why *gas5p* is unable to complement the *gas1Δ* mutant defects, although they are simultaneously expressed.

Expression of *gas2⁺* occurs in a different moment of the mitotic cycle and the catalytic

activity is different in comparison with gas1p, although both proteins localize to similar regions in the cell wall. It has not previously been reported that a GH72 family member preferentially uses long glucan chains (19 monomers) as substrates and transfers oligosaccharides of 11 units of glucose. This observation, together with the lack of the GPI moiety, makes gas2p a peculiar member of the GH72 family, although its absence causes no phenotype.

(XVIII)- CONCLUSIONS

(XVIII)- CONCLUSIONS

1) *Schizosaccharomyces pombe* genome contains four open reading frames (ORFs SPAC19B1202c, SPBC29A10.08, SPBC342.03 y SPAC11E3.13c) coding for proteins homologues to the members of the glycosyl-hidrolase family 72 (GH72). These ORFs have been named *gas1⁺*, *gas2⁺*, *gas4⁺* and *gas5⁺*, respectively. Their expression periodically oscillates along the cell cycle and/or sporulation. The *gas1⁺*, *gas2⁺* and *gas5⁺* products exert their biological function during vegetative growth, whereas the protein encoded by *gas4⁺* is involved in the final steps of the sporulation process.

2) The four gasp proteins display **β -1,3-glucanosyl-transferase activity *in vitro***, showing a similar catalytic mechanism to other members of the family GH72, with an active site which recognizes that binds a molecule of at least nine residues of β -1,3-glucose. However, the split point is different for each of these proteins.

3) Using bioinformatics tools, we have identified two short sequences –FF(A/S)GNE*V and F(F/L)SE*(Y/F)GCN- contained in the GluTD region and two glutamic acids are considered to be the two acidic residues of the active site (asterisks). We have demonstrated that those amino acids are essential for the *gas4p* biological function *in vivo*. Therefore, these glutamates could also be important for the catalytic activity of the other three gasp proteins.

4) The gasp proteins localize to the cellular periphery: *gas1p* and *gas2p* are located preferentially to the poles and the septum, whereas *gas4p* is distributed along the ascospore wall. *gas5p* is also directed to the cell wall, although we were unable to visualize its exact location. The GPI motif is necessary for the proper location of *gas4p* and, presumably, of *gas1p* and *gas5p*.

5) *gas1⁺* and *gas4⁺* are responsible of the two main **β -1,3-glucanosyl-transferase activity in *S. pombe***. More precisely, *gas4p* is essential after meiosis, acting during spore wall maturation, and it is responsible of their viability. Additionally, *gas1p* biological function is required for cellular integrity during vegetative growth. *gas2p* and *gas5p* seem to be dispensable and they might be involved in minor functions for cell wall assembly.

6) *gas1p* is the only member of the family GH72 essential for the maintenance of the cellular integrity in the biosynthesis or remodelling of the cell wall during cytokinesis and polarized growth. The lysis in the septum region in *gas1 Δ* mutants occurs after the completion of septum assembly and during the first stages of cell separation, which suggests that *gas1p* is essential for the proper biosynthesis of the cell wall in this area.

7) The gasp proteins are involved in the qualitative remodelling of the cell wall, as their presence or absence does not affect significantly the proportion of the different polymers constituting the cell wall. However, its ultrastructure is severely affected when some of these proteins are not present.

(XIX)- APÉNDICE

The β -1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*

(XIX)- APENDICE

Molecular Microbiology (2008) ■

doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06233.x

The β -1,3-glucanoyltransferase *gas4p* is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*

María de Medina-Redondo,¹ Yolanda Arnáiz-Pita,¹
Thierry Fontaine,² Francisco del Rey,¹
Jean Paul Latgé² and Carlos R. Vázquez de Aldana^{1*}

¹Instituto de Microbiología Bioquímica, Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

²Institut Pasteur. Laboratoire des Aspergillus. Paris, France.

Summary

Meiosis is the developmental programme by which sexually reproducing diploid organisms generate haploid gametes. In yeast, meiosis is followed by spore morphogenesis. The formation of the *Schizosaccharomyces pombe* ascospore wall requires the co-ordinated activity of enzymes involved in the biosynthesis and modification of its components, such as glucans. During sporogenesis, the β -1,3-glucan synthase *bgs2p* synthesizes linear β -1,3-glucans, which remain unorganized and alkali-soluble until covalent linkages are set up between β -1,3-glucans and other cell wall components. Several proteins belonging to the glycoside hydrolase family 72 (GH72) with β -1,3-glucanoyltransferase activity have been described in other organisms, such as the *Saccharomyces cerevisiae* *Gas1p* or the *Aspergillus fumigatus* *Gel1p*. Here we describe the characterization of *gas4⁺*, a new gene that encodes a protein of the GH72 family. Deletion of this gene does not lead to any apparent defect during vegetative growth, but homozygous *gas4 Δ* diploids show a sporulation defect. Although meiosis occurs normally, ascospores are unable to mature or to germinate. The expression of *gas4⁺* is strongly induced during sporulation and a yellow fluorescent protein (YFP)-*gas4p* fusion protein localizes to the ascospore periphery during sporulation. We conclude that *gas4p* is required for ascospore maturation in *S. pombe*.

Accepted 24 March, 2008. *For correspondence. E-mail cvazquez@usal.es; Tel. (+34) 923 252092; Fax (+34) 923 224876.

Introduction

The cell wall is a structure outside the plasma membrane that serves as an exoskeleton in yeast and fungi. It is essential for growth and participates in morphogenetic and differentiation processes in these organisms. The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cells have a rod-like shape and grow asymmetrically at the poles. After mitosis, cytokinesis occurs by division via the newly synthesized septum, whose composition is similar to that of the cell wall. *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 programme is triggered and hence an increase in pheromone receptor production occurs, and cells from the opposite mating types conjugate to form zygotes. These immediately undergo meiosis, giving rise to four haploid zygotic ascospores. Zygotes can grow as diploid cells if they are kept in rich medium, but as soon as they run out of nutrients they undergo meiosis, generating azygotic ascospores (Yamamoto *et al.*, 1997).

In *S. pombe*, the cell wall is composed of manno-proteins (9–14%), α -glucan (18–28%) and β -glucan (46–54%) (Bush *et al.*, 1974; Manners and Meyer, 1977; Horisberger and Rouvet-Vauthey, 1985). β -1,3-glucan is a major structural component of the fungal cell wall and forms a fibrillar network. β -1,3-glucans have been shown to be present in the inner portion of the wall surrounding the *S. pombe* cell (Osumi, 1998). However, less is known about the composition and biosynthesis of the cell wall during sporulation. In the past few years, several authors have shed light on this area, describing spore wall components and some proteins involved in spore wall biosynthesis, although the exact architecture remains elusive. It is known that the fission yeast spore wall has electron-lucent and electron-opaque materials. The electron-lucent material represents the inner spore wall and contains β -1,3-glucan, whereas the electron-opaque layer corresponds to the outer spore wall and contains amylose-like material that is responsible for the dark brown colour seen with iodine staining. A recent work has shown that α -glucans are more abundant than β -glucans in the ascospore cell wall (approximately 46% and 38% of the

total polysaccharide content respectively; García *et al.*, 2006). In addition, at least two types of α -glucans are present in *S. pombe* spores: an abundant polymer with α -1,3-glucan linkages, synthesized by the α -glucan synthase subunits mok12p and mok13p, and a minor α -1,4-glucan polymer able to react with iodine, whose synthesis is directed by mok14p. The genes encoding these three proteins are paralogues of the vegetative α -glucan synthase *mok1*⁺ (Hochstenbach *et al.*, 1998), but their expression is restricted to the sporulation process. The three proteins localize to the spore envelope along sporulation and are important for spore viability, although to different extents. Mutation of *mok12*⁺ affects the efficiency of spore formation and spore viability, while the deletion of *mok13*⁺ results in a decrease in the resistance to stress conditions and *mok14* Δ mutant spores fail to accumulate the amylose-like spore wall-specific polymer (García *et al.*, 2006). Additionally, in filamentous fungi and yeast the biosynthesis of β -1,3-glucan is carried out by a β -1,3-glucan synthase complex, whose catalytic subunit is encoded by the *bgs* gene family in *S. pombe* (Ishiguro *et al.*, 1997; Le Goff *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005) and the *FKS* genes in *S. cerevisiae*. *S. pombe* contains four *bgs* genes, but only *bgs2*⁺ is essential for the synthesis of the spore wall (Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000). *bgs2*⁺ expression is induced during sporulation with a pattern similar to the late group of genes, whose products are mainly involved in spore formation (Mata *et al.*, 2002). The β -1,3-glucan synthase *bgs2p* localizes to the spore periphery and is essential for maturation of the ascospore wall. Null *bgs2* diploid mutants form four spore-like compartments inside each ascus, in which the electron-lucent layer is thinner and darker than in the wild-type, and the spores are unviable (Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000). Finally, it has been suggested that chitin, chitosan or other glucosaminoglycans would be minor components of the spore wall and would constitute a matrix synthesized between other polymers, giving support to the spore wall, or that they might be involved in the setting up of linkages with other cell wall polymers (Arellano *et al.*, 2000). The expression of *chs1*⁺, encoding a class II chitin synthase, increases significantly during sporulation, and this is accompanied by an increase in chitin synthase activity. *chs1* Δ mutants do not have any defect during vegetative growth, but do present a defect in the synthesis of the ascospore cell wall, and spore formation is severely affected.

The synthesis of cell wall β -1,3-glucan does not only require the enzymatic activity of the β -1,3-glucan synthase complex, as recently synthesized β -1,3-glucan chains remain unorganized and alkali-soluble until covalent linkages are set up between β -1,3-glucans and other cell wall components (Ram *et al.*, 1995; Mouyna *et al.*,

2000a). β -1,3-glucanosyltransferases from the glycoside hydrolase family 72 (GH72), such as the *Saccharomyces cerevisiae* Gas1p or the *Aspergillus fumigatus* Gel1p, are glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored cell surface proteins that play a role in the elongation of β -1,3-glucan chains. They catalyse a transferase reaction by cleaving a β -1,3-glucan molecule and transferring the newly generated reducing end to the non-reducing end of an acceptor β -1,3-glucan molecule, resulting in its elongation (Mouyna *et al.*, 2000a). Sequence analysis of GH72 proteins has revealed a modular architecture. In particular, ScGas1p has three domains: an amino terminal catalytic domain (GluTD, after **g**lucan **t**ransferase **d**omain), a cysteine-rich region (Cys-box) and a carboxy-terminal serine-rich region (Ser-box) (Popolo and Vai, 1999). Mutations in the *S. cerevisiae* *GAS1* gene result in cells with abnormal morphology and in a reduction in the β -1,3-glucan content of the cell wall, which is compensated by an increase in chitin contents (Kapteyn *et al.*, 1994; Popolo *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998). Recently, it has been described that *S. cerevisiae* *GAS2* and *GAS4* genes are expressed exclusively during sporulation and that both proteins play redundant functions in the maturation of the spore wall. Gas2p and Gas4p reach maximum levels coinciding with spore wall assembly. The *gas2 gas4* double mutant shows a severe reduction in sporulation efficiency, an increased permeability to exogenous substances and the production of unviable spores. Analysis of the spore ultrastructure has indicated that the loss of the Gas2p and Gas4p proteins affects the proper attachment of the glucan to the chitosan layer, probably as a consequence of the lack of coherence in the glucan layer (Ragni *et al.*, 2007a).

At least four genes encoding putative β -1,3-glucanosyltransferases – *gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ and *gas5*⁺ – have been identified in the *S. pombe* sequencing project. In this work, we report the characterization of *gas4p*, which is dispensable for vegetative growth and is not required for cell elongation or division septum assembly. However, following meiosis *gas4*-null mutants fail to properly assemble the spore wall, resulting in the formation of unviable spores. The subcellular localization of *gas4p* supports its role in spore wall assembly.

Results

gas4p belongs to the glycoside hydrolase family 72 (GH72)

A search of the *S. pombe* database (Sanger Centre) for proteins with sequence similarity to the *S. cerevisiae* glucanosyltransferase ScGas1p allowed the identification of four proteins (the products of the SPAC19B12.02c, SPBC29A10.08, SPBC342.03 and SPAC11E3.13C

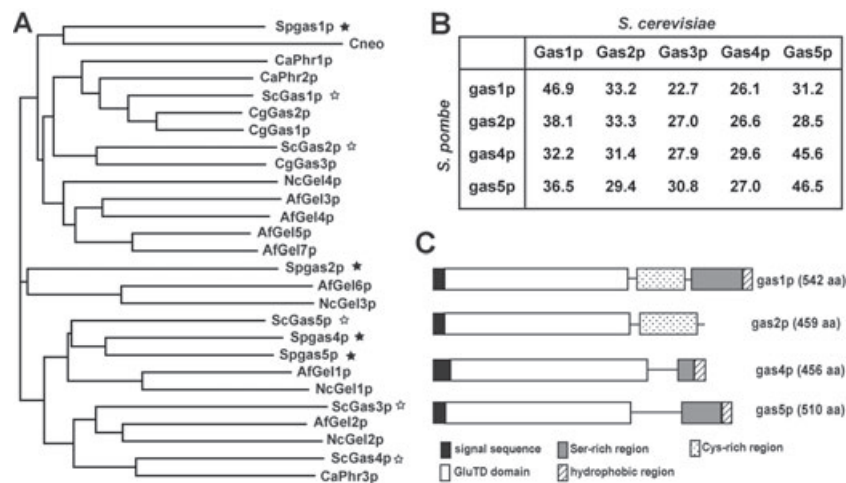


Fig. 1. Characteristics of *S. pombe* GH72 proteins.

A. Dendrogram of the N-terminal region of proteins belonging to the GH72 family obtained with Clustal X. Sequences from *S. pombe* are: Spgas1p (SWISSPORT code Q9P378), Spgas2p (Q9USU5), Spgas4p (Q9Y7Y7), Spgas5p (O13692); *S. cerevisiae*: Gas1p (P22146), Gas2p (Q06135), Gas3p (Q03655), Gas4p (Q08271), Gas5p (Q08193); from *Candida albicans*: CaPhr1p (P43076), CaPhr2p (O13318), CaPhr3p (Q9P8R2); from *C. glabrata*: CgGas1p (Q8X0Z7), CgGas2p (Q8X0Z6), CgGas3p (Q8X0Z5); from *Aspergillus fumigatus*: AfGel1p (O74687), AfGel2p (Q9P8U4), AfGel3p (Q9P8U3), AfGel4p (Q4WHH9), AfGel5p (XP_746993), AfGel6p (XP_754302), AfGel7p (XP_751119); from *Neurospora crassa*: NcGel1p (Q8X0X4), NcGel2p (Q873D1), NcGel3p (Q872H7), NcGel4p (Q8X094), NcGel5p (Q7S962). White asterisks highlight *S. cerevisiae* proteins and black asterisks refer to *S. pombe* proteins.

B. Percentage of identity between GH72 proteins from *S. cerevisiae* and *S. pombe*.

C. Schematic representation of the modular organization of *S. pombe* gas1p, gas2p, gas4p and gas5p.

ORFs). These proteins share common features with ScGas1p, such as the presence of a predicted signal sequence at the N-terminal end followed by the conserved domain present in the glycoside hydrolase family 72 (GH72) proteins, which has been termed GluTD (Mouyna *et al.*, 2000a; Carotti *et al.*, 2004), together with a hydrophobic region at the C-terminus that is predicted to be a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor. GH72 proteins have a modular structure and may contain additional domains between the GluTD and the GPI anchor, such as a Cys-rich region that bears sequence similarity with proteins of the carbohydrate-binding module family 43 (CBM43) or a Ser-rich region. Recently, a phylogenetic analysis of GH72 proteins has shown that they cluster in two subfamilies, GH72⁺ and GH72⁻, that differ in the presence or absence of the Cys-box (Ragni *et al.*, 2007b). As the primary sequence of the N-terminal region is sufficient to discriminate between the two subfamilies, a multiple sequence alignment of the N-terminal region of GH72 fungal proteins was generated using ClustalX (Fig. 1A). Based on this multiple sequence alignment and on the percentage of identity with *S. cerevisiae* proteins (Fig. 1B), as well as on the modular structure of the *S. pombe* proteins (Fig. 1C), the SPAC19B12.02c, SPBC29A10.08, SPBC342.03 and SPAC11E3.13C ORFs were designated *gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ and *gas5*⁺ respectively. In particular, the protein encoded by *gas4*⁺ is predicted to be a GPI-anchored glycoprotein with a calculated molecular weight of 50.7 kDa. It contains a secre-

tory signal peptide (spanning from M1 to P26), a large catalytic domain (GluTD, from I27 to P364), a small serine-rich region (S418-S435) and a signal sequence for GPI attachment at the C-terminal end (Fig. 1C).

gas4p is dispensable during vegetative growth

To investigate whether *gas4p* has any role in cell wall remodelling during the fission yeast cell cycle, mutants lacking the *gas4*⁺ gene were generated by a PCR-based system (Wach, 1996). During vegetative growth, *gas4* Δ mutants were viable at all temperatures and showed no apparent growth defect in either rich medium or minimal medium. The morphology of mutant cells was also analysed during growth at different temperatures by microscopic observation, using aniline blue to stain the β -1,3-glucan of the cell wall (Kippert and Lloyd, 1995); no apparent differences with the wild-type were observed (data not shown). These results therefore indicate that *gas4p* is dispensable for vegetative growth in *S. pombe*.

gas4⁺ expression peaks during the sporulation process

To analyse at which moment of the cell cycle *gas4*⁺ is transcribed, its expression was monitored by Northern blot analysis in a *cdc25-22* mutant that had been synchronized in G2 by arrest at the restrictive temperature and then released at 25°C to collect samples at different times after release. When the level of *gas4*⁺ mRNA was exam-

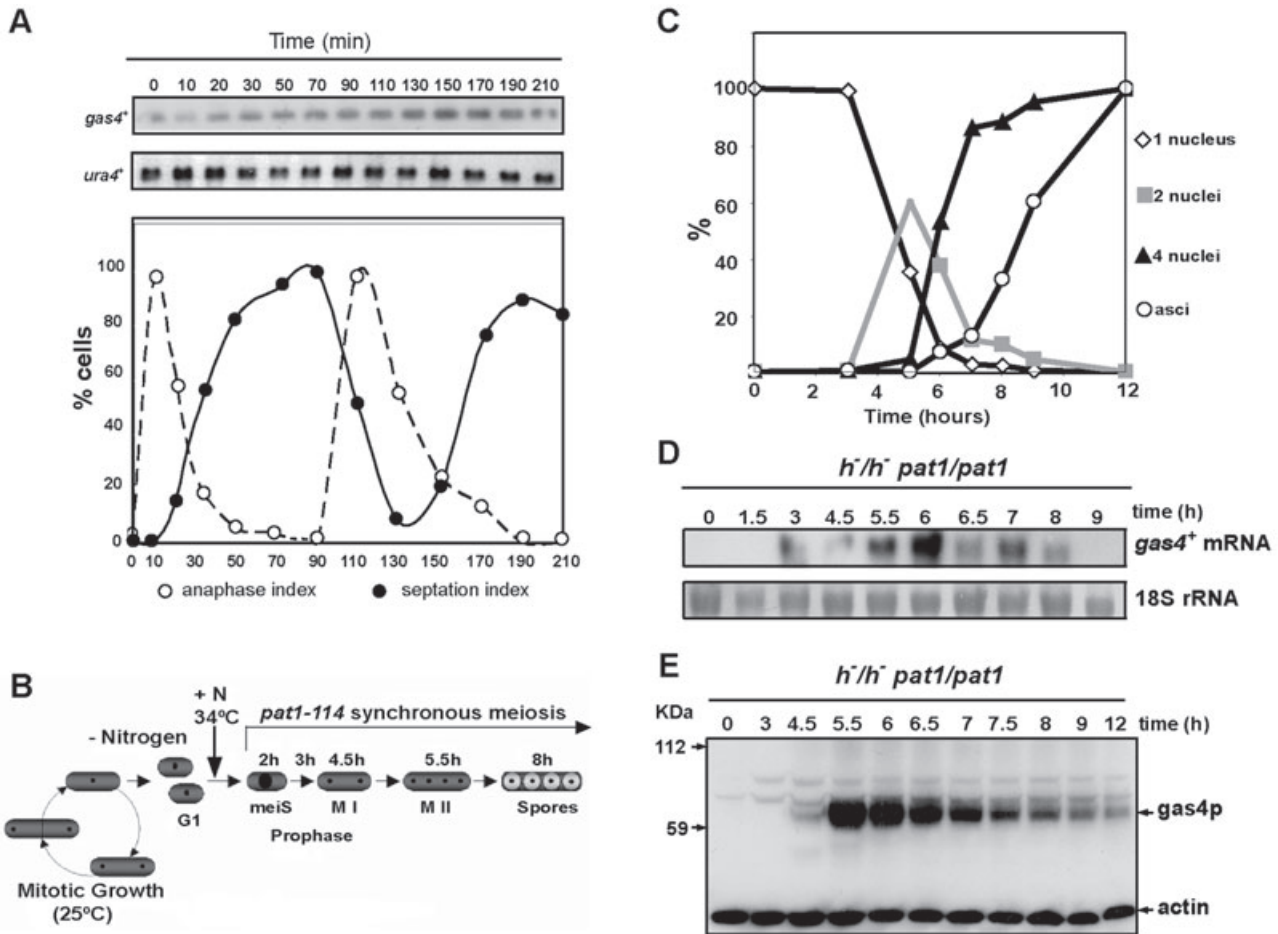


Fig. 2. *gas4+* expression during vegetative growth and in meiosis.

A. Expression of *gas4+* during the cell cycle. Synchrony was induced by arrest-release of a *cdc25-22* mutant and samples were taken at the indicated time points (minutes). RNA was hybridized with a specific probe for *gas4+*. *ura4+* was used as loading control. The graph represents the anaphase index (○) or the septation index (●) at each time point. In this experiment, the peak of septum formation occurred at 70–90 min.

B. Schematic representation of *pat1*-driven synchronous meiosis. Vegetatively growing cells were blocked in G1 by nitrogen starvation over ~14 h and were then induced to enter meiosis by inactivating the *pat1p* kinase at 34°C (time 0 in C, D and E). The approximate timing of the major meiotic landmarks, as determined in (B), is indicated.

C. Synchronous meiosis of strain S964. Meiotic progression was followed by DAPI staining of nuclei, and sporulation was checked with microscopic observation of asci. The percentage of mononucleate, binucleate and tetranucleate cells and spores at each time point are represented.

D. Northern blot analysis of *gas4+* expression during the synchronous meiosis of strain S964 shown in (C). 18S rRNA levels are shown as a loading control.

E. Western blot analysis of *gas4p* during synchronous meiosis of strain S964. Samples were collected at the indicated times after induction of sporulation to prepare protein extracts. Polyclonal anti-*gas4p* antibody was used. Actin was used as a loading control. Meiotic progression was similar to that shown in (C).

ined, we found that the expression level was very low but constant along the cell cycle, with no observable periodic variations (Fig. 2A).

To test the possibility that *gas4+* expression might be induced during the sporulation process, Northern blot was used to monitor its expression in a *pat1*-driven synchronous meiosis. The *pat1p* kinase is required to inhibit meiosis in diploid cells (Beach *et al.*, 1985; McLeod and Beach, 1988). When homozygous *h/h-pat1-114/pat1-114* thermosensitive mutants were starved for nitrogen and

incubated at the restrictive temperature, inactivation of the kinase activity allowed the induction of synchronous meiosis in the cells (Fig. 2B). Samples were collected at different times after transfer to the restrictive temperature and used for Northern blot analysis. Progression through meiosis was monitored by DAPI staining (Fig. 2C). The *gas4+* transcript was present in low amounts at the time when the diploid cells were shifted to the restrictive temperature (time 0), but its expression was strongly induced during meiosis and reached a maximum level during

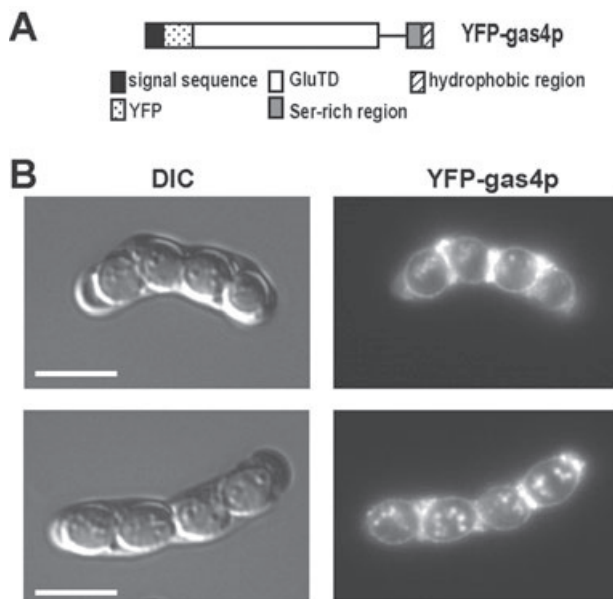


Fig. 3. gas4p localizes to the ascospore wall.

A. Schematic representation of the YFP-gas4p fusion protein present in plasmid pMMR19.

B. Localization of YFP-gas4p in wild-type spores. Wild-type haploid cells of opposite mating types carrying YFP-gas4p on a plasmid were grown to early log phase and then induced to sporulate by transferring them to MEA plates. Plates were incubated at 25°C for 2 days before differential contrast microscopy (DIC) and YFP fluorescence (YFP-gas4p) images were obtained. Scale bars, 10 µm.

meiosis II (6 h), coinciding with the time at which the first mature spores could be detected (Fig. 2D). This induction profile is similar to the meiosis-specific genes classified as the late group, whose products are mainly involved in spore formation (Mata *et al.*, 2002).

gas4p localizes to the ascospore periphery

In order to determine the subcellular location of gas4p during sporulation, we tagged gas4p with the YFP. As the N-terminal signal sequence and the putative C-terminal GPI anchor site could be important for correct localization of the protein, the *gas4*⁺ gene was cloned into a plasmid and the YFP coding sequence was inserted between the putative signal sequence and the GluTD by recombinant PCR (Fig. 3A). The resulting plasmid (pMMR19) was transformed into two wild-type haploid strains of opposite mating types and the transformants were placed under conjugation-sporulation conditions. Microscopic observation of sporulating cells revealed that YFP-gas4p localized to the ascospore periphery: either to the membrane or to the spore wall (Fig. 3B).

To analyse gas4p abundance during the sporulation process, specific anti-gas4p antibodies were raised using purified recombinant gas4p produced in *Pichia pastoris*

(see *Experimental procedures*). Antibodies were specific for gas4p, as no specific band was detected in a *gas4Δ* mutant strain (data not shown). The abundance of gas4p was analysed by Western blot in a meiotic time-course of *pat1-114* diploid cells. The kinetics of gas4p production was similar to that described above for *gas4*⁺ mRNA (Fig. 2E); that is, gas4p was first detected 4.5 h after the cells entered the meiotic programme. No protein was detected at time 0, even with longer exposures. Maximum levels were reached at 5.5–6 h, when diploid cells had already accomplished meiosis II and ascospore development had started. Then, gas4p levels started to decrease gradually, although the protein was still detected 12 h after the induction of meiosis, a moment roughly coinciding with the appearance of mature asci. The experimental molecular weight deduced from the analysis (Fig. 2E) was significantly higher than the estimated molecular weight. This difference could be attributed to the presence of glycosylation, as gas4p contains seven putative sites for N-linked glycosylation (NXS/T) and a Ser-rich region close to the C-terminus that could be O-glycosylated.

gas4p is involved in ascospore maturation in *S. pombe*

The previous observations indicated that *gas4*⁺ is induced during the meiotic programme and that the protein accumulates when the spore wall is being synthesized. In order to elucidate whether *gas4*⁺ plays any role during meiosis, we analysed the meiotic progression of the homozygous diploid *h⁻/h⁻pat1-114/pat1-114 gas4Δ/gasΔ*. To this end, *gas4*⁺ was deleted in haploid *h⁻pat1-114* strains, and we constructed a diploid strain by protoplast fusion of the resulting mutants. The diploid wild-type and null mutant strains were induced to sporulate by nitrogen starvation and temperature inactivation of the *pat1p* kinase. To test whether gas4p was necessary for progression through meiosis, samples collected at different times after induction of sporulation were stained with DAPI and the number of uni-, bi- and tetranucleate cells was counted at each time point. As expected for a putative cell wall-remodelling protein, no significant differences in progression along meiosis were found between the wild-type and the *gas4Δ/gasΔ* mutant, as both strains reached similar levels of tetranucleate cells at the same time after the induction of sporulation (Fig. 4A). To test whether gas4p might play some functional role in the morphogenetic processes that occur after meiosis – either the synthesis or maturation of the spore wall – we analysed the morphology of the spores of strains lacking this gene. *gas4*⁺ was deleted in haploid strains of opposite mating types and the resulting mutants were induced to mate and sporulate. Mutant spores had an irregular morphology and were less refractile than those of the wild-type strain (Fig. 4B), suggesting a defect in spore wall maturation.

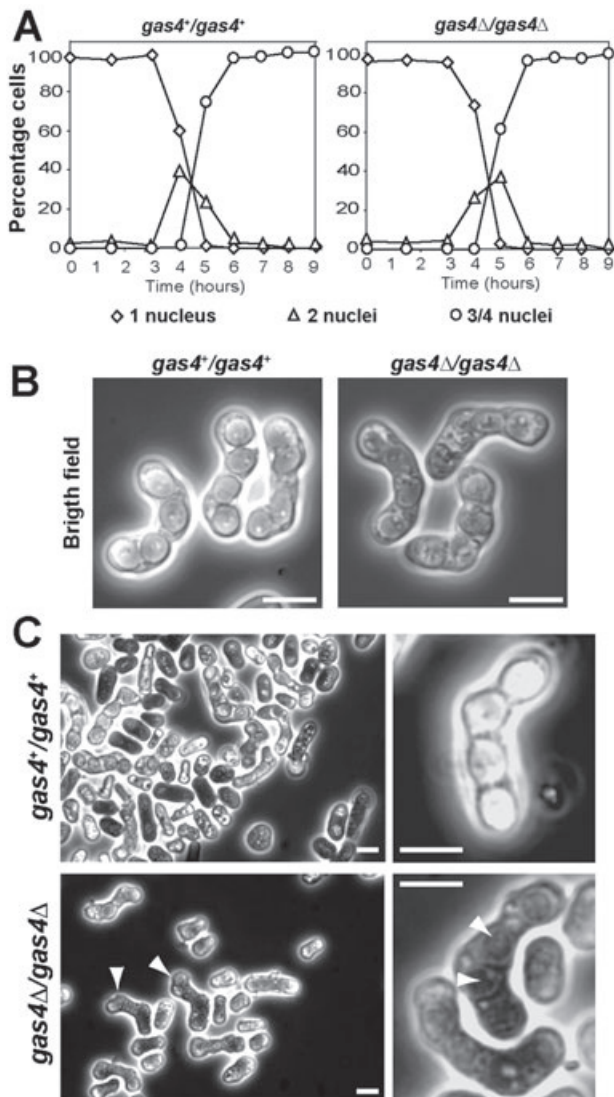


Fig. 4. *gas4p* is necessary for proper maturation of the spores and for generation of viable spores.
A. Meiotic progression of *pat1-114/pat1-114 gas4⁺/gas4⁺* and *pat1-114/pat1-114 gas4^Δ/gas4^Δ* strains. Samples were collected at different times after induction of sporulation and stained with DAPI. The percentage of uninucleate, binucleate and tetranucleate cells at each point is indicated. At least 200 cells were counted for each point.
B. Phase contrast microscopic aspect of wild-type (*gas4⁺/gas4⁺*) and *gas4^Δ* mutant asci.
C. Wild-type and *gas4^Δ* mutant asci were incubated with 0.6% methylene blue for 2 min before phase contrast images were taken. Arrowheads indicate some *gas4^Δ* spores that were stained with this product. Scale bars, 10 μ m.

Therefore, *gas4p* is not required for meiotic progression, but it is necessary for the formation of mature spores.

The morphological defect of *gas4^Δ* spores suggested that they could also be more sensitive to stress conditions, such as glucanase treatment or exposure to heat. To test this possibility, we first analysed the ability of the

mutant spores to germinate and their viability in comparison with the wild-type strain. The haploid *gas4^Δ* null mutants were crossed on YPD agar plates and incubated at 25°C for 3–5 days. The parental haploid wild-type strains were used as controls. Spores from both crosses were separated by micromanipulation on YES agar plates and incubated for 4 days at 32°C. After this time, around 80% of the wild-type spores had germinated and had formed visible colonies, while less than 1% of the *gas4^Δ* mutant spores were able to form visible colonies. Colony morphology was analysed by light microscopy, and the results indicated that *gas4^Δ* mutant spores were unable to germinate (data not shown). Plates were incubated for three additional days (1 week after tetrad dissection), but the result was the same, ruling out the possibility of a delay in germination. We then considered carrying out sporulation and germination in osmotically supported medium to determine whether this would increase the survival rate of the ascospores. However, *gas4^Δ* mutant spores were unable to germinate when incubated in sporulation and germination media supplemented with sorbitol. The sporulation of heterozygous crosses (*gas4⁺ × gas4^Δ*) generated normal asci, with four refractile spores with similar viability to that of the wild-type strain, indicating that *gas4^Δ* is recessive and that the defect is spore-independent. As additional confirmation that the spores were dead and that germination was not the problem, we stained wild-type and mutant asci with methylene blue. This vital dye is normally used to distinguish between live and dead cells, as it only stains the cytoplasm of the latter. We found that this stain was only incorporated in the epiplasm and ascospore cytoplasm of *gas4^Δ* spores, but not in wild-type asci (Fig. 4C). Taken together, these results suggest that *gas4p* is necessary for the proper maturation of the spore wall and for the generation of viable spores.

gas4p is necessary for correct formation of the spore wall

To further assess the nature of the defect of *gas4^Δ* mutants, transmission electron microscopy (TEM) was used to compare the morphology of the spore wall between wild-type and *gas4^Δ* mutant strains. The four spores of a wild-type ascus were round and had a regular shape and size (Fig. 5A), while the spores of a *gas4^Δ* ascus were smaller and more irregular in size and shape (Fig. 5C). Furthermore, the cytoplasmic material that was not included in the spores was darker than in the wild-type. The spore wall of wild-type cells appeared to have both electron-lucent and electron-opaque material (Fig. 5B). The electron-lucent material represented the inner spore wall and contained β -1,3-glucan (black arrowhead), while the electron-opaque material represented

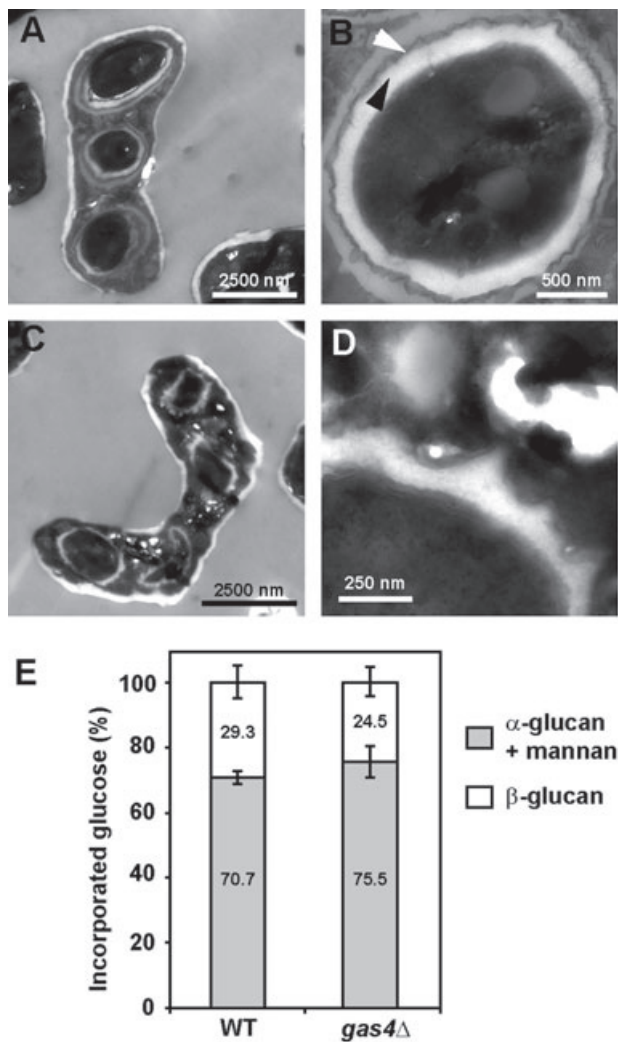


Fig. 5. *gas4p* is necessary for correct cell wall synthesis. Electron microscopy ultrastructure of wild-type and *gas4Δ* mutant spores. A. Three out of four spores in the wild-type ascus are shown in this section. The electron-opaque material forms a thin layer around the 1,3- β -glucan layer. B. Detail of the spore cell wall of the wild-type strain. White arrowhead indicates the amylose-like material in the outermost layer of the spore wall. Black arrowhead marks the inner glucan layer. C. *gas4Δ* mutant ascus with four immature spores. D. Magnification of a *gas4Δ* mutant ascospore, where the outer layer is not well defined. E. Cell wall composition of wild-type and *gas4Δ* spore cell walls. The relative levels of [^{14}C]-glucose radioactivity incorporated into α -glucan plus galactomannan and β -1,3-glucan fractions are shown for the wild-type (S964) and *gas4Δ/gas4Δ* (YMMR122) diploid cells. Values are the mean of four independent experiments with duplicate samples. Standard deviations for each fraction are shown.

the outer spore wall, mainly composed by amylose-like material, galactomannans and cell wall proteins (white arrowhead). In *gas4Δ* mutant spores, the thickness of the cell wall was irregular and the difference between the two layers was not clearly defined. The outer layer could not

be distinguished from the surrounding cytoplasm, as though it had been incorrectly attached to the inner layer (Fig. 5D). However, asci from *gas4Δ* cells were positive for the iodine-staining assay, indicating that the amylose-like material was present in the spores (data not shown). Together, these data suggest that *gas4Δ* mutants have a severe defect in spore maturation and that the ascospore wall is not assembled correctly.

To analyse the chemical composition of the spore wall, asci from wild-type and *gas4Δ/gas4Δ* diploid cells were labelled and fractionated (see *Experimental procedures*). In our protocol of spore wall polymer fractionation, labelled cell walls were digested with recombinant β -1,3- β -glucanase (Quantazyme). Thus, the pellet obtained corresponds to the α -1,3-glucan plus mannan fraction, while the supernatant represents the β -1,3-glucan (Pérez and Ribas, 2004). Total incorporation in the cell walls was slightly higher in *gas4Δ* mutant asci compared with the wild-type ($26 \pm 4.5\%$ versus $23.2 \pm 5\%$ respectively). As previously described, the amount of α -1,3-glucan plus mannan in the spore wall of wild-type and mutant asci was significantly higher than in vegetative cells (García *et al.*, 2006). The absence of *gas4p* induced a decrease of β -1,3-glucan (29.5% versus 24.5%), which was compensated by an increase in α -glucan plus mannan fraction (Fig. 5E).

S. pombe gas4p is a β -1,3-glucanosyltransferase

The sequence similarity between *gas4p* and other GH72 proteins and the conservation of the sequence around the two aspartic acids that form the catalytic pair – FF(A/S)GNE*V (the acid-base donor) and F(F/L)SE*(Y/F)GCN (the nucleophilic residue) (Mouyna *et al.*, 2000b; Papaleo *et al.*, 2006) – suggested that *gas4p* could also display β -1,3-glucanosyltransferase activity. As a recombinant form of *A. fumigatus* Gel1p lacking the GPI signal exerts the same β -1,3-glucanosyltransferase activity as the full-length protein (Mouyna *et al.*, 2000a), a truncated version of *gas4p* lacking the GPI anchor signal and containing 6-His at the C-terminus (*r-gas4p*) was expressed and purified by affinity chromatography from the culture medium of *P. pastoris* transformants. The purified protein was incubated with reduced laminarioligosaccharides of 13 glucose residues (G_{13r}) for different times and the products of the reaction were analysed by high-performance anion exchange chromatography (HPAEC). Incubation of *r-gas4p* with G_{13r} afforded a set of new β -1,3-glucan products after 30 min of incubation, and the amount of product increased with the incubation time (Fig. 6A). The resulting products were smaller and larger than the starting substrate, indicating that the protein was catalysing a transfer reaction. The chromatogram revealed that the enzyme preferentially released an oligosaccharide of 6–7 glucose

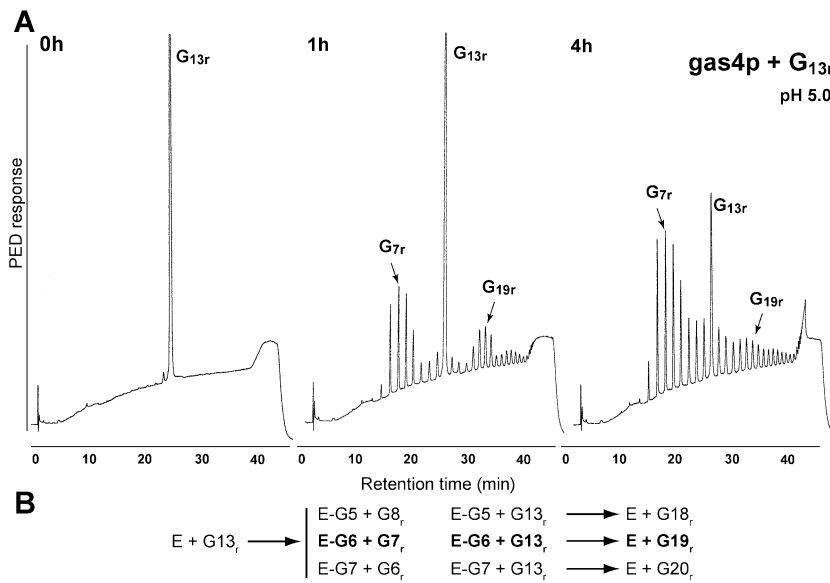


Fig. 6. gas4p has β -1,3-glucanosyltransferase activity. A. Recombinant gas4p expressed in *P. pastoris* (r-gas4p) was incubated with reduced G13 (G_{13r}) in 100 mM acetate buffer (pH 5.0) for the indicated times. The reaction products were analysed by HPAEC and the major products of the reaction are indicated. B. Major two-step reactions catalysed by gas4p. The main reaction is indicated in bold.

units from the non-reducing end of the donor molecule and then transferred it to the acceptor laminarioligosaccharides (Fig. 6B). The complex HPAEC pattern observed after prolonged incubation times indicated that the initial transferase products could be subsequently reused either as donors or acceptors, resulting in a broad range of transfer products of increasing size (degree of polymerization > 30) until they became alkali-insoluble. Comparison of the HPAEC pattern with control laminarioligosaccharides showed that all products contained only β -1,3 linkages, because the introduction of a linkage other than β -1,3 results in a shift in the retention time of the branched oligosaccharide (Koizumi *et al.*, 1989; Mouyna *et al.*, 1998). The minimum oligosaccharide that could be used in the transfer reaction was an oligosaccharide of nine glucose units (data not shown), and the optimum pH was slightly acid: pH 5.0. No products were observed when the reaction was buffered at pH 3.5, and very little activity was observed at pH 7.5 (data not shown). These results indicate that the β -1,3-glucanosyltransferase activity of gas4p is similar to that of other proteins of the GH72 family.

Putative catalytic residues of gas4p are important for its biological function

Sequence alignment of GH72 proteins has previously shown that two glutamic acid residues (indicated by asterisks) are perfectly conserved in the sequences (A/S)GNE*(V/I) and SE*(Y/F)GC (Mouyna *et al.*, 2000b; Carotti *et al.*, 2004; Papaleo *et al.*, 2006). It has been proposed that these residues might form the catalytic pair involved in the transfer reaction for catalysis. Indeed, the replacement of E160 and E261 with Leu and Phe, respec-

tively, eliminates the *in vitro* catalytic activity of AfGel1p (Mouyna *et al.*, 2000b), and replacement of E161 and E262 by two glutamine residues totally abolishes the *in vitro* catalytic activity of ScGas1p (Carotti *et al.*, 2004). To test the importance of glutamates E157 and E257 for the biological function of gas4p, we constructed two mutant forms of this protein – gas4p-E157Q and gas4p-E257Q – by replacing the glutamic acid residues with the structurally similar glutamine residues. In order to analyse spore morphology and viability, these mutant alleles were cloned into plasmids under the control of the native promoter and transformed into *h*⁺ and *h*⁻ *gas4* Δ strains. The morphology of the spores generated by these strains was analysed by phase contrast microscopy and compared with those from the *gas4* Δ mutant transformed with the vector (negative control) or the wild-type *gas4*⁺ gene. In addition, the parental haploid wild-type strains were used to compare the sporulation efficiency of the strains harbouring the different plasmids. The results indicated that only the strains carrying the native gas4p were able to form wild-type spores, with their characteristic refractility (Fig. 7A and D). The morphology of the spores of strains containing gas4p-E157Q or gas4p-E257Q (Fig. 7E and F) was similar to that observed in the mutant (Fig. 7B and C) and lacked any refractility. Furthermore, the spores produced by strains containing gas4p-E157Q or gas4p-E257Q were unable to germinate, and spore viability was similar to that of the *gas4* Δ mutant (Fig. 7). Both results (abnormal morphology and unviable spores) suggest that the two conserved glutamic acid residues are important for the biological function of gas4p during *S. pombe* sporulation. Furthermore, as these residues are part of the catalytic pair of other members of this family of proteins, it is very likely that gas4p β -1,3-

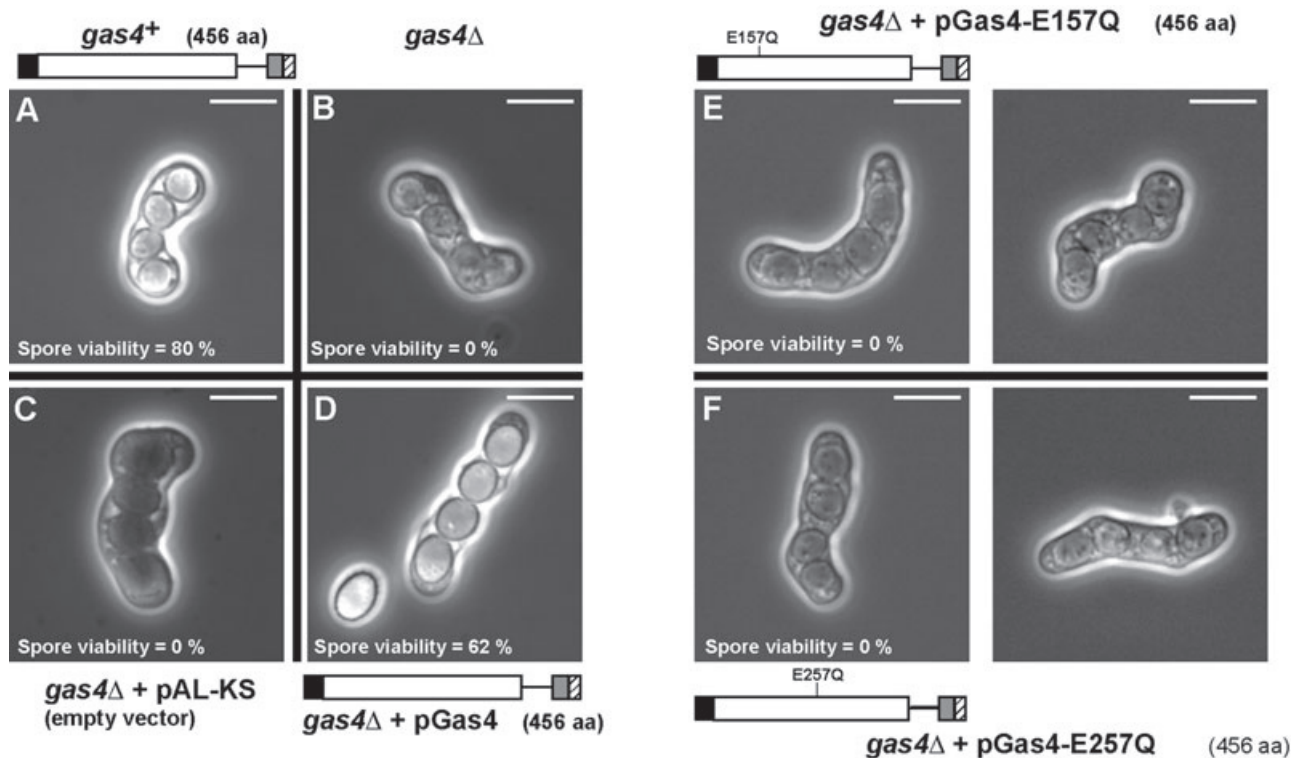


Fig. 7. The glutamic acid E157 and E257 residues are necessary for the biological function of *gas4p*. The wild-type strain (A), the null mutant strain (B) and the *gas4*Δ strain harbouring pAL-KS (C), pMMR14 (D), pMMR30 (E) and pMMR29 (F) were induced to sporulate on MEA plates. Photographs of bright field phase contrast microscopy are shown. The viability of the spores of each strain is indicated in each image. Symbols of the *gas4p* domains are as in Fig. 3. Scale bars, 10 μm.

glucanoyltransferase activity would play an essential role in the synthesis and maturation of the spore wall.

The GPI anchor is important for gas4p localization and function in vivo

Removal of the GPI anchor did not affect the catalytic activity of *gas4p* *in vitro*, as the recombinant protein expressed in *P. pastoris* lacked the GPI-moiety. We analysed whether the GPI attachment might be important for *gas4p* function or for its localization *in vivo*. Thus, we constructed a truncated form of *gas4p* (*gas4p*-ΔGPI) in which the C-terminal hydrophobic sequence was deleted, cloned it into a plasmid under the control of the *gas4*⁺ promoter, and transformed the plasmid into two *gas4*Δ mutant haploid strains of opposite mating types. The resulting strains were induced to conjugate and sporulate on solid media and the morphology and viability of the spores were analysed. Similar to the analysis of the mutations in the putative catalytic residues, we compared the phenotype of the asci produced by a wild-type strain with those of the null mutant carrying the vector, *gas4*⁺, or *gas4*-ΔGPI. The results indicated that the spores produced by cells carrying the

truncated version of *gas4*⁺ were similar to those of the null mutant and that they were non-refractile (Figs 7 and 8A). Moreover, the *gas4p*-ΔGPI protein was unable to complement the viability defect of *gas4*Δ spores, as none of the ascospores lacking the GPI was able to germinate. Taken together with the data from the activity analysis, these results suggest that the GPI anchor is not necessary for the catalytic activity, but the addition of a GPI attachment to the protein does seem to be extremely important for *in vivo* functionality.

As the *gas4p*-ΔGPI protein shows catalytic activity *in vitro*, one hypothesis to explain the absence of complementation could be that the GPI anchor would be necessary for the localization of the protein to the spore periphery. To test this hypothesis, a YFP-tagged version of the *gas4p*-ΔGPI was also constructed and introduced into two haploid wild-type strains, which were then induced to mate and sporulate on MEA plates over 48 h. The results of these experiments indicated that the truncated protein was not retained at the ascospore periphery, in contrast to the wild-type YFP-*gas4p*, and that most of the YFP-*gas4p*-ΔGPI protein accumulated in the epiplasm surrounding the ascospores (Fig. 8B, arrowheads). Furthermore, when the ascus wall underwent endolysis to

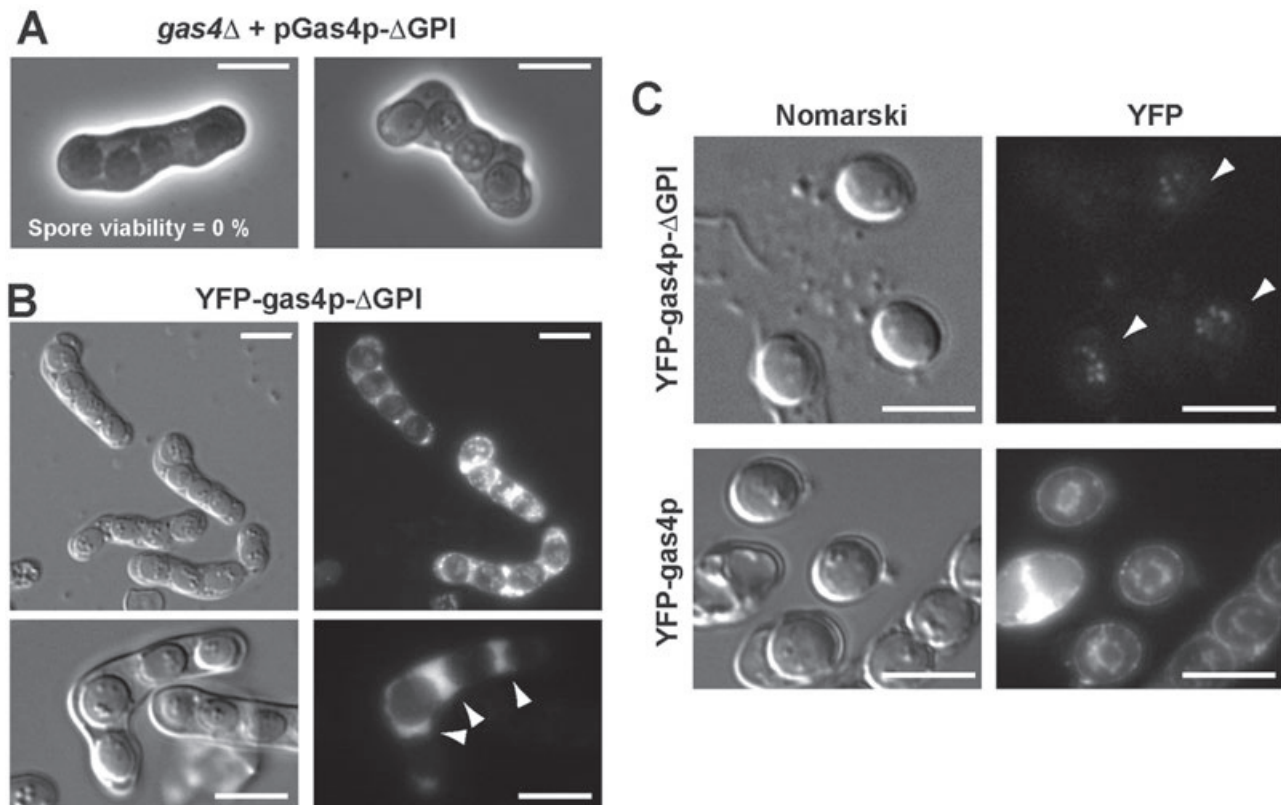


Fig. 8. The GPI attachment is required for *gas4p* functionality *in vivo*.

A. The *gas4Δ* strain harbouring plasmid pMMR26 (*gas4p-ΔGPI*) was induced to sporulate on MEA plates. Phase contrast microscopy photographs of the spores after 2 days of sporulation are shown. Controls of this experiment are the same as in Fig. 7.

B. The GPI moiety is responsible for *gas4p* localization to the spore outline. The wild-type strain carrying YFP-*gas4p-ΔGPI* was induced to sporulate on MEA plates for 2 days. Photographs of differential interference contrast microscopy and YFP fluorescence (YFP) are shown. Arrowheads indicate epiplasm localization. Scale bars, 10 μ m.

C. Photographs of released spores of the wild-type strain carrying YFP-*gas4p-ΔGPI* (upper panels) or YFP-*gas4p* (lower panels) after 2 days of sporulation. Arrowheads indicate spore outline. Scale bars, 10 μ m.

release the ascospores, fluorescence was readily detected in the outline of spores carrying YFP-*gas4p* (Fig. 8C, lower panel), while fluorescence was never found to be associated with the spores carrying YFP-*gas4p-ΔGPI* (Fig. 8C, upper panel). Thus, the GPI attachment is not necessary for *gas4p* catalytic activity, but it is essential for the retention of the protein in the spore periphery, and a proper localization of *gas4p* to the spore outline is required for the correct assembly of a functional spore wall.

Discussion

β -1,3-glucan is a major polysaccharide component of fungal cell walls, the division septum and the spore wall. Based on the data from the *S. pombe* sequencing project, four genes encoding proteins belonging to the GH72 family have been identified as *ScGAS1* homologues. Here, we demonstrate that *gas4p* shows β -1,3-glucanoyltransferase activity similar to that of other

members of this family and that this activity is essential for the development of the ascospore wall but not for the assembly of the vegetative cell wall. In *S. pombe*, members of several gene families, such as the β -1,3-glucan synthase family, whose products are involved in cell wall biosynthesis, have specialized functions during the life cycle of this yeast. Thus, while *cps1p/bsg1p*, *bgs3p* and *bgs4p* are indispensable for vegetative growth, only *bgs2p* is required for the synthesis and maturation of the ascospore wall (Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2005). Similarly, the α -glucan synthase *ags1p* is essential during vegetative growth, while the *mok12p*, *mok13p* and *mok14p* paralogs are necessary for the synthesis of spore wall α -glucans (Hochstenbach *et al.*, 1998; García *et al.*, 2006). In this work, we have shown that within the *S. pombe* GAS gene family, *gas4p* is essential for spore maturation and viability, while the other three members – *gas1p*, *gas2p* and *gas5p* – could perform their function during the vegetative cycle.

Deletion of *gas4*⁺ blocks spore wall development

Ascospore development in *S. pombe* appears to be very similar to that observed in *S. cerevisiae*. The meiotic programme involves a reductional division (meiosis I) that is rapidly followed by a mitosis-like division (meiosis II), generating four haploid nuclei. During meiosis II, a differentiation programme starts, resulting in the formation of spores. In this process, the forespore membrane eventually encloses each divided nucleus together with cytoplasm-containing organelles. The final steps involve the *de novo* formation of an extremely resistant spore wall inside the forespore membrane (Egel, 2004). *gas4*⁺ codes for a 456-amino-acid protein which is 30% identical to the other putative glucanosyltransferases from *S. pombe*. The gene is not essential during the mitotic cycle, but it is specifically induced during the sporulation programme, with a kinetics similar to that of other late sporulation genes (Mata *et al.*, 2002), and the protein accumulates after meiosis and during spore development. Consistent with a role in ascospore wall development, *gas4p* localized to the periphery of the ascospores while no fluorescent YFP-*gas4p* signal was detected in vegetative cells. This is in good agreement with the fact that no *gas4p* was found during vegetative growth by Western blot when anti-*gas4p* specific antibodies were used. However, we cannot rule out that a low amount of protein, under the level of detection of the antibodies, could be present in mitotic cells as a basal level of *gas4*⁺ transcription was observed in these conditions. All of these results suggest that *gas4p* is dispensable for vegetative growth and that it fulfils its function during spore formation.

Several lines of the evidence obtained in this work indicate that *gas4p* is required for the completion of spore wall maturation. First, no mature or refractile spore were formed in *gas4* Δ cells after incubation in sporulation medium for several days, although *gas4* Δ asci were able to complete meiosis I and meiosis II as assayed by DAPI staining. Second, electron microscopic examination of the asci of mutant strains revealed the formation of four compartments inside each cell, although the outer, electron-opaque layer was thinner and less defined than in wild-type spores. The appearance of the mutant spores was always very similar; as though they had always been arrested at the same stage before spore wall maturation. Third, cell wall fractionation experiments indicated that *gas4* Δ spores showed a slight reduction in β -glucan content that was compensated by an increase in the α -glucan plus mannan fraction. Finally, the mutant spores never gave rise to viable progeny, even in osmotically supported medium, suggesting that spore wall maturation is necessary for spore viability to be maintained. In support of this idea, we found that the mutant spores were stained with methylene blue, indicating that the absence

of *gas4*⁺ results in an inability to maintain cellular integrity, and that the lack of spore viability is not merely a defect in spore germination. This phenotype is similar to that reported for mutants lacking *bgs2*⁺, which encodes a sporulation-specific glucan synthase homologue required for proper ascospore wall maturation (Martín *et al.*, 2000). This therefore suggests that not only the synthesis of linear β -1,3-glucan chains mediated by *bgs2p*, but also its proper attachment and cross-linking to the already existing chains is essential for proper ascospore wall formation and for the maintenance of spore viability.

gas4p is a β -1,3-glucanosyltransferase

gas4⁺ was found to be homologous to the *GAS/PHR/EPD/GEL* genes that encode a family of GPI-anchored proteins required for correct morphogenesis in yeast and fungi. These proteins from the GH72 family have a modular structure, in which the catalytic domain (GluTD) can be followed by different domains at the C-terminus (Papaleo *et al.*, 2006). This variation is also seen in *S. pombe* GH72 proteins. For example, *gas1p* displays a serine-rich region and a cysteine-rich region, while *gas2p* has only the Cys-box and *gas5p* has the serine repeats. In contrast, *gas4p* does not show any of these additional regions (it only contains a short Ser-rich domain). When a recombinant *gas4p* form was purified and assayed for enzymatic activity, it displayed the same β -1,3-glucanosyltransferase activity described for other members of the family (Mouyna *et al.*, 2000a; Carotti *et al.*, 2004), catalysing the transfer of an oligosaccharide of 6–7 glucose units from the non-reducing end of the donor molecule to the acceptor molecule.

In light of the β -1,3-glucanosyltransferase activity of the *gas4p* protein and the proposed function of AfGel1p (Mouyna *et al.*, 2000a), our working hypothesis for the biological function of *gas4p* is that it might function in the elongation of β -1,3-glucan side-chains that is necessary for the anchoring of other polysaccharides to the cell wall network. It has also been suggested that the *C. albicans* Phrp orthologues could process β -1,3-glucans and make acceptor sites available for the attachment of β -1,6-glucans (Fonzi, 1999). Accordingly, the absence of *gas4*⁺ would lead to alterations in the structure or composition of the *S. pombe* spore wall. Indeed, modifications in the spore wall outer layer and alterations in the composition of the spore wall have been observed in *gas4* Δ mutants. Furthermore, an increase in spore wall permeability was observed, as DAPI stained the spore nuclei faster in the mutant than in the wild-type ascospores. Another consequence of the deletion of *gas4*⁺ was the unviable nature of the mutant spores, suggesting that proper ascospore wall maturation is essential for spore viability to be maintained. Interestingly, a similar phenotype has recently

been described in *S. cerevisiae*. *GAS2* and *GAS4* are two sporulation-specific β -1,3-glucanoyltransferases involved in spore wall maturation (Ragni *et al.*, 2007a). Deletion of any of the genes produces no phenotype, but the *gas2* Δ *gas4* Δ double mutant also produces spores in which viability is strongly reduced, suggesting that ScGas2p and ScGas4p perform redundant functions in spore wall assembly, and that this function is accomplished by a single protein, gas4p, in *S. pombe*. Interestingly, we have found that gas4p partially complements the sporulation defect of a *S. cerevisiae* *gas2* Δ *gas4* Δ mutant (data not shown), indicating that these proteins are functional homologues.

Mutation in the two conserved glutamic acids present in all GH72 members – i.e. the putative catalytic site of the enzyme – (the gas4p-E157Q or gas4p-E257Q alleles) resulted in proteins with no biological function. Although we did not test whether these mutations abolished gas4p enzymatic activity, it has been shown that replacement of E160 and E261 by a Leu and a Phe, respectively, completely abolishes the *in vitro* glucanoyltransferase activity of AfGel1p, and that replacement of E161 and E262 with glutamine eliminates the activity of ScGas1p without affecting the protein conformation (Mouyna *et al.*, 2000b; Carotti *et al.*, 2004). Thus, it is very likely that the gas4p-E157Q or gas4p-E257Q proteins would lack any β -1,3-glucanoyltransferase activity, suggesting that this enzymatic activity is essential for ascospore maturation in *S. pombe*.

Another interesting observation is the fact that the GPI anchor is necessary for gas4p functionality *in vivo*, whereas it is not required for catalytic activity *in vitro*. Deletion of the GPI anchor resulted in defects in gas4p localization, the protein being unable to remain associated with the spore membrane or wall. This observation suggests that the catalytic activity must be properly localized to specific regions of the spore periphery to perform its biological function. As *S. pombe* gas4p contains a predicted sequence for GPI addition at the C-terminus but lacks the dibasic motif before the cleavage signal, which is necessary to maintain the GPI proteins in the plasma membrane (Caro *et al.*, 1997; Frieman and Cormack, 2003), it is possible that gas4p might be directed to the ascospore wall, where it would become attached to β -1,6-glucan through the GPI moiety. It has recently been shown that gas1p and gas5p are linked to β -1,6-glucan via the GPI anchor during vegetative growth (de Groot *et al.*, 2007).

In sum, our study sheds light on ascospore wall formation. In this process, the deposition of ascospore wall components requires at least the activity of bgs2p (β -1,3-glucan, synthesis) (Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000), the α -1,3-glucan synthases mok12p, mok13p and mok14p (García *et al.*, 2006), and the chitin synthase

chs1p (Arellano *et al.*, 2000). In a later step, gas4p would be required for the proper assembly of these polysaccharides and cell wall proteins, necessary for a mature structure and for correct anchoring of the inner and outer layers of the ascospore wall.

Experimental procedures

Strains, growth conditions and genetic manipulation

The *S. pombe* strains used in this study are listed in Table 1. Yeast cells were grown on YES media or minimal media (EMM) with appropriate supplements (Moreno *et al.*, 1991). Yeast transformations were performed with the DMSO-enhanced protocol (Hill *et al.*, 1991). For sporulation assays, haploid cells of opposite mating types were induced to conjugate and sporulate on solid media (YPD or MEA plates). Synchronization of strains carrying the thermosensitive *cdc25-22* mutation was achieved by growing the cells at the permissive temperature (25°C) to early log phase ($OD_{595} = 0.5$) and then shifting the cultures to 37°C for 4 h. Cells were released from arrest by transfer to 25°C, and samples were taken every 20 min. Diploid strains homozygous for the mating type (h^-/h^-) were generated by protoplast fusion (Sipiczki and Ferenczy, 1977). Synchronous meiosis in $h^-/h^-pat1-114/pat1-114$ thermosensitive diploid strains was carried out essentially as described previously (Blanco *et al.*, 2001). Spore viability was assayed by tetrad dissection. Crosses were performed on YPD or MEA plates and, when asci were observed, ascospores were separated on YES plates.

Plasmid and DNA manipulations

The oligonucleotides used for different DNA manipulations are shown in Table 2. Construction of plasmid pMMR14 carrying the *gas4*⁺-coding sequence under its own promoter was achieved by PCR amplification of the coding sequence of the β -1,3-glucanoyltransferase using oligonucleotides 1043 and 1046 (which introduced XbaI and XhoI sites at the ends) and cloning of the resulting fragment between the XbaI and XhoI sites of plasmid pAL-KS. Plasmids used in this study are listed in Table 3.

Construction of null mutants and YFP-tagged strains

The entire coding sequence of *gas4*⁺ was deleted to create the null mutants by replacing the coding sequence by the *kanMX4* cassette. The deletion cassette was constructed using the recombinant PCR approach described by Wach (1996). For this purpose, DNA fragments of 300–500 bp corresponding to the 5'- and 3'-flanking regions of the gene were PCR-amplified using the specific oligonucleotides pairs 1043–1044 and 1045–1046. The resulting fragments were subsequently fused by recombinant PCR to the *kanMX4* cassette (which confers resistance to the G418 antibiotic) obtained from plasmid pFA-*KanMX4* (Wach *et al.*, 1994).

The N-terminally YFP-tagged fusion was constructed by PCR, amplifying DNA fragments of 570 and 210 bp with the specific oligonucleotide pairs 1043–1143 and 1144–1145

Table 1. Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
h54	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210</i>	Lab stock
h116	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216</i>	Lab stock
h20	h ⁻ <i>leu1-32</i>	Lab stock
YMMR17	h ⁻ <i>leu1-32 gass4::kanMX4</i>	This study
YMMR25	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 gass4::kanMX4</i>	This study
YMMR30	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 gass4::kanMX4</i>	This study
S964	h ⁻ /h ⁻ <i>pat1-114/pat1-114 ade6M210/ade6M216 leu1-32/leu1-32</i>	S. Moreno
S1111	h ⁻ <i>pat1-114 ade6M210 leu1-32</i>	S. Moreno
S1112	h ⁻ <i>pat1-114 ade6M216 leu1-32</i>	S. Moreno
YMMR78	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 gass4::kanMX4 + pAL-KS</i>	This study
YMMR79	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 gass4::kanMX4 + pMMR14</i>	This study
YMMR80	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 gass4::kanMX4 + pMMR19</i>	This study
YMMR81	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 gass4::kanMX4 + pMMR26</i>	This study
YMMR82	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 gass4::kanMX4 + pAL-KS</i>	This study
YMMR83	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 gass4::kanMX4 + pMMR14</i>	This study
YMMR84	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 gass4::kanMX4 + pMMR19</i>	This study
YMMR85	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 gass4::kanMX4 + pMMR6</i>	This study
YMMR86	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 gass4::kanMX4 + pMMR29</i>	This study
YMMR87	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 gass4::kanMX4 + pMMR30</i>	This study
YMMR88	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 gass4::kanMX4 + pMMR29</i>	This study
YMMR89	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 gass4::kanMX4 + pMMR30</i>	This study
YMMR107	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M210 + pMMR27</i>	This study
YMMR108	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-Δ18 ade6M216 + pMMR27</i>	This study
YMMR117	h ⁻ <i>pat1-114 ade6M210 leu1-32 gass4::kanMX4</i>	This study
YMMR118	h ⁻ <i>pat1-114 ade6M216 leu1-32 gass4::kanMX4</i>	This study
YMMR122	h ⁻ /h ⁻ <i>pat1-114/pat1-114 ade6M210/ade6M216 leu1-32/leu1-32 gass4::kanMX4/gas4::kanMX4</i>	This study

respectively. The resulting fragments were fused by recombinant PCR to the YFP coding sequence obtained from plasmid pBS7 (Yeast Resource Center, <http://depts.washington.edu/yeastrc>). The amplified fragment contained the YFP coding region fused in-frame to codon 27 of the *gas4*⁺ gene (immediately after the signal sequence). It was then cloned between the SpeI and BglII sites of plasmid pMMR14. The resulting plasmid was designated pMMR19.

Construction of *gas4p-ΔGPI* mutant forms

The mutant form of *gas4p* lacking the C-terminus hydrophobic sequence was constructed as follows. The truncation cassette was constructed using a recombinant PCR approach similar to that described by Wach (1996). DNA fragments of 396 and 550 pb corresponding to the flanking regions of the C-terminus were amplified, using the specific oligonucleotides pairs 1002–1317 and 1316–1046. The resulting fragments were subsequently fused by recombinant PCR, using the primers 1002–1046, and this fragment was cloned between the AatII and XhoI sites of plasmid pMMR14. The resulting plasmid was designated pMMR26. The same procedure, except for cloning between the AatII and XhoI sites of plasmid pMMR19 instead of pMMR14, was followed to obtain a YFP-tagged version of the *gas4p-ΔGPI* protein. The resulting plasmid was designated pMMR27.

Mutagenesis of *E157* and *E257*

Mutant forms of *gas4p* were obtained by overlap extension PCR (Horton *et al.*, 1989). In the first PCR steps, two partially overlapping fragments of *gas4*⁺ were amplified using two sets

of primers. For *gas4-E157Q*, a pairing of the forward primer 1144 and reverse primer 1318 and a pairing of the forward primer 1319 and reverse primer 1324 were used. Similarly, for *gas4-E257Q* the amplification was carried out using primers 1144 and 1322, and primers 1323 and 1324. Primers 1318 and 1319 are complementary to nucleotides +456 to +485 of the coding region of *gas4*⁺, while primers 1322 and 1323 are complementary to nucleotides +755 to +784. In these primers, a Gln codon was incorporated instead of the Glu codon. For both *gas4-E157Q* and *gas4-E257Q*, 30 cycles of a 30 s melting step at 94°C, a 30 s annealing step at 55°C and a 1 min extension step at 72°C were performed using EHF DNA Polymerase (Roche). The mutations of interest were located in the region of overlap between the amplified fragments. The pairing of overlapping fragments was used for a second PCR step, using the forward primer 1144 and the reverse primer 1324 to amplify the mutated regions of *gas4*⁺. Thirty cycles of a 30 s melting step at 94°C, a 30 s annealing step at 55°C and a 1.5 min extension step at 72°C were performed using EHF DNA Polymerase (Roche). Each of these regions was cloned between BglII and AatII sites of plasmid pMMR14. The resulting plasmids were designated pMMR30 (carrying the *gas4p-E157Q* form) and pMMR29 (carrying the *gas4p-E257Q* form).

RNA isolation and Northern blot analyses

Total RNA was prepared from 1.3×10^9 cells using the method described previously (Percival-Smith and Segall, 1984). For Northern-blot analysis, 12.5 μg of RNA was used. The DNA probes used to detect the transcripts were a 434 bp

Table 2. Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence 5'–3'
	Used for <i>gas4</i> ⁺ probe
1002	CAAAGATGACGAGCGTAGAGTGT
1003	AGCTGAGGGTAGCGATAAGGAC
	Used for <i>gas4</i> ⁺ deletion ^{a,b}
1043	TAAATCTAGATTTCTGTTTAGATGAGGATACTAAGA (XbaI)
1044	GGGGATCCGTCGACCTGCAGCGTACT AGCAACACCCATGTTGCAATATAAT
1045	AACGAGCTCGAATTCATCGATGAT GCCTTATCGCTACCCTCAGCTTCT
1046	TAAACTCGAGAATGTTATGTAATGATACCTTACTACG (XhoI)
	Used for YFP tagging ^b
1143	CCAGTGAAAAGTTCCTCCTTTACTGTTAATTAAGGAGAAACTGAGGCTTTAGCGAGGC
1144	GGGATTACACATGGCATGGATGAAGTATACAAAGTTCACGTTGATGGTCGTTACTTT
1145	ACACTTGTTCATGGTCGGCTGAATT
	Used for cloning into pPICZαA ^a
1261	GAAGCTGAATTCCAAACACATCCAATAGTGATTAAGGA (EcoRI)
1262	TTGTTCTAGAATGGAGCTAGTCATGCCAGATGTATA (XbaI)
	Used for GPI deletion ^c
1316	AGCTCCTCTGAAAGCGGTTTCATCGTAAAAAAGAATTGTTGAAATTT
1317	AAATTTCAACAATTCITTTTTACGATGAACCGCTTTCAGAGGAGCT
	Used for site-directed mutagenesis ^{a,d}
1318	TCGTCATTACTACTTGGTTGCCGGAGAAG
1319	CTTCTCCGGCAAC CAA GTAGTAAATGACGA
1322	TATTGCAACCAA TTGT GACAAGAATAGCG
1323	CGCTATTCTTGTCA CAA TTTGGTTGCAATA
1324	AGATGGTTTGTITTTGGCTTGGGACGTCGAGAG (AatII)

a. The restriction sites are underlined.

b. Sequences interanl to the KanMX4 cassettes and YFP marker are in boldface.

c. The sequence after the STOP codon is in italics.

d. Codons introducing a Gln instead of a Glu are shown in boldface and underlined.

internal fragment (from +933 to +1366) obtained by PCR using oligonucleotides 1002 and 1003 for *gas4*⁺, and a 1.7 kb BamHI-HindIII fragment obtained from plasmid pSK-*ura4*⁺ for *ura4*⁺.

Microscopy techniques

For light microscopy, cells were stained with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) for visualization of DNA, or aniline blue for β-1,3-glucan. Methylene blue at 0.6% was used to distinguish dead from live yeast cells. Samples were viewed using a Leica DMRXA microscope equipped for bright field and Nomarski optics and epifluorescence, and were photo-

graphed with a Leica DFC350FX camera. To estimate the proportion of cells in meiosis I, meiosis II or in sporulation, the percentage of cells with one, two, or four nuclei after DAPI staining, and the percentage of asci with mature spores under Nomarski microscopy were determined.

For TEM, sporulating cells were collected from YPD plates. The samples were washed twice with water and then in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, prefixed with glutaraldehyde (3% glutaraldehyde in phosphate buffer) for 1 h, washed twice in buffer and placed in 1% osmium tetroxide for 1 h at 4°C. The material was subsequently washed in distilled water and dehydrated in a graded acetone series. The dehydrated cells were mounted on specimen holders, and examined under a Zeiss EM 902 transmission electronic microscope.

Table 3. Plasmids used in this study.

Plasmid	Vector	Description	Source
pMMR14	pAL-KS	<i>gas4</i> ⁺	This study
pMMR19	pAL-KS	<i>YFP-gas4</i> ⁺	This study
pMMR23	pICZαA	<i>P_{AOX1}-r-gas4</i> ⁺	This study
pMMR26	pAL-KS	<i>gas4-ΔGPI</i>	This study
pMMR27	pAL-KS	<i>YFP-gas4-ΔGPI</i>	This study
pMMR29	pAL-KS	<i>gas4-E257Q</i>	This study
pMMR30	pAL-KS	<i>gas4-E157Q</i>	This study

Extract preparation, electrophoresis and immunoblotting

Sporulating cells were collected by centrifugation and washed twice with PMSF 20 mM (in water). A small aliquot was used to assess the sporulation process by microscopy. After a 2 min centrifugation at 4°C, pellets were frozen quickly and stored at –20°C. Total cell extracts of sporulating cells were prepared by breaking the cells or the spores with glass beads in lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glycerol and 0.5% NP-40).

For immunoblotting, 50 µg of protein extracts was resolved by SDS-PAGE on 10% gels. Protein transfer, blotting and chemiluminescence detection were performed using standard procedures. Anti-gas4p or antiactin antibodies (ICN Biomedicals) were used.

Labelling and fractionation of cell wall polysaccharides

Labelling the newly synthesized spore wall polysaccharides was essentially carried out as previously described (Pérez and Ribas, 2004; García *et al.*, 2006). Briefly, exponentially growing cultures of *S. pombe* *h⁻h⁻pat1-114/pat1-114* thermosensitive diploid strains S964 and YMMR122 grown in YES media were transferred to MM and grown overnight until an OD₆₀₀ = 0.8. Then, cells were shifted to nitrogen-deficient medium (MM-N) and incubated at 25°C for 16 h to arrest the cells in G0. After that time, [U-14C] glucose (1 µCi ml⁻¹) was added and sporulation was induced by shifting the cultures to 34°C for 20 h. To calculate the amount of radioactivity of each polymer, cells were harvested and total glucose incorporation was monitored by measuring the radioactivity in trichloroacetic acid-insoluble material. Mechanical breakage of cells was performed using pre-chilled glass beads added to the cells, and lysis was achieved in a Fast-Prep System (Bio 101, Savant), using three 30 s intervals at speed 6. Spore walls were pelleted at 1000 g for 5 min and washed three times with 2 M NaCl and three times with 1 mM EDTA. Aliquots (100 µl) of total wall were incubated with 100 U Quantazyme (Quantum Biotechnologies). Aliquots without enzyme were included as controls. The samples were centrifuged and supernatant and washed pellet were counted separately. The supernatants from the Quantazyme reaction were considered to contain β-1,3-glucan, and the pellet was considered to hold α-glucan plus galactomannan (Pérez and Ribas, 2004). All determinations were carried out in duplicate, and the values for each strain were calculated from four independent experiments.

Expression of gas4p in *pichia pastoris*

Pichia pastoris KM71H (Invitrogen) and the expression vector pPICZαA were used to express recombinant *S. pombe* gas4p (r-gas4p). A truncated form of *gas4⁺* was generated by PCR amplification of the gene with the forward primer 1261 and the reverse primer 1262. The forward primer was complementary to nucleotides +70 to +96 and incorporated an EcoRI site at the 5' end. The reverse primer was complementary to nucleotides +1264 to +1287 of the coding region and incorporated an XbaI site at the 3' end. Thirty cycles consisting of a 30 s melting step at 94°C, a 30 s annealing step at 55°C and a 2 min extension at 72°C were used. The resulting PCR product was digested by EcoRI and XbaI and cloned into the expression vector pPICZαA, digested by the same enzymes, generating plasmid pMMR23. Ten micrograms of linearized pMMR23 was electroporated into *P. pastoris*. Transformants were selected on YPDS plates supplemented with zeocine at 100 µg ml⁻¹. The production of r-gas4p placed under the control of the alcohol oxidase promoter in *P. pastoris* was obtained consecutively to the addition of 1% (v/v) methanol to the culture medium (Invitrogen manufacturer's instructions).

Enzymatic analysis of recombinant proteins

Culture filtrates were concentrated using Amicon Ultra Centrifugation Devices (Amicon) and dialysed against bind buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Then, they were incubated with Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen), loaded into an empty flow-through column and the flow through was discarded. The column was washed twice with wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) and the recombinant protein was eluted with elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) in four fractions, which were analysed by SDS-PAGE. r-gas4p was mainly eluted in fractions 2 and 3.

β-1,3-glucanase activity was analysed as described previously (Hartland *et al.*, 1996). Briefly, the purified protein were incubated at the concentrations of 0.06–0.08 mg ml⁻¹ with reduced laminariologosaccharides of various degrees of polymerization (8–14) in a 50 mM acetate buffer, pH 5.5, at 37°C. Sequential aliquots of 2.5 µl supplemented with 40 µl of 50 mM NaOH were analysed by HPAEC with a CarboPAC-PA1 column (Dionex 4.6 × 250 mm) as described previously (Hartland *et al.*, 1996).

Production of anti-gas4p antibodies

Specific anti-gas4p antibodies were generated by Biomedal (<http://www.biomedal.com/>). For the first immunization, 0.7 mg of r-gas4p (with complete Freund's adjuvant) was injected into a rabbit on day 0. Subsequent immunizations were performed injecting 0.4 mg of r-gas4p plus incomplete Freund's adjuvant on days +15, +28 and +42. Finally, the rabbit was killed on day +52, and 6.5 mg of polyclonal anti-gas4p antibody was purified.

Acknowledgements

We thank Dr Eva Pablo-Hernando for critical reading of the manuscript; Dr Pilar Pérez for kindly providing the antiactin ICN antibody and for help with cell wall fractionation experiments; Dr Scott Erdman for providing the Quantazyme; Dr Sergio Moreno for strains, and N. Skinner for language revision. This research was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (BFU2004-00778 and BFU2007-60390BMC) to C.V.-A. and from the European Community (LSHB-CT-2004-511952) to C.V.-A. and J.P.L. The author M.M. held a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- Arellano, M., Cartagena-Lirola, H., Nasser Hajibagheri, M.A., Durán, A., and Valdivieso, M.H. (2000) Proper ascospore maturation requires the *chs1⁺* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **35**: 79–89.
- Beach, D., Rodgers, L., and Gould, J. (1985) *ran1⁺* controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Curr Genet* **10**: 297–311.
- Blanco, M.A., Pelloquin, L., and Moreno, S. (2001) Fission yeast *mfr1* activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J Cell Sci* **114**: 2135–2143.

- Bush, D.A., Horisberger, M., Horman, I., and Wursch, P. (1974) The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol* **81**: 199–206.
- Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1997) *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1477–1489.
- Carotti, C., Ragni, E., Palomares, O., Fontaine, T., Tedeschi, G., Rodríguez, R., et al. (2004) Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanoyltransferase activity and folding. *Eur J Biochem* **271**: 3635–3645.
- Cortés, J.C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A., and Ribas, J.C. (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**: 157–174.
- Cortés, J.C., Ishiguro, J., Durán, A., and Ribas, J.C. (2002) Localization of the (1,3)- β -D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* **115**: 4081–4096.
- Egel, R. (2004) *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces Pombe*. Berlin: Springer.
- Fonzi, W.A. (1999) *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3- and β -1,6-glucans. *J Bacteriol* **181**: 7070–7079.
- Frieman, M.B., and Cormack, B.P. (2003) The ω -site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol* **50**: 883–896.
- García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T., and Sánchez, Y. (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.
- de Groot, P.W.J., Yuan Yin, Q., Weig, M., Sosinska, G.J., and Klis, F.M. (2007) Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **24**: 267–278.
- Hartland, R.P., Fontaine, T., Debeaupuis, J.P., Simenel, C., Delepierre, M., and Latgé, J.P. (1996) A novel β -(1-3)-glucanoyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **271**: 26843–26849.
- Hill, J., Donald, K.A., and Griffiths, D.E. (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* **19**: 5791.
- Hochstenbach, F., Klis, F.M., van den Ende, H., van Donseelaar, E., Peters, P.J., and Klausner, R.D. (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 Rouvet-Vauthey, M. (1985) Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* **41**: 748–750.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61–68.
- Ishiguro, J., Saitou, A., Durán, A., and Ribas, J.C. (1997) *cps1⁺*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *FKS* genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J Bacteriol* **179**: 7653–7662.
- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Dijkgraaf, G.J., and Klis, F.M. (1994) Identification of β -1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol* **65**: 402–407.
- Kippert, F., and Lloyd, D. (1995) The aniline blue fluorochrome specifically stains the septum of both live and fixed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEMS Microbiol Lett* **132**: 215–219.
- Koizumi, K., Kubota, Y., Tanimoto, T., and Okada, Y. (1989) High-performance anion-exchange chromatography of homogeneous D-gluco-oligosaccharides and -polysaccharides (polymerization degree greater than or equal to 50) with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr* **464**: 365–373.
- Le Goff, X., Woollard, A., and Simanis, V. (1999) Analysis of the *cps1* gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **262**: 163–172.
- Liu, J., Tang, X., Wang, H., and Balasubramanian, M. (2000) Bgs2p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **478**: 105–108.
- Liu, J., Wang, H., McCollum, D., and Balasubramanian, M.K. (1999) Drc1p/Cps1p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **153**: 1193–1203.
- Manners, D.J., and Meyer, M.T. (1977) The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydr Res* **57**: 189–203.
- Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A., and Sánchez, Y. (2003) Bgs3p, a putative 1,3- β -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **2**: 159–169.
- Martín, V., Ribas, J.C., Carnero, E., Durán, A., and Sánchez, Y. (2000) *bgs2⁺*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* **38**: 308–321.
- Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bahler, J. (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* **32**: 143–147.
- McLeod, M., and Beach, D. (1988) A specific inhibitor of the *ran1⁺* protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **332**: 509–514.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795–823.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., et al. (2000a) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**: 14882–14889.
- Mouyna, I., Hartland, R.P., Fontaine, T., Diaquin, M., Simenel, C., Delepierre, M., et al. (1998) A 1,3- β -glucanoyltransferase isolated from the cell wall of

- Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. *Microbiology* **144**: 3171–3180.
- Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B., and Latgé, J.P. (2000b) Identification of the catalytic residues of the first family of β (1-3) glucanotransferases identified in fungi. *Biochem J* **347**: 741–747.
- Osumi, M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**: 207–233.
- Papaleo, E., Fantucci, P., Vai, M., and De Gioia, L. (2006) Three-dimensional structure of the catalytic domain of the yeast β (1,3)-glucan transferase Gas1: a molecular modeling investigation. *J Mol Model* **12**: 237–248.
- Percival-Smith, A., and Segall, J. (1984) Isolation of DNA sequences preferentially expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4**: 142–150.
- Pérez, P., and Ribas, J.C. (2004) Cell wall analysis. *Methods* **33**: 245–251.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., and Vai, M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1* Δ mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 463–469.
- Popolo, L., and Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 385–400.
- Ragni, E., Coluccion, A., Rolli, E., Rodríguez-Peña, J.M., Colasante, G., Arroyo, J., et al. (2007a) GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **6**: 302–316.
- Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latgé, J.P., and Popolo, L. (2007b) The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* **24**: 297–308.
- Ram, A.F.J., Brekermans, S.S.C., Oehlen, L., and Klis, F.M. (1995) Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β -1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **358**: 165–170.
- Ram, A., Kapteyn, J., Montijn, R., Caro, L., Douwes, J.E., Baginsky, W., et al. (1998) Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of β -1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol* **180**: 1418–1424.
- Sipiczki, M., and Ferenczy, L. (1977) Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol Gen Genet* **151**: 77–81.
- Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259–265.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793–1808.
- Yamamoto, M., Imai, Y., and Watanabe, Y. (1997) Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Pringle, J.R., Broach, J.R., and Jones, E.W., (eds). Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1037–1106.

(XIII)-BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Aidroos, K. y Bussey, H.** (1978). Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can. J. Microbiol.* **24**: 228-237.
- Alfa, C. E., et al.** (1993). Antigen localization in fission yeast. *Methods Cell Biol.* **37**: 201-222.
- Alonso-Núñez, M. L., et al.** (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2003-2017.
- Amoah-Buahin, E., et al.** (2005). Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **4**: 1287-1297.
- Arellano, M., et al.** (2000). Proper ascospore maturation requires the *chs1+* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **35**: 79-89.
- Arellano, M., et al.** (1999). Rho GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. *Microsc. Res. Tech.* **47**: 51-60.
- Arellano, M., et al.** (1996). Rho1p GTPase activates the (1,3)- β -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J.* **15**: 4584-4591.
- Ausubel, F. M., et al. (1987).** *Current Protocols in Molecular Biology*: Greene Publishing Associates. Wiley-Interscience.
- Bähler, J., et al.** (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951.
- Baladron, V., et al.** (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.
- Balasubramanian, M., et al.** (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr. Biol.* **14**: R806-R818.
- Bardin, A. J. y Amon, A.** (2001). MEN and SIN: what's the difference? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 815-826.
- Barr, F. A. y Gruneberg, U.** (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* **131**: 847-860.
- Barr, K. A., et al.** (1994). Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharmaceutical Engineering* **12**: 48-51.
- Barral, P., et al.** (2005). An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochem. J.* **390**: 77-84.
- Basu, R. y Chang, F.** (2007). Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**: 88-94.
- Beach, D.** (1985). Sexual differentiation is controlled by a protein kinase encoded by the *ran1+* gene in fission yeast. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **50**: 635-641.
- Beach, D., et al.** (1985). *ran1+* controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Curr. Genet.* **10**: 297-311.
- Blad, S., et al.** (2001). Cell wall proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis*. P:17.
- Blanco, M. A., et al.** (2001). Fission yeast mfr1 activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J. Cell Sci.* **114**: 2135-2143.
- Bolam, D. N., et al.** (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem. J.* **331**: 775-781.

- Boone, C., et al.** (1990). *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall β -glucan assembly. *J. Cell Biol.* **110**: 1833-1843.
- Boraston, A. B., et al.** (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**: 769-781.
- 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**: 248-254.
- Briza, P., et al.** (1988). Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J. Biol. Chem.* **263**: 11569-11574.
- Brown, J. L., et al.** (1993). A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1,6)- β -glucan synthesis. *Genetics* **133**: 837-849.
- Brunner, D. y Nurse, P.** (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**: 695-704.
- Burgess, D. R. y Chang, F.** (2005). Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends Cell. Biol.* **15**: 156-162.
- Busch, K. E., et al.** (2004). Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev. Cell.* **6**: 831-843.
- Bush, D. A., et al.** (1974). The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* **81**: 199-206.
- Cabib, E., et al.** (1997). The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 200-204.
- Cabib, E., et al.** (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 307-333.
- Cabib, E. y Durán, A.** (2005). Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J. Biol. Chem.* **280**: 9170-9179.
- Cabib, E., et al.** (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**: 19679-19682.
- Cabib, E., et al.** (1992). Chitinase and chitin synthase I: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 97-102.
- Cadwell, R. C. y Joyce, G. F.** (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* **2**: 28-33.
- Caracuel, Z., et al.** (2005). *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative β -1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 1140-1147.
- Carnero, E., et al.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol. Gen. Genet.* **264**: 173-183.
- Caro, L. H., et al.** (1997). *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1477-1489.
- Carotti, C., et al.** (2004). Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. *Eur. J. Biochem.* **271**: 3635-3645.
- Cid, V. J., et al.** (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**: 345-386.
- Coluccio, A., et al.** (2004). Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **3**: 1464-1475.
- Conzelmann, A., et al.** (1988). A major 125-kd membrane glucoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J.* **7**: 2233-2240.

- Cortés, J. C.** (2005). Estudio de Bgs1p y Bgs4p: dos proteínas esenciales implicadas en la biosíntesis del $\beta(1,3)$ -D-glucano de *Schizosaccharomyces pombe*. En *Departamento de Microbiología y Genética* Salamanca: Universidad de Salamanca, pp. 166.
- Cortés, J. C., et al.** (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**: 157-174.
- Cortés, J. C., et al.** (2002). Localization of the (1,3) β -D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J. Cell Sci.* **115**: 4081-4096.
- Cortés, J. C., et al.** (2007). The (1,3) β -D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol. Microbiol.* **65**: 201-217.
- Coutinho, P. M. y Henrissat, B.** (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Vol. 1. H. J. Gilbert, et al. (eds). Cambridge: The Royal Society of Chemistry, pp. 3-12.
- Cregg, J. M., et al.** (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N. Y.)* **11**: 905-910.
- Chang, F.** (2001a). Establishment of a cellular axis in fission yeast. *Trends Genet.* **17**: 273-278.
- Chang, F.** (2001b). Studies in fission yeast on mechanisms of cell division site placement. *Cell Struct. Funct.* **26**: 539-544.
- Chang, F. y Nurse, P.** (1996). How fission yeast fission in the middle. *Cell* **84**: 194-198.
- Chang, F. y Peter, M.** (2003). Yeasts make their mark. *Nat. Cell. Biol.* **5**: 294-299.
- Chervitz, S. A., et al.** (1998). Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. *Science* **282**: 2022-2028.
- Christianson, T. W., et al.** (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**: 119-122.
- Chu, S., et al.** (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**: 699-705.
- Chuang, J. S. y Schekman, R. W.** (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p y Chs3p. *J. Cell Biol.* **135**: 597-610.
- d'Enfert, C., et al.** (1992). Fission yeast and a plant have functional homologues of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. *EMBO J.* **11**: 4025-4211.
- Daga, R. R., et al.** (2005). Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *EMBO J.* **24**: 2436-2446.
- Davey, J.** (1998). Fusion of a fission yeast. *Yeast* **14**: 1529-1566.
- Davies, G. J. y Henrissat, B.** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**: 853-859.
- de Groot, P. W. J., et al.** (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**: 781-796.
- de Groot, P. W. J., et al.** (2007). Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **24**: 267-278.
- de Medina-Redondo, M., et al.** (2008). The β -1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **68**: 1283-1299.
- Dekker, N., et al.** (2004). Role of the α -glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3903-3914.
- Denning, D.** (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**: 1142-1151.
- Díaz, M., et al.** (1993). The *Schizosaccharomyces pombe* *cwg2⁺* gene codes for the β subunit

- of a geranyltransferase type I required for β -glucan synthesis. *EMBO J.* **12**: 5245-5254.
- Douglas, C. M.** (2001). Fungal $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **39**: 55-66.
- Drgonova, J., et al.** (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* **272**: 277-279.
- Durán, A. y Pérez, P.** (2004). Cell wall synthesis. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Vol. 1. R. Egel (ed). New York: Springer, pp. 269-279.
- Durand, P., et al.** (1997). Active-site motifs of lysosomal acid hydrolases: invariant features of clan GH-Aglycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis. *Glycobiology* **7**: 277-284.
- Egel, R.** (2000). Fission yeast on the brink of meiosis. *BioEssays* **22**: 854-860.
- Egel, R.** (2004). *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Berlín: Springer.
- Ellis, S. B., et al.** (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1111-1121.
- Fast, D.** (1973). Sporulation synchrony of *Saccharomyces cerevisiae* grown in various carbon sources. *J. Bacteriol.* **116**: 925-930.
- Feierbach, B. y Chang, F.** (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr. Biol.* **11**: 1656-1665.
- Feierbach, B., et al.** (2004). Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J. Cell Biol.* **165**: 697-707.
- Fernández, F., et al.** (1996). A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *EMBO J.* **15**: 705-713.
- Fischer, R., et al.** (2008). Polarized growth in fungi - interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol. Microbiol.* **68**: 813-826.
- Fleet, G. H.** (1991). Cell walls. In *The Yeast*. A. H. Rose y J. S. Harrison (eds). San Diego: Academic Press, pp. 199-277.
- Fontaine, T., et al.** (1997). Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Biochem.* **243**: 315-321.
- Fonzi, W. A.** (1999). *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3- and β -1,6-glucans. *J. Bacteriol.* **181**: 7070-7079.
- Frieman, M. B. y Cormack, B. P.** (2003). The ω -site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol. Microbiol.* **50**: 883-896.
- Frieman, M. B. y Cormack, B. P.** (2004). Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**: 3105-3114.
- Gaboriaud, C., et al.** (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* **224**: 149-155.
- García, I.** (2006). Caracterización de genes implicados en la biosíntesis de $\alpha(1,3)$ -glucano en *Schizosaccharomyces pombe*. En *Departamento de Microbiología y Genética* Salamanca: Universidad de Salamanca, pp. 147.
- García, I., et al.** (2005). The α -glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol. Cell* **97**: 569-576.
- García, I., et al.** (2006a). 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.

- García, P., et al.** (2006b). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* **23**: 1031-1043.
- Gawronski, M., et al.** (1999). Microfibrillar structure of PPG-glucan in aqueous solution as triple-helix aggregates by small angle X-ray scattering. *Biopolymers* **50**: 569-578.
- Gemmill, T. R. y Trimble, R. B.** (2004). Protein glycosilation. En *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. Vol. 1. R. Egel (ed). New York: Springer, pp. 405-415.
- Georgopapadakou, N. H.** (1998). Antifungal: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr. Opin. Microbiol* **1**: 547-557.
- Georgopapadakou, N. H. y Tkacz, J. S.** (1995). The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.* **3**: 98-104.
- Georgopapadakou, N. H. y Walsh, T.** (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 279-291.
- Goldman, R. C., et al.** (1995). Kinetics of β -1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *Eur. J. Biochem.* **227**: 372-378.
- Golub, E. I.** (1988). 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1641.
- Goode, B. L. y Eck, M. J.** (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 593-627.
- Gould, K. L. y Simanis, V.** (1997). The control of septum formation in fission yeast. *Genes Dev.* **11**: 1939-1951.
- Grinna, L. S. y Tschopp, J. F.** (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**: 107-115.
- Grün, C. H., et al.** (2005). The structure of cell wall α -glucan from fission yeast. *Glycobiology* **15**: 245-257.
- Guertin, D. A., et al.** (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 155-178.
- Güldener, U., et al.** (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2519-2524.
- Hagan, I. M.** (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **111**: 1603-1612.
- Hamada, K., et al.** (1998). Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 26946-26953.
- Hartland, R. P., et al.** (1996). A novel β -(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **271**: 26843-26849.
- Hayles, J. y Nurse, P.** (2001). A journey into space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 647-656.
- Heckman, D. S., et al.** (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**: 1129-1133.
- Henrissat, B. y Bairoch, A.** (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695-696.
- Henrissat, B. y Davies, G. J.** (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 637-644.
- Henrissat, B. y Davies, G. J.** (2000). Glycosyde hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules and implications for genomics. *Plant Physiol.* **124**: 1515-1519.
- Hill, J., et al.** (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5791.
- Hirano, T., et al.** (1986). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe cut* mutants that block nuclear division but not cytokinesis. *EMBO J.* **5**: 2973-2979.
-

- Hochstenbach, F., et al.** (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.
- Holmes, D. S. y Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Horisberger, M. y Rouvet-Vauthey** (1985). Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* **41**: 748-750.
- Horisberger, M. y Vonlanthen, M.** (1977). Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeast with gold markers. *Arch. Mikrobiol.* **115**: 1-7.
- Horisberger, M., et al.** (1978). Localization of α -galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Microbiol.* **119**: 107-111.
- Horton, R. M., et al.** (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-68.
- Huecas, S., et al.** (2001). Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3- β -glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J. Biol. Chem.* **276**: 27959-27966.
- Humbel, B. M., et al.** (2001). *In situ* localization of β -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**: 433-444.
- Hyams, J. S.** (2005). Cytokinesis: the great divide. *Trends Cell. Biol.* **15**.
- Inoue, S. B., et al.** (1996). Signaling toward yeast 1,3- β -glucan synthesis. *Cell Struct. Funct.* **21**: 395-402.
- Ishiguro, J.** (1998). Genetic control of fission yeast cell wall synthesis: the genes involved in wall biogenesis and their interactions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Genet. Syst.* **73**: 181-191.
- Ishiguro, J., et al.** (1997). *cps1⁺*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J. Bacteriol.* **179**: 7653-7662.
- Ishijima, S. A., et al.** (1999). Ultrastructure of cell wall of the *cps8* actin mutant cell in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 31-37.
- Ito, H., et al.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Jiménez Ortigosa, C.** (2008). Caracterización de las quitín-sintasas de la familia II en el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*. En *Microbiología y Genética* Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Johnston, M.** (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**: 458-476.
- Kalebina, T. S., et al.** (2002). Correct GPI-anchor synthesis is required for the incorporation of endoglucanase/glucanosyltransferase Bgl2p into the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 81-85.
- Kapteyn, J. C., et al.** (1999a). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 373-383.
- Kapteyn, J. C., et al.** (1999b). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β -1,6-glucan-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* **31**: 1835-1844.
- Katayama, S., et al.** (1999). Fission yeast α -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of Protein Kinase C function. *J. Cell Biol.* **144**: 1173-1186.

- Kelly, M., et al.** (1988). Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J.* **7**: 1537-1547.
- Kippert, F. y Lloyd, D.** (1995). The aniline blue fluorochrome specifically stains the septum of both live and fixed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 215-219.
- Kitamura, K., et al.** (2001). Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 kinase inhibits sexual differentiation via ubiquitin proteolysis and 14-3-3 protein in fission yeast. *Dev. Cell.* **1**: 389-399.
- Klis, F. M.** (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869.
- Klis, F. M., et al.** (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185-202.
- Klis, F. M., et al.** (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 239-256.
- Kobori, H., et al.** (1989). Actin is associated with the formation of the cell wall in reverting protoplasts of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **94**: 635-646.
- Koizumi, K., et al.** (1989). High-performance anion-exchange chromatography of homogeneous D-gluco-oligosaccharides and -polysaccharides (polymerization degree greater than or equal to 50) with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **464**: 365-373.
- Konomi, M., et al.** (2003). Characterization and behaviour of α -glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast* **20**: 427-438.
- Kopecká, M., et al.** (1995). Ultrastructure of the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe* following treatment with various glucanases. *J. Struct. Biol.* **114**: 140-152.
- Koutz, P., et al.** (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* **5**: 167-177.
- Krapp, A., et al.** (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* septation initiation network (SIN) is required for spore formation in meiosis. *J. Cell Sci.* **119**: 2882-2891.
- Krapp, A., et al.** (2004). SIN and the art of splitting the fission yeast cell. *Curr. Biol.* **14**: R722-730.
- Kucsera, J., et al.** (2000). Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J. Microbiol. Methods* **41**: 19-21.
- 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., et al.** (2006). Fission yeast cytoskeletons and cell polarity factors: connecting at the cortex. *Biol. Cell* **98**: 619-631.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Latgé, J. P.** (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**: 279-290.
- Le Goff, X., et al.** (1999). Controlling septation in fission yeast: finding the middle, and timing it right. *Curr. Genet.* **35**: 571-584.
- Lesage, G. y Bussey, H.** (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 317-343.
- Leupold, U.** (1950). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Compt Rend Lab Carlsberg, Sér. Physiol.* **24**: 381-480.
- Levin, D. E.** (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 262-291.
- Li, P. y McLeod, M.** (1996). Molecular mimicry in development: Identification of *ste11⁺* as a substrate and *mei3⁺* as a pseudosubstrate inhibitor of *ran1⁺* kinase. *Cell* **87**: 869-880.

- Lipke, P. N. y Ovalle, R.** (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**: 3735-3740.
- Liu, J. y Balasubramanian, M. K.** (2001). 1,3- β -Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **1**: 159-169.
- Liu, J., et al.** (2000a). Bgs2p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **478**: 105-108.
- Liu, J., et al.** (2002). The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the Septation-Inducing Network in *S. pombe*. *Mol. Biol. Cell* **13**: 989-1000.
- Liu, J., et al.** (2000b). A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **113**: 1223-1230.
- Liu, J., et al.** (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **153**: 1193-1203.
- Lussier, M., et al.** (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435-450.
- Magnelli, P. E., et al.** (2005). A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Anal. Biochem.* **336**: 202-212.
- Manners, D. J. y Meyer, M. T.** (1977). The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydr. Res.* **57**: 189-203.
- Martín-Cuadrado, A. B., et al.** (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., et al.** (2008a). The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol. Microbiol.* doi: **10.1111/j.1365.2985.2008.06275.x**.
- Martín-Cuadrado, A. B., et al.** (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** 542-553.
- Martín-Cuadrado, A. B., et al.** (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.
- Martín-García, R., et al.** (2003). In *Schizosaccharomyces pombe* chs2p has no chitin synthase activity but is related to septum formation. *FEBS Lett.* **549**: 176-180.
- Martín-García, R. y Valdivieso, M. H.** (2006). The fission yeast Chs2 protein interacts with the type-II myosin Myo3p and is required for the integrity of the actomyosin ring. *J. Cell Sci.* **119**: 2768-2779.
- Martin, S. G. y Chang, F.** (2005). New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle* **4**: 1046-1049.
- Martin, S. G., et al.** (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev. Cell.* **8**: 479-491.
- Martín, V.** (2002). Caracterización estructural y funcional de los genes *bgs2⁺* y *bgs3⁺* de *Schizosaccharomyces pombe*. En *Departamento de Microbiología y Genética* Salamanca: Universidad de Salamanca, pp. 168.
- Martín, V., et al.** (2003). Bgs3p, a putative 1,3- β -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **2**: 159-169.
- Martín, V., et al.** (2000). *bgs2⁺*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol. Microbiol.* **38**: 308-321.

- Mata, J., et al.** (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat. Genet.* **32**: 143-147.
- Mata, J. y Nurse, P.** (1998). Discovering the poles in yeast. *Trends Cell. Biol.* **8**: 163-167.
- Matsuo, Y., et al.** (2004a). Chr4, a *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* Chs4p/Skt5p protein, is related to septum formation and is required for the proper localization of Chs2. *Yeast* **21**: 005-1019.
- Matsuo, Y., et al.** (2005). *cda1*⁺, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **579**: 2737-2274.
- Matsuo, Y., et al.** (2004b). Genetic analysis of *chs1*⁺ and *chs2*⁺ encoding cHitin syntases from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 1489-1499.
- Mazur, P., et al.** (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- β -D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5671-5681.
- McCarter, J. D. y Withers, S. G.** (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 885-892.
- McCollum, D. y Gould, K. L.** (2001). Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell. Biol.* **11**: 89-95.
- McLeod, M. y Beach, D.** (1988). A specific inhibitor of the *ran1*⁺ protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **332**: 509-514.
- Mitchison, J. M. y Creanor, J.** (1971). Induction synchrony in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp. Cell Res.* **67**: 368-374.
- Moreno, S., et al.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**: 795-823.
- Moseley, J. B. y Goode, B. L.** (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 605-645.
- Mouyna, I., et al.** (2000a). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**: 14882-14889.
- Mouyna, I., et al.** (1998). A 1,3- β -glucanoyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. *Microbiology* **144**: 3171-3180.
- Mouyna, I., et al.** (2000b). Identification of the catalytic residues of the first family of β (1-3) glucanoyltransferases identified in fungi. *Biochem. J.* **347 Pt 3**: 741-747.
- Mouyna, I., et al.** (2005). Deletion of *GEL2* encoding for a β (1-3)glucanoyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **56**: 1675-1688.
- Mrsa, V., et al.** (1993). Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. *J. Bacteriol.* **175**: 2102-2106.
- Nakamura-Kubo, M., et al.** (2003). The fission yeast *spo14*⁺ gene encoding a functional homologue of budding yeast Sec12 is required for the development of forespore membranes. *Mol. Biol. Cell* **14**: 1109-1124.
- Nakamura, T., et al.** (2004). ADAM family protein Mde10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **3**: 27-39.
- Nakamura, T., et al.** (2005). A fission yeast SNAP-25 homologue, SpSec9, is essential for cytokinesis and sporulation. *Cell Struct. Funct.* **30**: 15-24.
- Nakamura, T., et al.** (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* *spo3*⁺ gene is required for assembly of the forespore membrana and genetically interacts with *psy1*⁺

- encoding syntaxin-like protein. *Mol. Biol. Cell* **12**: 3955-3972.
- Nakase, Y., et al.** (2001). *Schizosaccharomyces pombe spo20⁺* gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Sec14 plays an important role in forespore membrane formation. *Mol. Biol. Cell* **12**: 901-917.
- Niccoli, T. y Nurse, P.** (2002). Different mechanisms of cell polarisation in vegetative and shmooing growth in fission yeast. *J. Cell Sci.* **115**: 1651-1662.
- Nuoffer, C., et al.** (1993). Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 10558-10563.
- Nuoffer, C., et al.** (1991). Determinants for glycopospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 27-37.
- Nurse, P.** (2002). The Nobel Prize and beyond: an interview with Sir Paul Nurse. Interview by Susan R. Owens. *EMBO Rep.* **3**: 204-206.
- Odds, F., et al.** (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**: 272-279.
- Orlean, P.** (1997). Biogenesis of yeast wall and surface components. En *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. J. R. Pringle, et al. (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 229-362.
- Osumi, M., et al.** (1998). Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet. Biol.* **24**: 176-206.
- Papaleo, E., et al.** (2006). Three-dimensional structure of the catalytic domain of the yeast β -(1,3)-glucan transferase Gas1: a molecular modeling investigation. *J. Mol. Model.* **12**: 237-248.
- Pardo, M., et al.** (1999). Two dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**: 459-472.
- Park, H. O. y Bi, E.** (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 48-96.
- Pelham, R. J., Jr. y Chang, F.** (2001). Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Cell. Biol.* **3**: 235-244.
- Pérez, P. y Ribas, J. C.** (2004). Cell wall analysis. *Methods* **33**: 245-251.
- Petersen, J., et al.** (1998a). Conjugation in *S. pombe*: identification of a microtubule-organising centre, a requirement for microtubules and a role for Mad2. *Curr. Biol.* **8**: 963-966.
- Petersen, J., et al.** (1998b). F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **111**: 867-876.
- Petersen, J., et al.** (1998c). FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J. Cell Biol.* **141**: 1217-1228.
- Petersen, J., et al.** (1995). Characterization of fus1 of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol. Cell. Biochem.* **15**: 3697-3707.
- Pittet, M. y Conzelmann, A.** (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**: 405-420.
- Pollard, T. D.** (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**: 451-477.
- Poole, R. K. y Lloyd, D.** (1973). Effect of 2-deoxy-D-glucose on growth and cell walls of *Schizosaccharomyces pombe* 97 h. *Arch. Mikrobiol.* **88**: 257-272.

- Popolo, L. y Alberghina, L.** (1984). Identification of a labile protein involved in the G1-to-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 120-124.
- Popolo, L., et al.** (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 463-469.
- Popolo, L., et al.** (2008). Disulfide bond structure and domain organization of the yeast β (1,3)-glucanosyltransferases involved in cell wall biogenesis. *J. Biol. Chem.* doi: [10.1074/jbc.M801562200](https://doi.org/10.1074/jbc.M801562200).
- Popolo, L. y Vai, M.** (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 385-400.
- Popolo, L., et al.** (1986). Identification of a glycoprotein involved in cell cycle progression in yeast. *J. Biol. Chem.* **261**: 3479-3482.
- Pringle, J. R.** (1991). Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* **194**: 732-735.
- Ragni, E., et al.** (2007a). GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **6**: 302-316.
- Ragni, E., et al.** (2007b). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* **24**: 297-308.
- Rajagopalan, S., et al.** (2003). Cytokinesis in fission yeast: a story of rings, rafts and walls. *Trends Genet.* **19**: 403-408.
- Ram, A. F., et al.** (1995). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β -1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**: 165-170.
- Ram, A. F., et al.** (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of β -1,3-glucan into the medium and induces a compensarion mechanism to ensure cell wall integrity. *J. Bacteriol.* **180**: 1418-1424.
- Ram, A. F. J., et al.** (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**: 1019-1030.
- Ribar, B., et al.** (1997). *sep1⁺* encodes a transcription-factor homologue of the HNF-3/forkhead DNA-binding-domain family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **202**: 1-5.
- Ribar, B., et al.** (1999). Deletion of the *sep1⁺* forkhead transcription factor homologue is not lethal but causes hyphal growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 465-474.
- Roh, D. H., et al.** (2002). Rho1p mutations specific for regulation of β -1,3-glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Mol. Microbiol.* **44**: 1167-1183.
- Roncero, C.** (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* **41**: 367-378.
- Rothstein, R.** (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* **194**: 281-301.
- Rudolph, R. y Lilie, H.** (1996). *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**: 49-56.
- Rustici, G., et al.** (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat. Genet.* **36**: 809-817.
- Sambrook, J., et al.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sambrook, J. y Russell, D. W.,** (eds) (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samejima, I., et al.** (1993). Identification of seven new *cut* genes involved in *Schizosaccharomyces pombe* mitosis. *J. Cell Sci.* **105**: 135-143.

- Santos, B., et al.** (2005). rho4p GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot. Cell* **4**: 1639-1645.
- Sarthy, A. V., et al.** (1997). Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the *BGL2* gene encoding a 1,3- β -glucosyltransferase. *Microbiology* **143**: 367-376.
- Scorer, C. A., et al.** (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **136**: 111-119.
- Shahinian, S. y Bussey, H.** (2000). β -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 477-489.
- Shaw, J. A., et al.** (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **114**: 111-123.
- Sherman, F., et al.** (1986). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Shimoda, C.** (2004). Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J. Cell Sci.* **117**: 389-396.
- Shimoda, C. y Nakamura, T.** (2004). Control of late meiosis and ascospore formation. En *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Vol. 1. R. Egel (ed). New York: Springer, pp. 311-327.
- Shimono, K., et al.** (2002). Functional expression of chitinase and chitosanase, and their effects on morphologies in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1143-1147.
- Sietsma, J. H. y Wessels, J. G. H.** (1990). The occurrence of glucosaminoglycan in the wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2261-2265.
- Sipiczki, M.** (1995). Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. *Antonie Van Leeuwenhoek* **68**: 119-149.
- Sipiczki, M.** (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* **1**: 1011.1011-1011.1014.
- Sipiczki, M. y Ferenczy, L.** (1977). Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol. Gen. Genet.* **151**: 77-81.
- Smits, G. J., et al.** (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.
- Snaith, H. A. y Sawin, K. E.** (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**: 647-651.
- Southall, S. M., et al.** (1999). The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.* **447**: 58-60.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stam, M. R., et al.** (2005). Evolutionary and mechanistic relationships between glycosidases acting on α - and β - bonds. *Carbohydr. Res.* **340**: 2728-2734.
- Strahl-Bolsinger, S., et al.** (1999). Protein O-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 297-307.
- Stratford, M.** (1994). Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast* **10**: 1741-1752.
- Sugawara, T., et al.** (2003). *In situ* localization of cell wall α -1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.
- Sugawara, T., et al.** (2004). Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **339**: 2255-2265.
- Takeda, T., et al.** (2004). Organization of a sterol-rich membrane domain by cdc15p during

- cytokinesis in fission yeast. *Nat. Cell. Biol.* **6**: 1142-1144.
- Tanaka, K. y Hirata, A.** (1982). Ascospore development in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*. *J. Cell Sci.* **56**: 263-279.
- Tomme, P., et al.** (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 1-81
- Tougan, T., et al.** (2002). Meu10 is required for spore wall maturation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **7**: 217-231.
- Tschopp, J. F., et al.** (1987a). Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 3859-3876.
- Tschopp, J. F., et al.** (1987b). High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N. Y.)* **5**: 1305-1308.
- Turchini, A., et al.** (2000). Increase of external osmolarity reduces morphogenetic defects and accumulation of chitin in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **182**: 167-171.
- Umeda, K., et al.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe gmd3⁺alg11⁺* is a functional homologue of *Saccharomyces cerevisiae* *ALG11* which is involved in N-linked oligosaccharide synthesis. *Yeast* **16**: 1261-1271.
- Vai, M., et al.** (1991). Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycopropholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* **266**: 2242-12248.
- Valdivieso, M. H., et al.** (2004). Chitin biosynthesis and morphogenetics processes. En *The Mycota III biochemistry and molecular biology*. R. Brambl y A. Marzluf (eds). Berlin-Heidelberg: Singer Verlag.
- Valdivieso, M. H., et al.** (2000). Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **182**: 4752-4757.
- Vanoni, M. A., et al.** (1994). Interdomain loops and conformational changes of glutamate synthase as detected by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **226**: 505-515.
- Vavylonis, D., et al.** (2008). Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science* **319**: 97-100.
- Verde, F.** (1998). On growth and form: control of cell morphogenesis in fission yeast. *Curr. Opin. Microbiol* **1**: 712-718.
- Vink, E., et al.** (2004). An in vitro assay for (1,6)- β -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 1121-1131.
- Vos, A., et al.** (2007). Role of the synthase domain of Ags1p in cell wall α -glucan biosynthesis in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **282**: 18969-18979.
- Wach, A.** (1996). PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259-265.
- Wach, A., et al.** (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Wachtler, V., et al.** (2003). Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **116**: 867-874.
- Watanabe, R., et al.** (2002). Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**: 49538-49544.
- Watanabe, Y., et al.** (1997). Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* **386**: 187-190.
- White, A.-M. y Rose, D. R.** (1997). Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 645-651.
- Willer, T., et al.** (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and

- viability in fission yeast. *Mol. Microbiol.* **57**: 156-170.
- Winzler, E. A., et al.** (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**.
- Wolfe, B. A. y Gould, K. L.** (2003). Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol.* **15**: 10-18.
- Wood, V., et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-880.
- Wu, J. Q., et al.** (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev. Cell.* **5**: 723-734.
- Wu, J. Q., et al.** (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J. Cell Biol.* **174**: 391-402.
- Xu, X., et al.** (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *J. Biol. Chem.* **276**: 33540-33546.
- Yamamoto, M.** (1996). Regulation of meiosis in fission yeast. *Cell Struct. Funct.* **21**: 431-436.
- Yamamoto, M.** (2004). Initiation of meiosis. En *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Vol. 1. R. Egel (ed). New York: Springer, pp. 297-309.
- Yanagida, M.** (2002). The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* **3**: comment 1-4.
- Yin, Q. Y., et al.** (2005). Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Biol. Chem.* **280**: 20894-20901.
- Yoo, B., et al.** (1973). Ultrastructural changes of the fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) during ascospore formation. *Arch. Mikrobiol.* **91**: 1-10.
-