

**"Análisis del ensamble de nanodominios de membrana
plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*"**

Tesista:

Agustina Olivera-Couto

Director de Tesis:

Pablo S. Aguilar

Tribunal:

Luis Gonzales Flecha (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET, Argentina),

Ana Denicola (Facultad de Ciencias, UdeLaR-PEDECIBA, Uruguay)

*Otto Pritsch (Facultad de Medicina, UdeLaR-PEDECIBA e Institut Pasteur de Montevideo,
Uruguay)*

Institut Pasteur de Montevideo.

*Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (Universidad de la República y Ministerio de
Educación y Cultura).*

Julio del 2016

Montevideo, Uruguay

Índice:

i. Resumen

ii. Agradecimientos

1. Introducción:

1.1. Membranas biológicas, composición y organización en dominios

1.2. Composición bioquímica y estructural de las membranas biológicas

1.2.1. Composición bioquímica de la membrana plasmática

1.2.1.a. Glicerofosfolípidos

1.2.1.b. Esteroles

1.2.1.c. Esfingolípidos

1.2.1.d. Proteínas transmembrana

1.2.1.e. Proteínas asociadas a membrana

1.2.2. Modelos de la estructura de la membrana plasmática

1.3. Organización lateral de la membrana plasmática en dominios

1.4. *Saccharomyces cerevisiae*, eisosomas y organización de la membrana plasmática

1.4.1 Dominios eisosomales

1.4.2 Composición bioquímica

1.4.2.a Proteínas estructurales

1.4.2.b Proteínas asociadas a membrana

1.4.2.c Proteínas integrales de membrana

1.4.2.d Lípidos

1.4.3 Estructura eisosomal

1.4.4 Formación y mantenimiento de los dominios eisosomales

1.4.5 Funciones celulares asociadas a los dominios eisosomales

1.4.6. Funciones moleculares de los eisosomas.

1.5 Conservación de los dominios eisosomales en otras especies.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

2.2. Objetivos específicos:

3. Materiales, Métodos y Resultados

Trabajo publicado 2011

3.1. Bases moleculares de la formación de eisosomas.

3.1.1- Realización de inferencia bioinformática de dominios proteicos con función molecular conocida para las diferentes proteínas eisosomales.

3.1.2- Corroboración experimental (mediante metodologías de bioquímica, biología molecular y biología celular; tanto *in vivo* como *in vitro*) de la existencia de los dominios BAR en Pil1p y Lsp1p, así como determinación de su función molecular.

3.2. Bases moleculares del mecanismo de generación de dominios de membrana dependiente de eisosomas.

3.2.1- Caracterización experimental de la importancia de los dominios BAR, en el contexto de la biología celular de los eisosomas.

Trabajo publicado 2015

3.3. Dinámica molecular, cantidades totales, grado de oligomerización y concentración de las proteínas Pil1p y Lsp1p solubles en el citoplasma.

3.4. Cinética de ensamblado de Pil1p en eisosomas.

3.5. Papel que desempeña Lsp1p en el ensamblado de Pil1p en eisosomas.

4. Discusión

4.1 Función molecular de Pil1p y Lsp1p en relación a la estructura eisosomal:

4.2 La subunidad estructural básica de los eisosomas

4.3 Concentración y agregación proteica

4.4 Dinámica proteica eisosomal:

4.5 Modelo de trabajo y futuras direcciones:

Anexo 1: Materiales y Métodos

Anexo 2: Conservación de los dominios eisosomales en otras especies.

Trabajo publicado 2012

Candida albicans

Aspergillus nidulans

Ashbya gossypii

Schizosaccharomyces pombe

5. Bibliografía:

i. Resumen:

Los eisosomas son nanodominios de membrana plasmática donde lípidos, proteínas transportadoras de nutrientes y moléculas de señalización se concentran. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, estos dominios son estructurados por polímeros proteicos compuestos principalmente por dos proteínas citoplasmáticas, asociadas a membrana plasmática, Pil1p y Lsp1p. Los eisosomas son nanodominios que observados mediante microscopía confocal de fluorescencia son inmóviles, tienen un tamaño relativamente uniforme, y están distribuidos en toda la membrana plasmática.

En el presente proyecto doctoral se planteó como objetivo general caracterizar cinética y cuantitativamente el proceso de ensamblado y mantenimiento de los nanodominios eisosomales *in vivo*.

Un primer análisis bioinformático con posterior corroboración bioquímica demostró que Pil1p y Lsp1p, los principales componentes proteicos de los eisosomas, son proteínas de tipo BAR capaces de formar auto-ensambles que se unen a membranas modificando su curvatura tanto *in vivo* como *in vitro*. También se mostró la importancia de estas propiedades modificadoras de la curvatura de membrana en relación a la generación y organización de los dominios de la membrana de *S. cerevisiae* (Olivera-Couto & Aguilar, 2012; Olivera-Couto et al, 2011).

Posteriormente, se utilizaron métodos de análisis de la fluctuación de la fluorescencia para determinar la dinámica molecular de dichas proteínas en diferentes localizaciones subcelulares. Usando una combinación de técnicas de correlación de la señal fluorescente, se demostró que Pil1p y Lsp1p difunden libremente en el citoplasma celular, mientras que existe una fracción proteica que interacciona dinámicamente con los eisosomas y la cual exhibió una dinámica molecular lenta propia de un equilibrio de unión-disociación. Aplicando la técnica de N&B (“Number and Brightness analysis”, en inglés) se mostró que la fracción asociada a eisosomas era oligomérica, mientras la citoplasmática tenía estados de agregación menores. Finalmente, el análisis del fenómeno de FRET (“Förster Resonance Energy Transfer”, en inglés)

midiendo cambios en la vida media de los fluoróforos permitió determinar que Pil1p y Lsp1p interactúan directamente en el citoplasma y dentro de los eisosomas. Estos resultados apoyan un modelo donde heterodímeros Pil1p-Lsp1p son las unidad composicional básica de los eisosomas. Por otra parte, el análisis de eisosomas individuales mostró que existen dos estados eisosomales dentro de una célula: mientras que aproximadamente la mitad de los eisosomas son estáticos, la otra mitad están intercambiando activamente subunidades con la fracción proteica libre en el citoplasma (Olivera-Couto et al, 2015).

ii. Agradecimientos:

Esta tesis de doctorado fue realizada en mayor medida en el Institut Pasteur de Montevideo y en la Universidad de California Irvine. Indudablemente no hubiera sido posible sacarla adelante sin la colaboración de una gran cantidad de instituciones, grupos de investigación y personas. Por esto quiero agradecer profundamente a:

Al Instituto Pasteur, la Universidad de la República, el programa de postgrados PEDECIBA, la Universidad de California Irvine, la IUBMB, ASBMB y el Journal of Cell Biology quienes permitieron que este trabajo se realizara apoyándonos económicamente en todo momento.

A los profesores Luis Gonzales Flecha (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET, Argentina), Ana Denicola (Facultad de Ciencias, UdeLaR-PEDECIBA, Uruguay) y Otto Pritsch (Facultad de Medicina, UdeLaR-PEDECIBA e Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay), por haber aceptado gentilmente formar parte del tribunal de la presente tesis.

Pablo Aguilar y Arlinet Kierbel quienes dirigieron el laboratorio de biología Celular de Membranas y fueron quienes hicieron posible en primer instancia que este proyecto fuera realizado. En particular a Pablo quien fue el orientador y tutor científico de la tesis y el cual siguió de cerca cada paso y cada

experimento de la tesis dándole un nivel de exigencia imprescindible para aprender y superarse día a día.

Al profesor Enrico Gratton quien me instruyó en todas las metodologías de microscopía de fluctuación de la fluorescencia y FLIM y quien me abrió gentilmente las puertas de un gran laboratorio y grupo de trabajo. Y a todo su grupo de técnicos y estudiantes quienes hicieron posible que mis estadías en Irvine fueran fructíferas y muy disfrutables.

A las unidades tecnológicas del Institut Pasteur de Montevideo y sus responsables y técnicos que me instruyeron en una variedad de metodologías, colaboraron con mis experimentos y siempre estuvieron disponibles para darme una mano incondicional. En particular a los miembros de la Unidad de Biología Celular, Unidad de Proteínas Recombinantes, Unidad de Bioinformática, Unidad de Biofísica de Proteínas y a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas.

Al grupo de la profesora Ana Denicola en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, que hicieron posible el trabajo con liposomas. Al grupo de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Facultad de Ciencias, que nos brindaron los servicios de Microscopía Electrónica.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Celular de Membranas y del grupo del profesor José Badano los cuales que en forma totalmente altruista colaboraron con todos los experimentos realizados dándome una ayuda imprescindible para salir adelante.

Y a mi familia que me permitió estudiar y aprender todas estas herramientas que me han permitido disfrutar de la biología y soñar con nuevos proyectos.

1. Introducción:

1.1. Membranas biológicas, composición y organización en dominios

La compartimentalización de reacciones químicas en sistemas biológicos es un fenómeno ampliamente observado en la naturaleza. Algunos autores sostienen que el inicio de la vida se basó en sistemas de compartimentalización que englobaban reacciones químicas autocatalíticas y sistemas de contenido de información (Scharf et al, 2015). Estos autores sostienen que la compartimentalización a lo largo de la evolución ha permitido llegar a niveles mayores de auto-organización y por lo tanto de complejidad (aunque aún no hay consenso en este tema) (Scharf et al, 2015).

En células eucariotas, la compartimentalización de reacciones químicas se lleva a cabo principalmente en organelos limitados por membranas biológicas. A modo de ejemplo, se puede nombrar la glicólisis como un grupo de reacciones que ocurren en el citoplasma; mientras que el ciclo de Krebs es un grupo de reacciones que ocurre dentro de la mitocondria. Además de posibilitar la separación de distintos procesos dentro de la célula, las membranas en sí mismas se encuentran altamente organizadas, en grupos o “clusters” de moléculas que separan distintos grupos de reacciones y actividades celulares. Dichos “clusters” son actualmente llamados dominios de membrana.

Dentro de la célula eucariota las membranas biológicas participan por ejemplo de:

- la síntesis de lípidos y proteínas,
- la generación de un sistema de transporte de membranas y proteínas hacia la membrana plasmática,
- y de la generación de energía en forma de ATP, entre otras.

Un tipo particular de membrana biológica es la membrana plasmática, la cual es imprescindible para delimitar todo tipo de células (eucariotas, arqueas y procariotas) respecto al entorno que las rodea, siendo así esencial para la existencia de la vida en si misma.

Las membranas plasmáticas no solo delimitan la unidad básica de la vida sino que son un organelo en si mismas, llevando a cabo múltiples funciones fundamentales en la fisiología celular. Podemos nombrar algunos ejemplos de funciones residentes en las mismas como ser:

- el transporte de moléculas tanto pasivo como activo, destacando la internalización de micronutrientes y la secreción de desechos y de proteínas,
- el mantenimiento de gradientes electroquímicos con múltiples roles en la fisiología celular como ser comunicación mediante señales electroquímicas o movimiento de estructuras como ser el flagelo en algunas bacterias,
- la emisión y recepción de señales, así como la transducción de las mismas hacia interior celular como base de la comunicación con su entorno y células vecinas (Alberts et al, 2007).

La realización de estas y más funciones esta directamente correlacionada con la compleja composición bioquímica de las membranas. Además dicha composición debe ser constantemente ajustada tanto en forma espacial (es decir en las diferentes regiones laterales de la membrana) así como en forma temporal (en respuesta al deterioro funcional de lípidos y proteínas así como a cambios fisicoquímicos tanto intra como extracelulares). Por lo tanto, entender la composición de las membranas así como su dinámica espacial y temporal resulta esencial para poder comprender las funciones celulares de las mismas.

En la introducción teórica a la presente tesis doctoral, se profundizará en la composición, estructura y dinámica de las membranas biológicas de células eucariotas haciendo especial énfasis en la membrana plasmática. Luego se

focalizará en los mecanismos que permiten que las diferentes moléculas que componen la membrana plasmática estén organizadas en forma lateral. Finalmente se desarrollará el caso particular de la membrana plasmática de un organismo modelo eucariota unicelular, la levadura del pan y la cerveza *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2. Composición bioquímica y estructural de las membranas biológicas

El estudio de la composición y la estructura de las membranas biológicas ha sido fundamental para así poder entender como las diferentes funciones de las mismas son realizadas y reguladas. En cuanto a la composición molecular de las diferentes membranas es importante destacar que hay grandes variaciones respecto unas de otras y dichas diferencias tienen también relación con las diferentes funciones que se llevan a cabo en las diferentes membranas. El modelo bioquímico que describe la composición y la estructura de la membrana plasmática, es denominado modelo de mosaico fluido y ha ido evolucionando a lo largo de los años conforme nuevas metodologías fueron generando nuevas evidencias que permitieron entender los detalles moleculares de dicho organelo.

1.2.1. Composición bioquímica de la membrana plasmática

Como se mencionó anteriormente, la membrana plasmática es la estructura celular que divide y comunica a la célula con su entorno. Dicha estructura, al igual que el resto de las membranas biológicas, es flexible, fluida, bidimensional y está compuesta por una bicapa de core hidrofóbico e interfaces hidrosolubles. La membrana plasmática está compuesta molecularmente por una gran variedad de lípidos y proteínas, los cuales varían enormemente de un organismo a otro, así como también varían las proporciones entre ellos. Por ejemplo, para el caso de la bacteria *Esecherichia coli* la composición de lípidos de membrana plasmática esta compuesta en un 70% (en relación de peso) por

fosfatidiletanolamina mientras que en las células humanas, la fosfatidiletanolamina puede variar según el tejido de un 7 a un 25%. Además las células eucariotas tienen lípidos inexistentes en procariotas como ser la esfingomielina (Alberts et al, 2007). En cuanto a la proporción en peso de proteínas y lípidos en membranas plasmáticas, también se pueden ejemplificar grandes variaciones, como ser la membrana de la mielina que recubre y aísla eléctricamente las neuronas y que presenta menos de un 25% de proteínas de membrana. En cambio, las membranas típicas de las células humanas presentan aproximadamente un 50% de proteínas de membrana (Alberts et al, 2007). Más allá de todas estas variaciones composicionales, en términos generales, se puede decir que la mayor parte de las membranas plasmáticas están compuestas por fosfolípidos, esteroides, proteínas transmembrana y glicoproteínas. A continuación se detalla la naturaleza bioquímica de cada uno de estos componentes:

1.2.1.a. Glicerofosfolípidos: Los glicerofosfolípidos están distribuidos en todos los seres vivos y son los constituyentes lipídicos principales de las membranas biológicas. Son lípidos anfipáticos formados por una cabeza polar o hidrofílica y dos colas hidrocarbonadas apolares o hidrofóbicas. Las colas están formadas generalmente por ácidos grasos de diferentes longitudes (entre 14 y 24 átomos de carbono). Los enlaces que unen los átomos de carbono en las colas apolares pueden ser simples o dobles y en el caso de los enlaces dobles pueden tener una configuración de tipo *cis* o *trans* (Figura 1A). Los glicerofosfolípidos pueden ser clasificados dependiendo de la naturaleza de la cabeza polar que contienen en diferentes clases. Por ejemplo, en el caso de los glicerofosfogliceroides una segunda unidad de glicerol constituye parte del grupo polar, mientras que en el caso de los glicerofosforoglicerofosfogliceroides (cardiolipinas) una tercera unidad de glicerol típicamente acetilada constituye la molécula. Además, cada clase de grupo polar es luego diferenciado en base a los sustituyentes que son agregados en los gliceroides. Todas estas características y variables hacen que la polaridad, el punto de fusión y la longitud de los diferentes fosfolípidos pueda variar muchísimo, teniendo esto efectos sobre las propiedades de ancho, orden y fluidez de las membranas que forman (ver mas adelante) (Fahy et al, 2005).

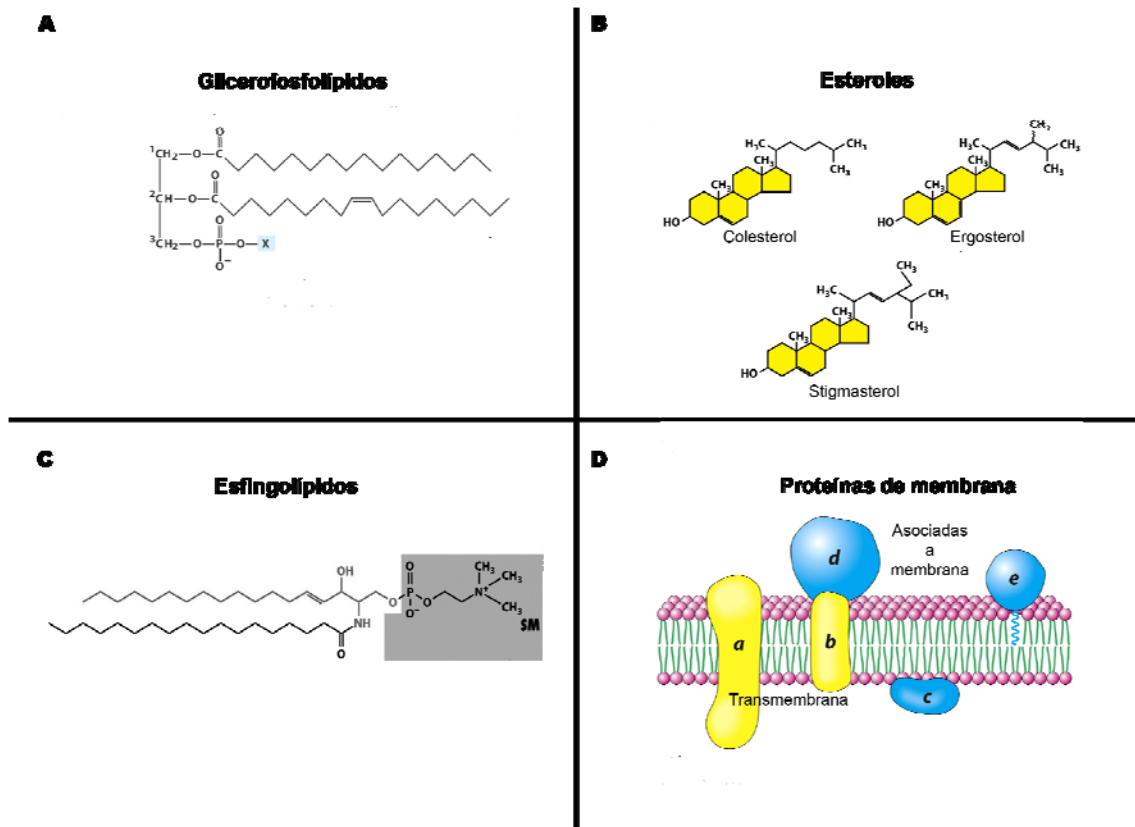


Figura 1: Componentes moleculares de las membranas biológicas

1.2.1.b. Esteroles: Son lípidos anfipáticos formados por 4 anillos planos apolares y un grupo polar hidroxilo en la posición 3 del anillo A (Figura 1B). Pertenecen a la familia de los esteroides junto con otras moléculas de señalización como ser hormonas (estrógenos y testosterona por ejemplo). Dentro de los esteroles están incluidos, por ejemplo, los fitoesteroles de plantas, los colesteroles de animales y los ergosteroles de hongos. Los esteroles son abundantes en las membranas plasmáticas y su concentración es importante tanto en la regulación de la fluidez de membrana así como en la organización de la misma debido a que los esteroles pueden interactuar en forma diferencial con proteínas de membrana plasmática y con otros lípidos como ser los esfingolípidos (Fahy et al, 2005).

1.2.1.c. Esfingolípidos: Los esfingolípidos comprenden una familia grande y compleja de lípidos que comparten una característica estructural en común: una base esfingoide que es sintetizada *de novo* a partir del aminoácido serina y de un ácido graso de cadena larga unido a la coenzima A (Figura 1C). Esta base es convertida en una enorme variedad de lípidos dentro de los cuales

están las ceramidas, los fosfoesfingolípidos, los glicoesfingolípidos y varios más. Más específicamente podemos clasificarlos en 7 clases: bases esfingoideas y sus derivados simples, bases esfingoideas con un ácido graso unido mediante un enlace amida (ceramidas), esfingolípidos más complejos con enlaces fosfodiéster que unen diferentes tipos de grupos químicos (fosfoesfingolípidos), con enlaces glicosídicos (glicoesfingolípidos como ser cerebrósidos y gangliósidos) y otros grupos como los arsenoesfingolípidos. Este gran grupo de lípidos es variado en estructura pero también es variado en función, siendo crucial tanto para la organización de las membranas biológicas como para diferentes procesos de señalización subcelular y transducción de señales. Por ejemplo, las bases esfingoideas en la dermis humana tienen grupos hidroxilo adicionales en la posición 4 y/o 6 y estas tienen propiedades especiales de interacción con otras moléculas vecinas, las cuales le confieren a la piel una barrera más fuerte anti-permeabilidad. También las bases esfingoideas y las ceramidas han sido relacionadas desde humanos hasta levaduras con roles de señalización para que las células puedan responder a diferentes situaciones de estrés como ser alta temperatura.

1.2.1.d. Proteínas transmembrana: Las proteínas pueden asociarse a la membrana plasmática de muy diversas formas (Figura 1Dayb). Para el caso de las proteínas transmembrana o integrales de membrana, parte de la molécula atraviesa la bicapa lipídica debido a que tienen una estructura molecular anfipática. Las mismas están compuestas por regiones polares que están expuestas a los medios acuosos que rodean las membranas y por partes apolares que interaccionan con el corazón apolar de la bicapa lipídica. Incluso algunas de estas proteínas aumentan su hidrofobicidad ya que presentan un enlace covalente con un ácido graso el cual se inserta en la bicapa lipídica. Los dominios apolares que atraviesan la membrana en general están constituidos por dos tipos de conformaciones: alfa hélices y barriles beta. Hay una gran variedad de proteínas transmembrana las cuales son extremadamente variadas en estructura y en función. Para ejemplificar, se pueden mencionar los transportadores de pequeñas y medianas moléculas que por no ser permeables a la bicapa lipídica solo pueden atravesarla mediante este tipo de proteínas. Estos mecanismos constituyen herramientas que permiten regular

de forma muy precisa en el tiempo y el espacio el pasaje de moléculas a través de la membrana plasmática. También existen una gran variedad de receptores, los cuales tienen dominios proteicos que se encuentran en el exterior celular con la capacidad de interactuar con ligandos. Dicha interacción se puede traducir en un cambio conformacional del receptor en el dominio expuesto al interior celular, iniciando así una respuesta molecular. Otros ejemplos son las bombas de protones que permiten generar gradientes electroquímicos así como una gran variedad de proteínas implicadas en la homeostasis de la membrana misma.

1.2.1.e. Proteínas asociadas a membrana: Las proteínas asociadas a la membrana plasmática no la atraviesan completamente y pueden estar unidas a la membrana tanto en forma directa (mediante interacciones electrostáticas con los lípidos de la misma) como en forma indirecta (mediante interacciones con otras proteínas las cuales sí contactan la membrana en forma directa) (Figura 1Dc,dye). El grupo de proteínas asociadas en forma directa es muy grande y variado. Podemos a su vez dividirlos en dos sub-grupos: aquellas que se insertan en la bicapa en forma parcial (mediante un dominio proteico anfipático o mediante un lípido unido covalentemente a la proteína) y aquellas que solamente se asocian a la superficie citoplasmática de la membrana mediante interacciones electrostáticas. A modo de ejemplo, se pueden nombrar las proteínas caveolinas y cavininas las cuales son el andamiaje proteico responsable de la formación y mantenimiento de las caveolas un tipo de nanodominios de membrana plasmática de mamíferos ampliamente estudiado (mas detalles en sección 1.3). Otro ejemplo muy estudiado de proteínas asociadas a membrana son las pertenecientes a la superfamilia BAR (bin1/amphiphysin/rvs161). La súper-familia de proteínas BAR engloba aquellas proteínas que se unen a membranas biológicas y tienen la capacidad de inducir o censar curvatura en las mismas (Dawson et al, 2006). La característica estructural definitoria de estas, es que presentan tres alfa-hélices que dimerizan para dar lugar a un módulo con forma de banana que presenta una superficie cargada positivamente, la cual es responsable de la interacción electrostática con la superficie negativa de la bicapa lipídica. Dentro de esta superfamilia se pueden distinguir 3 subgrupos: BAR/N-BAR, F-BAR e I-BAR.

Mientras que los BAR/N-BAR y los F-BAR se unen por su cara cóncava positiva a la membrana plasmática, generando y censando invaginaciones en la misma (Peter et al, 2004). Sin embargo, los I-BAR se unen por una cara levemente curvada a la membrana y generan curvaturas en forma de evaginaciones (Lee et al, 2007). Es así que este tipo de proteínas, participan de funciones celulares que implican generación de curvatura en membranas, como por ejemplo endocitosis para el caso de las proteínas BAR/N-BAR y F-BAR o la formación y/o estabilización de filopodios para el caso de las proteínas I-BAR (Frost et al, 2009).

En conclusión, las membranas plasmáticas presentan una composición bioquímica variada y compleja que incluye varios tipos de lípidos anfipáticos y varios tipos de proteínas transmembrana y asociadas. La combinación de lípidos determina principalmente las características biofísicas de la estructura membranosa como ser fluidez, grosor y curvatura, pero también es fundamental en la ejecución de distintas funciones celulares de la membrana. La lista de posibles proteínas de membrana es grande y la combinación de las mismas en una membrana es fundamental para la determinación no solo de los parámetros biofísicos de la misma sino también de las funciones celulares que se llevan a cabo. Todas estas composiciones son dinámicas y pueden ser reguladas finamente en el espacio y el tiempo, permitiéndole a la célula adaptarse a distintas condiciones y necesidades.

1.2.2. Modelos de la estructura de la membrana plasmática

Indudablemente todas las membranas de las células y en especial la membrana plasmática están basadas en una estructura llamada “bicapa lipídica” (doble capa de lípidos), que puede ser fácilmente evidenciada mediante metodologías de microscopía electrónica y estudiada en detalle mediante difracción de rayos X (Nagle & Tristram-Nagle, 2000a; Nagle & Tristram-Nagle, 2000b). El primer modelo de membrana que propuso dicha estructura fue el de Danielli y Davson en 1935 (Danielli & Davson, 1935). Debido a su forma cilíndrica, los fosfolípidos se autoensamblan de manera

espontánea formando bicapas lipídicas. Esto se debe a que termodinámicamente es muy favorable la configuración de bicapa para los lípidos anfipáticos que se encuentran en un entorno acuoso ya que ésta les permite esconder sus colas apolares en el corazón de la bicapa generando hacia una estructura con dos interfaces hidrofílicas con sus cabezas polares. Según la proporción de los diferentes fosfolípidos que componen cada membrana en particular y según el largo y la cantidad de enlaces insaturados *cis* y *trans* de los mismos, se definirá el ancho y la propiedades biofísicas de la bicapa lipídica que componen.

Una bicapa lipídica sintética formada por un único tipo de fosfolípido pasa de un estado líquido a un estado sólido o de gel a una temperatura característica. Dicho fenómeno es denominado transición de fase. En otras palabras se puede decir que a medida que la temperatura aumenta la fluidez de la bicapa también lo hace. Una manera de regular el estado de fluidez de una bicapa lipídica es ajustando la composición en cuanto a fosfolípidos de la misma. A una temperatura dada, cuanto más largas sean las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos mas ancha será la bicapa y menos fluida será la membrana. Por otra parte, cuanto mayor sea la proporción de enlaces insaturados *cis* de los fosfolípidos, la bicapa será más desordenada y por lo tanto más fluida. Sin embargo, las membranas biológicas no solo están compuestas de glicerofosfolípidos. Como ya se enumeraron más arriba, hay una gran variedad de otros lípidos y proteínas que la conforman también afectan sus propiedades.

Recién en 1972 Singer y Nicolson retomaron el concepto de bicapa lipídica propuesto por Danielli y Davson y recopilaron un gran conjunto de evidencias experimentales publicadas durante los años 50 y 60 del siglo pasado, proponiendo de esta forma un nuevo modelo que describía la estructura y organización supramolecular de los lípidos y las proteínas de la membrana plasmática. Lo llamaron el modelo de mosaico fluido (Singer & Nicolson, 1972). Basándose en una serie de evidencias experimentales, tanto bioquímicas como biofísicas, los autores propusieron en este novedoso modelo que las membranas plasmáticas estaban formadas por una estructura de tipo bicapa compuesta por lípidos anfipáticos y proteínas tanto integrales como asociadas.

También propusieron que el estado biofísico de la misma a la temperatura normal del organismo vivo en cuestión, era líquido fluida y que las proteínas que se integran y asocian podían difundir libremente dentro de dicha estructura. El modelo de mosaico fluido, como lo describieron los autores, era análogo a una solución orientada en 2 dimensiones: los solutos eran las proteínas integrales de membrana disueltas en el solvente que estaba conformado por la bicapa lipídica viscosa. Las interacciones moleculares entre las proteínas integrales de membrana y los lípidos existían en este modelo, pero no eran un freno para que las proteínas se movieran libremente. Bajo este modelo las membranas plasmáticas eran mayormente homogéneas en su composición espacial a no ser en casos excepcionales que los autores detallaban, como la mielina (donde el estado es de gel o cristal) y las sinápsis, donde existen organizaciones supramoleculares de proteínas que no difunden libremente.

El modelo de mosaico fluido fue tan robusto que hoy en día sigue teniendo vigencia. Sin embargo, variadas evidencias experimentales posteriores han hecho que este modelo evolucione y se actualice. Hoy en día se ha demostrado que la difusión de las proteínas dentro de la bicapa lipídica, en una gran parte de los casos, no es de tipo libre sino que está confinada a un área determinada y que la bicapa en si misma tanto en composición, curvatura como estado biofísico también es heterogénea (Di Rienzo et al, 2013; Lenne et al, 2006; McMahon & Gallop, 2005; Sako & Kusumi, 1995; Simons & Ikonen, 1997). Además se sabe, que la densidad de proteínas en la membrana plasmática es muy superior al dibujo presentado en el modelo de mosaico fluido y que los estados biofísicos de las membranas son heterogéneos pudiendo en muchos casos ser de tipo líquido-ordenadas, cubicas o líquido cristalinas (Bagatolli et al, 2010). Los trabajos realizados con membranas modelo, en particular con las vesículas gigantes, han permitido entender las bases biofísicas de dichos estados en las bicapas lipídicas.

De esta forma se fue realizando una actualización del modelo de la organización de la membrana plasmática donde se incluyeron varios aspectos

de la organización lateral de la misma, surgiendo así el concepto fundamental de dominios de membrana.

1.3. Organización lateral de la membrana plasmática en dominios

Ya en 1970 Chapman y colaboradores demostraban que ciertas especies de fosfatidilcolina con cadenas carbonadas de distinto largo o número de insaturaciones, eran no miscibles in vitro (Phillips et al, 1970). Posteriores observaciones de la enorme variedad de lípidos existentes en membranas de células eucariotas junto de la tendencia que tienen algunas de estas clases (esfingolípidos y esteroides) a auto-asociarse in vitro, así como de la imposibilidad de varios lípidos de mezclarse entre sí, llevó durante los 80 y 90 del siglo pasado, al desarrollo de trabajos teóricos que comenzaron a plantear la posibilidad de que existieran dominios de membrana, definidos como segregación lateral de componentes tanto lipídicos como proteicos en forma de “clusters”, ya sea en membranas artificiales como naturales (Demel et al, 1977; Mouritsen & Bloom, 1984; Simons & Ikonen, 1997; van Meer et al, 1987). Si bien durante muchos años este concepto fue fuertemente debatido, distintas técnicas de microscopía aportaron evidencia experimental concluyente acerca de la existencia de dominios de membrana plasmática tanto en células procariotas como eucariotas (Bagatolli & Gratton, 2000; Bagatolli et al, 2010; Bagatolli et al, 2000; Bernardino de la Serna et al, 2004; Eggeling et al, 2009; Fishov & Woldringh, 1999; Hess et al, 2007; Kusumi et al, 2005; Lopez & Kolter, 2010; Simons & Sampaio, 2011).

Dichos dominios surgen gracias a varios fenómenos biofísicos como ser interacciones lípido-lípido, proteína-proteína y lípido-proteína, así como segregación lateral de lípidos y restricciones o barreras a la libre difusión proteica.

Como se mencionó anteriormente no todos los lípidos son miscibles, sumándose a esta propiedad el hecho de que la presencia de colesterol en las membranas genera como consecuencia la inmiscibilidad de fases fluidas

(Sankaram & Thompson, 1991). En este sentido muchos trabajos se han publicado mediante los cuales quedo ampliamente demostrado que a una temperatura dada, pueden coexistir distintos estados de fase lipídicos, dando lugar a dominios (Bernardino de la Serna et al, 2004; de Almeida et al, 2003). Dichas fases o dominios pueden ser observados mediante microscopía confocal, trabajando con sondas fluorescentes específicas y con vesículas gigantes construidas tanto a partir de mezclas lipídicas naturales como mezclas artificiales (Bagatolli & Gratton, 2000; Bagatolli et al, 2010; Bagatolli et al, 2000; Bernardino de la Serna et al, 2004).

No menos importante son los fenómenos que conllevan a difusión translacional confinada de distintas proteínas integrales de membrana. Entre estos es fundamental nombrar el fenómeno de “corral” generado por proteínas de membrana asociadas al citoesqueleto, las cuales pueden confinar la movilidad de otras proteínas de membrana en distintas escalas temporales y espaciales (Kusumi et al, 2005; Ritchie et al, 2003). Actualmente mediante microscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo acoplada a un análisis estadístico de desplazamientos cuadrados medios (MSD), es posible estudiar in vivo la dinámica proteica de distintas proteínas integrales de membrana dentro de corrales y determinar el tipo de difusión que las mismas presentan (Di Rienzo et al, 2013; Ritchie et al, 2005). De igual relevancia es el fenómeno de plataforma proteica donde la difusión queda confinada debido a la existencia de un andamiaje proteico asociado a la membrana en cuestión (Astro & de Curtis, 2015).

Actualmente se acepta que los dominios de membrana plasmática incluyen un amplio rango de casos que van desde dominios altamente dinámicos (milisegundos de existencia) compuestos por pocos lípidos y proteínas (nanodominios) hasta dominios en la escala del micron con existencia muy estable o casi permanente (microdominios).

Un ejemplo de microdominio es el de las células del endotelio intestinal, donde las proteínas cadherinas forman estructuras en la membrana plasmática denominadas uniones estrechas. Dichas estructuras forman una barrera

proteica con función dual. Por un lado se oponen a la difusión de los componentes de la membrana plasmática delimitando dos grandes dominios (apical y basolateral) y por otro lado funcionan como una unión proteica entre las células endoteliales vecinas que evita el pasaje de patógenos entre las mismas (Tanos & Rodriguez-Boulán, 2008). La formación y el mantenimiento de estos grandes y estables microdominios de membrana plasmática depende de un complejo programa celular (Apodaca et al, 2012; Rodriguez-Boulán & Macara, 2014).

Un ejemplo de nanodominio basado en interacciones lípido-lípido son las balsas lipídicas (“lipid rafts”, en inglés). *In vivo*, dichos nanodominios han sido caracterizados de forma bioquímica como la fracción de la membrana plasmática que es resistente al tratamiento con detergentes no iónicos (“detergent resistant membranes” o “DRMs” en inglés) (Simons & Ikonen, 1997). Se ha propuesto que en el organelo denominado trans-golgi (de la ruta secretoria celular) se generan conjuntos de esfingolípidos y esteroides, así como proteínas específicas, que luego van a formar vesículas secretoras llamadas “balsas lipídicas”. En dichos nanodominios, se dan interacciones preferenciales entre los lípidos que contienen cadenas acilo saturadas, especialmente glico-esfingolípidos y esteroides así como, puentes de hidrógeno intermoleculares entre los glico-esfingolípidos (Brown & London, 1998). En comparación con las membranas celulares en general, las balsas de lípidos se caracterizan por un orden superior de la cadena acilo y un mayor empaquetamiento de los lípidos. Para demostrar la existencia de dichas balsas, se han utilizado membranas modelo libres de proteínas permitiendo demostrar las propiedades de auto-asociación de esfingolípidos y esteroides *in vitro*, interacciones que se creen ser responsables de la formación de las balsas *in vivo*. En membranas modelo con una composición de lípidos similar a la de las DRMs, la interacción preferencial entre los esfingolípidos y los esteroides se observa como la coexistencia de dos fases fluidas de la membrana, que se puede observar microscópicamente en vesículas unilamelares gigantes GUVs (“giant unilamellar vesicles”, en inglés) (Schroeder et al, 1994; Veatch & Keller, 2002).

Otro ejemplo en células de mamíferos, de nanodominio de membrana plasmática relativamente estable y de tipo plataforma es el de las caveolas. Las caveolas son dominios que se presentan como invaginaciones en forma de copa muy regulares, de 60-80 nm de diámetro. Dichos dominios son sostenidos por un andamiaje o “scaffold” proteico formado por las proteínas caveolinas y cavininas. En las caveolas se encuentran concentrados una serie de proteínas y lípidos de membrana como ser colesterol y esfingolípidos (Parton & Simons, 2007). Las caveolas han sido relacionadas con la endocitosis, los procesos de transducción de señales, homeostasis de lípidos y transitosis (Hansen & Nichols, 2010). Para el caso de las caveolas, como para muchos otros nanodominios, aun no existe una visión completa sobre los mecanismos de formación y mantenimiento o sobre aquellos mecanismos que las relacionan con las distintas funciones celulares arriba descritas.

En forma general, la investigación acerca de la composición, comportamiento dinámico y mecanismos de formación de dominios de membrana representa un campo de altísima actividad dentro de la biología celular (Simons & Sampaio, 2011).

En resumen, las membranas biológicas son fundamentales para la existencia de la vida. Éstas se encuentran altamente organizadas en dominios y si bien se han realizado grandes avances en los últimos años, aún quedan cuestiones fundamentales por resolver en el estudio de la organización de los mismos. Poco se entiende de las bases moleculares que llevan a la formación, organización y mantenimiento de dominios en la membrana plasmática. También, poco se conoce de la función de muchos de sus componentes, de la interacción existente entre distintos dominios y del papel que cumplen en distintas patologías (Lingwood & Simons, 2010; Sengupta et al, 2007).

Aún eucariotas unicelulares como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presentan membranas plasmáticas altamente organizadas (Aguilar et al, 2010; Grossmann et al, 2008a; Malinska et al, 2003). Este organismo, debido a su proximidad genética con los humanos y a su fácil y económica manipulación

experimental, constituye un modelo de estudio muy atractivo para atacar las cuestiones arriba mencionadas.

1.4. *Saccharomyces cerevisiae*, eisosomas y organización de la membrana plasmática

Saccharomyces cerevisiae también denominada levadura del pan y la cerveza, es un hongo perteneciente al phylum Ascomycotina. La misma es un organismo unicelular eucariota que tiene un ciclo de vida sexual alternando un estadio diploide y otro haploide. Su hábitat natural es muy variado pudiendo encontrarse levaduras pertenecientes a dicha especie en distintas superficies de la naturaleza así como en distintos seres vivos tanto animales como vegetales (Goddard & Greig, 2015). Este hongo fue domesticado desde al menos 3500 años antes de cristo (quizás hasta 8000 años antes de cristo) debido a sus aplicaciones en la elaboración de alimentos fermentados como ser el vino, el pan y la cerveza, siendo las más antiguas evidencias provenientes de la región Mesopotámica (Legras et al, 2007). Dada la importancia de este tipo de alimentos en las distintas sociedades y la expansión de los mismos en todas las regiones del mundo y dadas las variadas aplicaciones industriales de la fermentación alcohólica, con el decisivo aporte de Louis Pasteur (Pasteur, 1860), *S. cerevisiae* se convirtió en un organismo modelo no solo en el mundo de la industria de los alimentos sino en el mundo académico. Durante el siglo 19 se invirtieron muchos recursos en el estudio de las vías metabólicas de la levadura del pan, lo que desencadenó grandes avances en el área de la bioquímica y la biología celular en general (Barnett, 2000; Barnett, 2003; Barnett & Lichtenthaler, 2001). Durante el siglo 20 *S. cerevisiae* fue intensamente estudiado para poder entender el funcionamiento de las células eucariotas en general y particularmente la investigación del siglo 20 basada en *S. cerevisiae* permitió el desarrollo profundo de la genética y la biología molecular eucariota (Barnett, 2007).

En el año 1996 (<https://www.genome.gov/10000510>), *S. cerevisiae* fue el primer organismo eucariota en tener su genoma secuenciado de manera

completa (Bassett et al, 1996; Goffeau et al, 1996). Actualmente *S. cerevisiae* es por excelencia el organismo eucariota más utilizado como modelo para el desarrollo de herramientas conceptuales y experimentales de Biología Cuantitativa y Biología de Sistemas (Sanchez & Nielsen, 2015); existiendo extensas bases de datos genómico funcionales, genéticos y fenotípicos en todos los niveles (proteómico, metabolómico, celular, etc) que alimentan modelos cuantitativos holísticos que pretenden describir y predecir el funcionamiento de una célula en relación con su entorno (Dujon, 2010; Engel & Cherry, 2013).

Al igual que otras estructuras celulares eucariotas, la membrana plasmática de *S. cerevisiae* es un modelo de estudio muy desarrollado. La misma está altamente organizada en varios dominios de distintos tamaños, vida media y formas. Algunos de estos se solapan parcialmente mientras que otros están totalmente excluidos (Mueller et al, 2012; Spira et al, 2012b). Ya en la década del 60 fueron descritas zonas de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* que eran observadas, mediante criofractura y microscopía electrónica de transmisión, como zonas invaginadas en forma de surco de unos 300 nm de largo y 50 nm de profundidad. Ésta fue la primer heterogeneidad descrita en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Décadas más tarde, experimentos de microscopía confocal de fluorescencia, mostraron que distintas proteínas de membrana plasmática, Can1p (simportador de arginina y protones) y Sur7p, presentaban una distribución heterogénea y consistente en todas las células observadas (Malinska et al, 2003; Malinska et al, 2004; Young et al, 2002). Dicho patrón de distribución era en forma de parches discretos cuyo tamaño estaba en el límite de resolución de los microscopios utilizados en el momento. En base a estas dos proteínas fue definido el primer nanodominio de membrana plasmática de *S. cerevisiae* el cual además fue relacionado con la regulación del metabolismo celular en cuanto a niveles celulares de esfingolípidos. Éste fue inicialmente denominado MCC (“Membrane Compartment Occupied by Can1p” en inglés). En el mismo trabajo se observó la proteína Pma1p (ATPasa) como una proteína de membrana que se distribuía en forma de red complementaria a los dominios MCC y por lo tanto se propuso que el resto de la membrana plasmática que no formaba parte de los dominios

puntuales MCC, era otro dominio complementario y éste fue denominado MCP (“Membrane Compartment Occupied by Pma1p” en inglés) (Malinska et al, 2003). Posteriormente estudios de biología celular relacionados con el complejo TORC2 (“target of rapamycin complex 2”, en inglés) evidenciaron un tercer dominio de membrana que no co-localizaba ni con los dominios MCC ni con los MCP y por lo tanto fue denominado MCT (del inglés “compartimiento de membrana de TORC2”) (Berchtold & Walther, 2009). Hoy en día se sabe que la situación es mucho más compleja y que en realidad existen múltiples dominios (Spira et al, 2012a; Spira et al, 2012b).

1.4.1 Dominios eisosomales

Como se mencionó, la composición y organización de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* es compleja presentando un gran número de distintos nanodominios que varían ampliamente en su composición bioquímica, en su patrón de distribución así como en sus tiempos de vida media (Spira et al, 2012c). Dentro de esta gran variedad, los tres tipos de nanodominios más estudiados han sido los denominados MCCs, MCPs y MCTs (Berchtold & Walther, 2009; Malinska et al, 2003; Malinska et al, 2004). Observados a través de microscopía óptica de fluorescencia, los nanodominios MCCs y MCTs lucen como puntos discretos distribuidos en toda la membrana plasmática sin solaparse (Malinska et al, 2003; Malinska et al, 2004; Walther et al, 2006). El nanodominio MCP tiene forma de red y se caracteriza por la presencia de la bomba de protones Pma1 que permite la manutención del pH citoplasmático.

El director de la presente tesis trabajando en organización de membranas de *S. cerevisiae*, en el laboratorio del Dr. Peter Walter en la Universidad de California San Francisco (UCSF), participó en el descubrimiento de ensamblajes macromoleculares que se encuentran unidos a la cara citoplasmática de la membrana plasmática y que fueron denominados eisosomas (Walther et al, 2006). Los eisosomas colocalizan con los dominios MCC y son necesarios para la formación de los mismos (Walther et al, 2006). Los eisosomas han sido el foco principal de las investigaciones del grupo de trabajo donde se ejecutó la

presente tesis (Aguilar et al, 2010; Olivera-Couto & Aguilar, 2012; Olivera-Couto et al, 2011; Olivera-Couto et al, 2015).

Los eisosomas observados por microscopía confocal de fluorescencia (marcando sus diversos componentes, ver más adelante) tienen aspecto puntiforme, de tamaño regular y en el límite óptico de resolución de la microscopía confocal tradicional. Los mismos se distribuyen uniformemente a lo largo de la membrana plasmática, presentando posiciones invariables durante toda la vida de la célula. Trabajos de microscopía de fluorescencia de súper-resolución mostraron en imágenes de cortes ecuatoriales de células de levaduras que los eisosomas pueden observarse como estructuras alargadas con un ancho máximo de 50 nm (Rankin et al, 2011).

Cada célula de levaduras tiene una densidad constante de 0.33 ± 0.06 eisosomas por μm^2 indicando que, según su tamaño, una célula contiene entre 30 y 40 eisosomas (Moreira et al, 2009). A continuación se describe en detalle distintos aspectos celulares y moleculares de estos dominios.

1.4.2 Composición bioquímica

1.4.2.a Proteínas estructurales: Los eisosomas están compuestos por al menos 28 proteínas diferentes (Olivera-Couto & Aguilar, 2012) (Tabla 1). Dentro de éstas hay dos proteínas parálogas, Pil1p (“Phosphorylation Inhibited by Long Chain Bases”, del inglés) y Lsp1p (“Long Chain Bases Stimulate Phosphorylation”, del inglés), que son los componentes eisosomales más abundantes, las cuales se presentan aproximadamente 150000 copias por célula (Chong et al, 2015; Kulak et al, 2014). Debido al número regular de eisosomas observado por célula, se puede concluir que cada eisosoma consta de entre 2000 y 4000 copias de cada una de estas proteínas. El trabajo con cepas deletadas en gen *PIL1*, o con niveles proteicos alterados, mostró que dicha proteína es fundamental como esqueleto (o “scaffold”, en inglés) para la formación y mantenimiento de dichos dominios (Moreira et al, 2009; Walther et al, 2006). Mientras que existe una alta similitud a nivel de secuencia

aminoacídica (mayor al 70% de identidad) entre Pil1p y Lsp1p, a diferencia de Pil1p cuando el gen codificante de Lsp1p es deletado los eisosomas no presentan grandes cambios en cuanto a tamaño y número (mas detalles en sección 1.4.4.).

Tabla 1. Proteínas Eisosomales.			
Nombre sistemático	Nombre común	Evidencia	Referencia
Proteínas asociadas a membrana			
Ygr086c	Pil1	Componente eisosomal principal	(Walther et al, 2006)
Ypl004c	Lsp1	Componente eisosomal principal	(Walther et al, 2006)
Ygr130c	Ygr130c	AC/MS*, Colocalización	(Deng et al, 2009; Grossmann et al, 2008a)
Ymr031c	Eis1	AC/MS, Colocalización	(Deng et al, 2009; Grossmann et al, 2008a)
Ymr086w	Seg1	AC/MS, Colocalización	(Deng et al, 2009)
Ykl105c	Ykl105c	AC/MS	(Aguilar et al, 2010)
Ynl173c	Mdg1	Colocalización	(Grossmann et al, 2008a)
Ydr490c	Pkh1	AC/MS, Colocalización	(Walther et al, 2007; Zhang et al, 2004)
Yol100w	Pkh2	AC/MS, Colocalización	(Walther et al, 2007; Zhang et al, 2004)
Ydr032c	Pst2	Colocalización	(Grossmann et al, 2008a)
Ybr052c	Rfs1	Colocalización	(Grossmann et al, 2008a)
Ycr004c	Ycp4	AC/MS, Colocalización	(Deng et al, 2009; Grossmann et al, 2008a)
Ynl047c	Slm2	Colocalización	(Grossmann et al, 2008a)
Yil105c	Slm1	Colocalización	(Grossmann et al, 2008a)
Yil002c	Inp51	Colocalización	(Fröhlich et al 2014)
Ygl173c	Xrn1	Colocalización	(Grousl et al. 2015)
Proteínas transmembrana			
Ydl222c	Fmp45	Colocalización	(Young et al, 2002)
Yml052w	Sur7	Colocalización	(Malinska et al, 2004; Walther et al, 2006; Young et al, 2002)
Ylr414c	Pun1	Colocalización	(Alvarez et al, 2008; Grossmann et al, 2008a)
Ypr149w	Nce102	Colocalización	(Grossmann et al, 2008a)
Yel063c	Can1	Colocalización	(Malinska et al, 2003)
Yol020w	Tat2	Colocalización	(Grossmann et al, 2007a)
Ybr021w	Fur4	Colocalización	(Malinska et al, 2004)
Ygr131w	Fhn1	Colocalización	(Grossmann et al, 2008a)
Ynl194c	Ynl194c	Colocalización	(Young et al, 2002)

* AC/MS ("affinity chromatography/mass spectrometry" en inglés)

1.4.2.b Proteínas asociadas a membrana: Además de este esqueleto proteico, los eisosomas están formados por un grupo variado de proteínas tanto asociadas a membrana plasmática como integrales. Dentro de las asociadas a membrana podemos destacar a las quinasas Pkh1p y Pkh2p (homólogas de la PDK1 de mamíferos) (Walther et al, 2007) las cuales son propuestas como capaces de fosforilar (probablemente de manera directa) directa a Pil1p y Lsp1p (Luo et al, 2008; Walther et al, 2007; Zhang et al, 2004). También debemos nombrar a las proteínas de señalización Slm1p y Slm2p (pertenecientes al complejo TORC2). Estas 4 moléculas pertenecientes a diferentes cascadas de señalización participan de procesos regulatorios fundamentales como ser aquel que censa y responde a la fragilidad de la pared celular (o “Cell Wall Integrity Pathway”, en ingles) y la respuesta a estrés térmico (o “Heat Shock Response”, en ingles) entre otros. Dichas proteínas no solamente se localizan en forma altamente dinámica en los eisosomas sino que también tienen la potencialidad de modificarlos, ver más detalles en sección 1.4.6.

1.4.2.c Proteínas integrales de membrana: Como proteínas integrales de membrana podemos nombrar a los transportadores de micronutrientes Can1p, Fur4p (permeasa de uracilo) y Tat2p (permeasa de triptófano y tirosina) (Grossmann et al, 2008b) (todos simportadores ya que importan nutrientes y protones hacia el interior de la célula). También se encuentra Sur7p, el cual es el miembro prototípico de la familia Sur7-like, familia compuesta por proteínas integrales de membrana con 4 dominios transmembrana (pfam06687). En *S. cerevisiae*, otras tres proteínas que pertenecen a esta familia (Fmp45p, Pun1p y Ynl194c) también forman parte de eisosomas. Sur7p ha sido asociada con la endocitosis ya que su sobreexpresión suprime parcialmente varios fenotipos causados por mutaciones en las proteínas endocíticas de tipo de las anifisinas Rvs167p y Rvs161p (Sivadon et al, 1997).

1.4.2.d Lípidos: La membrana de *S. cerevisiae* presenta un tipo de esterol denominado ergosterol, el cual puede formar balsas lipídicas junto con esfingolípidos *in vitro*, análogas a las de las membranas de mamíferos (Klose et al, 2010). Sin embargo estudios *in vivo* han mostrado que la membrana de

S. cerevisiae efectivamente presenta dominios fluído ordenados pero que los mismos no están compuestos por ergosterol sino mayoritariamente esfingolípidos (Aresta-Branco et al, 2011). Yendo al concepto de balsa lipídica definida según DRMs, para el caso de la levadura del pan la mayor parte de las proteínas integrales de membrana pertenecen a dicha fracción, por lo que es difícil usar en el caso de la levadura dicho criterio para describir nanodominios (Lauwers & Andre, 2006). En cuanto a la concentración de diferentes lípidos dentro de la membrana plasmática eisosomal, existen evidencias de microscopía confocal con sondas lipídicas fluorescentes, en particular filipina, que sugieren que el ergosterol se encuentra enriquecido en los dominios eisosomales (Grossmann et al, 2007b). Sin embargo dichos experimentos no son concluyentes debido a las controversias en torno al uso de dichas sondas. Algunos autores sostienen que la utilización de lípidos fluorescentes como la filipina conlleva a la agregación artificial de lípidos así como formación de poros en la membrana, y por lo tanto estos resultados no serían reales (Robinson & Karnovsky, 1980; Valdez-Taubas & Pelham, 2003). La correcta localización de la mayor parte de las proteínas integrales de membrana eisosomales depende de que las rutas biosintéticas del ergosterol y de los esfingolípidos estén intactas (Grossmann et al, 2008a; Grossmann et al, 2006; Malinska et al, 2003).

1.4.3 Estructura eisosomal

Dado el tamaño eisosomal el cual se encuentra en la escala nanométrica, conocer la estructura de los mismos no ha sido sencillo y aun resta mucho por conocer. Una de las características estructurales que primero se determinó fue en cuanto a la topografía de la membrana plasmática eisosomal. Ya en la década de 60 se habían descrito invaginaciones en forma de surcos que se encontraban distribuidas en toda la superficie de la membrana plasmática (Moor & Muhlethaler, 1963; Streiblova, 1968). Actualmente se sabe que dichas invaginaciones corresponden a los eisosomas gracias a imágenes de microscopía electrónica de criofractura y de inmunomicroscopía electrónica. Así, los dominios MCC, los eisosomas y los surcos invaginados son parte de la

misma estructura subcelular. Para simplificar, de aquí en adelante se utilizará solamente el término eisosomas.

Las dimensiones del surco eisosomal son de unos 300 nm de largo y 50 nm de diámetro (Stradalova et al, 2009). Sin embargo, aun existe una discrepancia entre el número de eisosomas por célula observados por microscopía confocal y el número de surcos estimado a partir de cisfracturas de la membrana plasmática observadas mediante microscopía electrónica. En cuanto a la ultraestructura del arreglo proteico eisosomal en células intactas poco se sabe hasta el momento. Estudios contemporáneos a esta tesis, trabajando con las proteínas purificadas *in vitro*, mostraron que tanto Lsp1p como Pil1p se autoensamblan formando estructuras helicoidales filamentosas y trabajando *in situ* (con membranas de levaduras inmovilizadas) se pudieron observar estructuras estriadas similares a las observadas *in vitro* pero en lugar de cilíndricas compuestas por un medio cilindro (Karotki et al, 2011).

1.4.4 Formación y mantenimiento de los dominios eisosomales.

Mediante manipulaciones genéticas y utilizando distintas técnicas de microscopía de fluorescencia *in vivo* se ha visto que:

- los eisosomas son estructuras estáticas que no cambian de posición durante toda la vida de la célula y que están distribuidos al azar (Walther et al, 2006),
- Pil1p, y no Lsp1p, es esencial para el correcto ensamblado de los eisosomas: en su ausencia los eisosomas se desensamblan y parte de sus componentes forman dominios desorganizados que se asocian con enormes invaginaciones en la membrana plasmática (Walther et al, 2006),
- la biogénesis de los eisosomas está acoplada al ciclo celular: los eisosomas sólo se forman durante el crecimiento celular, cuando se genera una célula hija y por lo tanto existe aumento de la cantidad de membrana plasmática (Moreira et al, 2009),
- los eisosomas no se forman a partir de estructuras pre-existentes sino *de novo* a partir de subunidades de Pil1p y Lsp1p recién sintetizadas en el citoplasma (en el caso de Pil1p en forma sincronizada con el ciclo celular)

(Moreira et al, 2009; Walther et al, 2007; Walther et al, 2006),

- la biogénesis eisosomal estudiada a través e la observación de Pil1p-GFP presenta tres etapas: formación del sitio de nucleación, ensamblaje activo y fase estacionaria (Moreira et al, 2009),

- Pil1p y Lsp1p son proteínas multifosforiladas. Las mismas son fosforiladas en forma dependiente de Pkh1 y Pkh2 (Luo et al, 2008; Walther et al, 2007; Zhang et al, 2004), aunque la evidencia más fuerte apunta a que Pkh2 es la mayor responsable de dichas fosforilaciones. En variantes sobre-expresadas de Pkh1 y Pkh2 fusionadas a GFP se pudo observar que dichas proteínas localizan en forma dinámica en los eisosomas (Walther et al, 2007), mientras que experimentos con niveles endógenos de dichas proteínas solamente pudieron mostrar la localización dinámica en eisosomas para el caso de Pkh2. Dichas fosforilaciones son dependientes de los niveles de LCBs en la célula (inhibida para el caso de Pil1p y estimulada para el caso de Lsp1p) (Zhang et al, 2004). En este sentido, en células tratadas con miriocina, un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos, la fosforilación de Pil1p es estimulada (Luo et al, 2008) y la estimulación artificial del estado fosforilado de Pil1p así como la expresión de variantes mutadas de Pil1p que simulan el estado hiper-fosforilado de la misma, generan desensamblaje parcial de los eisosomas (Walther et al, 2007). Nce102 es otra proteína integral de membrana que visita transitoriamente a los eisosomas, y ha sido demostrado que su localización eisosomal es abolida por el tratamiento con miriocina y esto afecta negativamente los niveles de fosforilación de Pil1p y Lsp1p (Frohlich et al, 2009). Por las evidencias anteriores se puede decir que el estado de fosforilación de Pil1p y Lsp1p responde a los niveles celulares de esfingolípidos y sus precursores y esto afecta la estructura eisosomal fina.

- Seg1 es otra proteína eisosomal asociada a membrana plasmática que controla el ensamblaje eisosomal y que fue observada mediante ensayos de microscopía de fluorescencia como una proteína que se nuclea en las localizaciones de la membrana plasmática que luego van a estar ocupadas por los dominios eisomales, en forma previa a Pil1p y Lsp1p. Células donde el gen codificante para Seg1p fue eliminado, presentan un fenotipo deficiente en la formación de los dominios eisomales y localización de sus componentes

proteicos y lipídicos. En ausencia de Pil1p y con sobreexpresión de Seg1p, se forman estructuras en forma de filamento grueso en la membrana plasmática dentro de las cuales se relocalizan todas las proteínas eisosomales que se analizan en el trabajo pero no el ergosterol (Frohlich et al, 2009; Moreira et al, 2012).

1.4.5 Funciones celulares asociadas a los dominios eisosomales.

Evidencia acumulada durante los últimos 12 años relaciona a los eisosomas con las siguientes funciones:

- Transporte de moléculas pequeñas como arginina, uracilo y triptófano, evidenciada por el confinamiento de sus proteínas transportadoras en los dominios eisosomales (Can1p, Fur4p y Tat2p respectivamente) (Grossmann et al, 2007(Malinska et al, 2003; Malinska et al, 2004).
- Concentración de eventos endocíticos. La distribución de los sitios de endocitosis así como la frecuencia de eventos endocíticos, tanto de lípidos (por ejemplo lípido fluorescente FM4-64) como de proteínas (transportador de glucosa, Hxt2p), depende de la presencia de dominios eisosomales intactos. Por otro lado, los parches de actina que contienen las proteínas Abp1p y Sla2p, ambas centrales en el proceso de endocitosis, colocalizan con los dominios eisosomales (Walther et al, 2006). Sin embargo han surgido algunas controversias en este sentido que han llevado a la falta de consenso. En un trabajo del grupo de Widmar Tanner, dónde se identificaron 21 proteínas que colocalizaban con marcadores eisosomales, se estudió la localización de las proteínas de la maquinaria endocítica central de levaduras y ninguna mostró una localización eisosomal (Grossmann et al, 2008a). En acuerdo con este trabajo, datos funcionales mostraron que las velocidades de endocitosis de Can1p y Tat2p no eran afectadas significativamente en células donde Pil1p no está presente y por lo tanto los eisosomas se encuentran desestructurados (Brach et al, 2011).

- Concentración de vías de señalización. Los eisosomas reclutan en forma altamente dinámica, dos quinasas homólogas de la quinasa de mamíferos PDK1. Estas quinasas, llamadas Pkh1p y Pkh2p. Mientras que experimentos de microscopía confocal de fluorescencia con niveles sobre-expresados de las mismas mostraron que ambas localizan en forma dinámica en los eisosomas (Walther et al, 2007), posteriormente trabajando con niveles endógenos de expresión de las mismas solo se pudo detectar la presencia de Pkh2p en forma dinámica en los eisosomas. activan al menos tres vías de señalización cuyos componentes principales también se encuentran conservados en mamíferos. Estas vías están integradas por las quinasas Pkc1p (ortóloga de las isoformas de mamíferos α , β y γ de PKC), Sch9p (ortóloga de Akt/PKB) e Ypk1p/Ypk2p (ortólogas de SGK). Al igual que PDK1, las quinasas Pkh se reparten en dos compartimientos celulares: citoplasma y membrana plasmática. En levaduras, la localización en membrana plasmática de estas quinasas depende de la correcta organización subcelular de los eisosomas (Walther et al, 2007). Los mecanismos moleculares que median este reclutamiento, así como también las consecuencias que el mismo tiene para la fisiología celular, son aún desconocidos.
- Organización de dominios de membrana plasmática. La membrana plasmática en *S. cerevisiae* se encuentra organizada en dominios laterales que concentran diferentes lípidos y proteínas integrales de membrana. Debido a que la formación normal de éstos depende de la presencia de eisosomas intactos es que se cree que los eisosomas son necesarios para la correcta organización de los dominios de membrana plasmática.
- Reclutamiento de la fosfatasa de fosfoinositol 4-5-bifosfato (PI(4,5)P₂), a la membrana plasmática. Dichas fosfatasas juegan roles centrales en la regulación de la homeostasis de la membrana plasmática y los eisosomas fueron relacionados con la regulación de la distribución espacial de las mismas. Más aun, la ausencia de Pil1p y por lo tanto la ausencia de dominios eisosomales impacta directamente en la cantidad

de PI(4,5)P₂ total y localizado en MP, en células que no expresan Pil1p las cantidades de PI(4,5)P₂ están aumentadas (Fröhlich et al, 2014) .

- Resultados preliminares de nuestro grupo indican que los eisosomas juegan un papel en los procesos de envejecimiento cronológico y replicativo. De confirmarse estos resultados, será de interés determinar las bases celulares y moleculares de este mecanismo.

Teniendo en cuenta los diferentes procesos dependientes de los eisosomas, estos emergen como organizadores de funciones tanto propias como asociadas a la membrana plasmática.

1.4.6. Funciones moleculares de los eisosomas.

Los eisosomas tienen diversos roles a nivel celular pero se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en su ensamblaje, organización subcelular o funcionamiento. Más aun, hasta el momento se han descrito un gran número de proteínas eisosomales residentes en forma estable y visitantes en forma dinámica (Tabla 1) (Walther et al, 2006, Walther et al, 2007, Aguilar et al, 2010, Grossmann et al, 2007, Grassmann et al, 2008). Sin embargo, para pocas de ellas se ha descrito dominio proteico de función conocida que pueda dar cuenta de los mecanismos moleculares de acción de los eisosomas.

Es por esto que surgen varias preguntas substanciales que aún no se han logrado responder. Entre éstas, el presente proyecto intentará responder las siguientes: ¿Cuál es la estructura de los eisosomas *in vivo*? ¿Cómo logran las proteínas Pil1p y Lsp1p generar los nanodominios eisosomales?

En resumen, un conjunto de evidencias genéticas, bioquímicas y de biología celular molecular permiten sostener que los eisosomas cumplen un papel central como organizadores de la membrana plasmática, promoviendo la acumulación selectiva y localizada de lípidos y proteínas (Aguilar et al, 2010; Moreira et al, 2009; Olivera-Couto et al, 2011; Walther et al, 2007). En el marco

del presente trabajo de Maestría y Doctorado, uno de los objetivos fue aportar evidencias para contribuir al entendimiento molecular y celular de los mecanismos de formación y mantenimiento de eisosomas, esperando contribuir al entendimiento general de las bases moleculares y celulares que sustentan la formación de dominios de membrana.

1.5 Conservación de los dominios eisosomales en otras especies.

Ver anexo 2

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Caracterizar cinética y cuantitativamente el proceso de ensamblado de eisosomas in vivo.

2.2. Objetivos específicos:

1. Elucidar las bases moleculares de la formación de eisosomas.
2. Elucidar las bases moleculares del mecanismo de generación de dominios de membrana dependiente de eisosomas.
3. Determinar in vivo la dinámica molecular, las cantidades totales, el grado de oligomerización y la concentración de las proteínas Pil1p y Lsp1p solubles en el citoplasma.
4. Determinar in vivo la cinética de ensamblado de Pil1p en eisosomas.
5. Determinar el papel que desempeña Lsp1p en el ensamblado de Pil1p en eisosomas.

3. Materiales, Métodos y Resultados

Debido a que la mayor parte de los resultados obtenidos fueron publicados en revistas arbitradas, la sección Resultados será presentada basándose en dichas publicaciones. Para cada objetivo se hará una breve descripción de los resultados en español y se adjuntarán las publicaciones correspondientes para la lectura detallada. En el anexo 1 se presentan los materiales y métodos detallados en español y en el anexo 2 se presentan los resultados de los análisis filogenéticos de las distintas proteínas eisosomales dentro de los distintos grupos de hongos publicados dentro de una publicación que se realizó revisando los resultados obtenidos hasta el año 2012.

The eisosome core is composed of BAR domain proteins

Agustina Olivera-Couto, Martin Graña, Laura Harispe, and Pablo S. Aguilar

Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay

ABSTRACT Eisosomes define sites of plasma membrane organization. In *Saccharomyces cerevisiae*, eisosomes delimit furrow-like plasma membrane invaginations that concentrate sterols, transporters, and signaling molecules. Eisosomes are static macromolecular assemblies composed of cytoplasmic proteins, most of which have no known function. In this study, we used a bioinformatics approach to analyze a set of 20 eisosome proteins. We found that the core components of eisosomes, paralogue proteins Pil1 and Lsp1, are distant homologues of membrane-sculpting Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) proteins. Consistent with this finding, purified recombinant Pil1 and Lsp1 tubulated liposomes and formed tubules when the proteins were overexpressed in mammalian cells. Structural homology modeling and site-directed mutagenesis indicate that Pil1 positively charged surface patches are needed for membrane binding and liposome tubulation. Pil1 BAR domain mutants were defective in both eisosome assembly and plasma membrane domain organization. In addition, we found that eisosome-associated proteins Slm1 and Slm2 have F-BAR domains and that these domains are needed for targeting to furrow-like plasma membrane invaginations. Our results support a model in which BAR domain protein-mediated membrane bending leads to clustering of lipids and proteins within the plasma membrane.

Monitoring Editor

David G. Drubin
University of California,
Berkeley

Received: Jan 3, 2011

Revised: May 2, 2011

Accepted: May 6, 2011

INTRODUCTION

As the cellular border, the plasma membrane manages the traffic of materials and information into and out of the cell. To cope with so many diverse tasks, the plasma membrane is organized into dynamic compartments or domains where different components and functions take place. These domains exist over a wide range of spatial and temporal scales, ranging from nanometers to micrometers and from milliseconds to highly stable or even static domains (Lingwood and Simons, 2010). Extensively studied examples of micrometer-scale organization include epithelial cells, where the apical and basolateral domains of the plasma membrane segregate a large set of specific proteins and lipids (Tanos and Rodriguez-Boulan, 2008). Below the micrometer level, nanoscale associations of lipids

and proteins modulate the spatial distribution of plasma membrane functions, including signal transduction, exocytosis, and endocytosis. Despite being extensively characterized, current understanding of submicrometer plasma membrane domain biogenesis remains limited (Munro, 2003; Lingwood and Simons, 2010). The emerging picture involves a complex interplay among several different mechanisms. Lipids with self-associating properties (e.g., sterols and sphingolipids) congregate to provide lipidic platforms where certain proteins (e.g., glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins) partition (Lingwood and Simons, 2010). Within the lipid bilayer, homotypic and heterotypic protein-protein interactions also segregate lipids by virtue of favored protein-lipid interactions (Poveda *et al.*, 2008). A third mechanism is provided by water-soluble components such as scaffolding proteins that are able to locally modify plasma membrane composition and topography by protein-protein and protein-lipid interactions (Johannes and Mayor, 2010; Lingwood and Simons, 2010).

Submicrometer domain organization is evident in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Three plasma membrane domains have been described that were named after fluorescently tagged marker proteins used in various studies. The membrane compartment containing Can1 (MCC); the membrane compartment containing the target of rapamycin complex 2 (TORC2) or MCT, and the membrane compartment containing Pma1 (MCP) (Young *et al.*,

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E10-12-1021>) on May 18, 2011.

Address correspondence to: Pablo S. Aguilar (pablo.aguilar@pasteur.edu.uy).

Abbreviations used: BAR, Bin/amphiphysin/Rvs; MCC, membrane compartment containing Can1; MCP, membrane compartment containing Pma1; MCT, membrane compartment containing TORC2; PI(4,5)P2, L- α -phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; TORC2, target of rapamycin complex 2.

© 2011 Olivera-Couto *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

"ASCB," "The American Society for Cell Biology," and "Molecular Biology of the Cell" are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.molbiolcell.org/content/suppl/2011/05/14/mbc.E10-12-1021.DC1.html>

ORF	Name	Evidence	Reference
Ygr086w	Pil1	Core component	Walther <i>et al.</i> , 2006
Ypl004c	Lsp1	Core component	Walther <i>et al.</i> , 2006
Ygr130c	Ygr130c	AC/MS, colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008; Deng <i>et al.</i> , 2009
Ymr031c	Eis1	AC/MS, colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008; Deng <i>et al.</i> , 2009; Aguilar <i>et al.</i> , 2010
Ymr086w	Ymr086w	AC/MS, colocalization	Krogan <i>et al.</i> , 2006; Deng <i>et al.</i> , 2009
Ynl173c	Mdg1	Colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008
Ydr490c	Pkh1	AC/MS, colocalization, functional	Zhang <i>et al.</i> , 2004; Walther <i>et al.</i> , 2007
Yol100w	Pkh2	AC/MS, colocalization, functional	Zhang <i>et al.</i> , 2004; Walther <i>et al.</i> , 2007
Ydr032c	Pst2	Colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008
Ybr052c	Rfs1	AC/MS, colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008
Ycr004c	Ycp4	AC/MS, colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008; Deng <i>et al.</i> , 2009
Yil105c	Slm1	Colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008
Ynl047c	Slm2	Colocalization	Grossmann <i>et al.</i> , 2008
Ypr115w	Rgc1	AC/MS	Krogan <i>et al.</i> , 2006
Ybr108w	Aim3	AC/MS	Krogan <i>et al.</i> , 2006
Ykl142w	Mrp8	AC/MS, Y2H	Ito <i>et al.</i> , 2001; Collins <i>et al.</i> , 2007; Yu <i>et al.</i> , 2008
Yer047c	Sap1	Y2H	Yu <i>et al.</i> , 2008
Ypl074w	Yta6	AC/MS	Ho <i>et al.</i> , 2002
Ylr219w	Msc3	Y2H, functional	Yu <i>et al.</i> , 2008; Moreira <i>et al.</i> , 2009

Paralogue proteins with no evidence for eisosome association are not listed. AC/MS, affinity chromatography/mass spectrometry; Y2H, yeast two-hybrid.

TABLE 1: Analyzed eisosome-related proteins.

2002; Malinska *et al.*, 2003; Berchtold and Walther, 2009). MCCs and MCTs are discrete foci, whereas the MCP is a continuous domain interrupted by MCCs and MCTs and otherwise occupies the rest of the plasma membrane. So far, the best-characterized domains are MCCs. On average, each cell contains 40 MCCs that are homogeneously distributed throughout the plasma membrane. MCCs concentrate sterols and several integral membrane proteins (Young *et al.*, 2002; Grossmann *et al.*, 2007). MCCs are also topographically distinctive, in that they are furrow-like plasma membrane invaginations 50 nm deep and 200–300 nm in length (Stradalova *et al.*, 2009). Remarkably, MCCs are immobile once formed, as their positions are fixed and unperturbed by cell growth and division. A cellular structure termed the eisosome is found intimately associated with the cytoplasmic side of every MCC. Each eisosome is a large proteinaceous assembly that is composed mainly of thousands of copies of two paralogous proteins, Pil1 and Lsp1 (Walther *et al.*, 2006). Despite being almost identical as well as similar in abundance, these proteins have different roles in eisosome structure and biogenesis. In the absence of Pil1, a large fraction of Lsp1 does not attach to the plasma membrane and remains cytoplasmic. The fraction of Lsp1 that remains associated with the plasma membrane forms few clusters that are larger than normal and were designated “eisosome remnants.” In contrast, in the absence of Lsp1, eisosomes form normally with Pil1 (Walther *et al.*, 2006). MCC organization, in turn, depends on eisosome integrity. In *pil1Δ* cells, all MCC markers analyzed so far, including sterols, lose their characteristic punctate pattern and spread along the plasma membrane, eventually concentrating with eisosomes remnants (Walther *et al.*, 2006; Grossmann *et al.*, 2007, 2008). Moreover, *pil1Δ* cells lack furrow-like plasma membrane invaginations (Stradalova *et al.*, 2009). Thus eisosomes emerged as plasma membrane domain organizers, but

molecular mechanisms involved are still unknown. In recent years, the number of proteins shown to be physically linked to eisosomes has steadily increased (Grossmann *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009; Frohlich *et al.*, 2009; Aguilar *et al.*, 2010). However, we still lack molecular insight into eisosome function(s), since most of the eisosome-related proteins reported have little, if any, functional annotation.

In this study, we designed and executed a comprehensive bioinformatics analysis of eisosome proteins. We succeeded in identifying many unreported functional domains, and we demonstrate that eisosome core components Pil1 and Lsp1 belong to the membrane-sculpting Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) superfamily of proteins. We also found that eisosome-associated proteins Slm1 and Slm2 contain F-BAR domains that are necessary for targeting to eisosomes. Finally, we show that a functional Pil1 BAR domain is required for both eisosome assembly and plasma membrane domain organization.

RESULTS

Bioinformatics analysis of eisosome proteins

To gain insight into eisosome molecular function(s), we systematically analyzed a set of 20 eisosome-related proteins (Table 1). We selected structural components of eisosomes Pil1 and Lsp1 in addition to cytoplasmic proteins that colocalize or physically interact with Pil1 or Lsp1 (such as Pkh1 and Eis1). When present, we also included protein paralogues of those just noted (e.g., Rgc2). We first assessed the phylogenetic distribution of eisosome proteins, scanning the National Center for Biotechnology Information Reference Sequence database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) with default parameters (Altschul *et al.*, 1997). Most significant hits were restricted to fungi, suggesting that eisosomes may be confined to this kingdom. Homologues of core components, Pil1 and Lsp1, were present in the monophyletic group Dikarya but seem

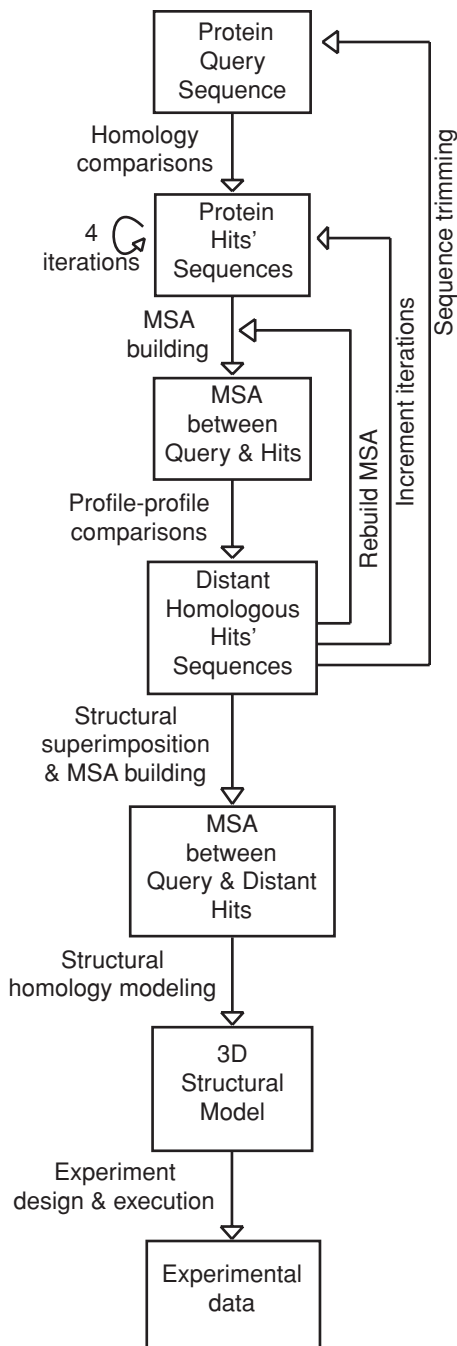


FIGURE 1: Bioinformatics pipeline. Protein sequence queries were subjected to homology comparisons using PSI-BLAST. Resulting hits were used to build MSAs, and then profile–profile comparisons were executed using both hidden Markov models–based algorithms (HHsearch) and COMPASS. Structure-based MSAs were then built using STAMP and T-Coffee and subsequently used for structure modeling. See *Materials and Methods* for details.

to be absent in Chytridiomycota, Microsporidia, and Mucoromycotina. Phylogenetic analyses of Pil1 and Lsp1 orthologues support a history of at least five independent duplications of an ancestral gene (Supplemental Figure S1). Evolutionary preservation of a molecular function does not necessarily rely on linear amino acid sequence similarities, so we also searched for conserved structural domains in the set of eisosome-related proteins. We designed a bioinformatics protocol consisting of exhaustive and iterative searches that gradu-

Name	Domain	Region (protein total length)
Pil1	BAR/N-BAR	53–214 (339)
Lsp1	BAR/N-BAR	53–214 (341)
Ygr130c	Coiled-coil	450–604 (816)
Eis1	Coiled-coil	447–676 (843)
Mdg1	Carbohydrate binding	8–71 (366)
	Carbohydrate binding	140–232 (366)
Pkh2	Pleckstrin homology	874–951 (1081)
Slm1	F-BAR	190–450 (686)
	Glutamine and asparagine rich	1–180 (686)
Slm2	F-BAR	166–426 (656)
	Glutamine and asparagine rich	1–120 (656)
Rgc1	F-BAR	157–461 (1083)
Rgc2	F-BAR	115–448 (1146)
Aim3	Glutamine and proline rich	31–320 (947)
Mrp8	Coiled-coil	7–116 (219)
Sap1	Coiled-coil	29–98 (897)
Yta6	Coiled-coil	22–250 (754)

TABLE 2: Protein domains found in distant homology analysis.

ally increased in sensitivity (see Figure 1 and *Materials and Methods* for details). Hits that were obtained with all algorithms used and that were consistent across all queries were considered as bona fide results (Table 2). Results obtained for the entire set are given in the supplemental materials. For certain queries (such as Msc3 and Ymr086w) this analysis did not yield reliable results, suggesting that some eisosome components harbor yet-unknown functional domains. Many of the remaining proteins had domains involved in protein–protein and protein–lipid interactions. We found the presence of BAR domains within Pil1, Lsp1, Slm1, Slm2, Rgc1, and Rgc2. The type of BAR domain found in Pil1 and Lsp1 was BAR/N-BAR, whereas in Slms and Rgcs putative F-BAR domains were evident. BAR domains are composed of three long α -helices that dimerize into crescent-shaped modules with positively charged surfaces. These modules act as molecular scaffolds that bind to and bend negatively charged lipid membranes (Frost *et al.*, 2009). BAR domains define a superfamily of proteins composed of three different families: the BAR/N-BARs, the F-BARs, and the I-BARs. In BAR/N-BAR and F-BAR dimers the positively charged concave face is the membrane-binding interface. In contrast, the convex face of I-BAR dimers mediates membrane binding. As a general mechanism of action, the positively charged surface of the BAR dimer imposes its rigid shape on the engaged membrane and thereby bends it (Frost *et al.*, 2009). Thus our bioinformatics results are consistent with eisosomes being plasma membrane-associated structures and being required for the formation of furrow-like invaginations. Because our main objective was gaining insight into eisosome molecular function(s), we focused on its core components, Pil1 and Lsp1.

Pil1 and Lsp1 harbor BAR domains

The alignments resulting from profile–profile comparisons including Pil1 and Lsp1 exhibited low amino acid identities and similarities (Supplemental Figure S2). This is expected because a low degree of

amino acid conservation is typical among members of the BAR domain superfamily (Masuda and Mochizuki, 2010). The crystal structures of *Drosophila* amphiphysin and the C-terminal domain of human arfaptin 2 provide well-known examples of this feature: despite very low pairwise sequence identities (<14%) these BAR domain-containing proteins exhibit high structural similarity (Peter et al., 2004). BAR domain-containing proteins bind and tubulate liposomes in vitro (Takei et al., 1999; Peter et al., 2004). To test the significance of our bioinformatics results, we performed liposome cosedimentation assays using purified full-length recombinant Pil1 and Lsp1. We observed that both proteins were able to bind liposomes (Figure 2A and Supplemental Figure S3). To test tubulation, we incubated the purified proteins with liposomes and examined their morphology by electron microscopy. Unlike the liposomes-only control, incubation with both Pil1 and Lsp1 resulted in deformed liposomes that exhibited tubules with similar diameter (52 ± 7 and 62 ± 9 nm, respectively; Figure 2B and Supplemental Figure S3). We also observed that Pil1 formed filaments, suggesting that they act as linear scaffolds for liposome tubulation (Figure 2 and Supplemental Figure S3). Thus, like other BAR domain-containing proteins, Pil1 and Lsp1 are capable of binding lipids and introducing membrane curvature in vitro.

Another functional feature of BAR domain-containing proteins is their capacity to form membrane-associated tubular structures when overexpressed in mammalian cells (Lee et al., 2002). To test whether Pil1 and Lsp1 induce the formation of tubular structures, untagged versions of Pil1 and Lsp1 were expressed from a strong human cytomegalovirus promoter in COS-7 cells. Given the high degree of conservation between Pil1 and Lsp1 (74% amino acid identity), both proteins can be monitored by immunofluorescence using the same polyclonal antibody. When overexpressed in COS-7 cells, Pil1 formed rod-like clusters 2–3 μ m in length (short tubes) and also dot-like clusters (Figure 3, top). The level of cytoplasmic Pil1 was found to be either very low or not detectable. Moreover, orthogonal (z, x) views of transfected cells revealed that Pil1 clusters were associated with the cell periphery (Supplemental Figure S4). Unlike Pil1, Lsp1 overexpression led to a heterogeneous population of cells exhibiting both abundant diffuse cytoplasmic material and long tubular clusters 6–7 μ m in length (Figure 3, middle). These results indicate that both Pil1 and Lsp1 are able to form tubular structures when overexpressed in a heterologous system such as COS-7 cells. Moreover, coexpression of Pil1 and Lsp1 led to a dramatic increase in the number of cells having long tubular structures, suggesting that these two proteins act cooperatively to form tubules (Figure 3, bottom). Overall, our in vitro and in vivo results indicate that Pil1 and Lsp1 are bona fide BAR domain-containing proteins.

Positive charges of Pil1 BAR domain are important for lipid binding and tubulation

We built structural models of Pil1 and Lsp1 to further investigate the domain identity of the eisosome core. We used the program Modeller (Marti-Renom et al., 2000), using five BAR domain crystal structures as templates: *Drosophila melanogaster* amphiphysin (1uru) and the human proteins sorting nexin 9 (2raj), APPL1 (adaptor protein containing pleckstrin homology [PH] domain, PTB domain, and leucine zipper motif 1) (2q13), Bin1 (2fic), and Arfaptin 2 (1i49). This selection of templates included those hits that showed the highest HHpred and COMPASS scores and more than 50% coverage of Pil1/Lsp1 amino acid sequences.

The structural models show features of the canonical topology of BAR domains: monomers with three long α -helices arranged into a twisted coiled-coil defining a six-helix bundle dimer (Figure 4, A and

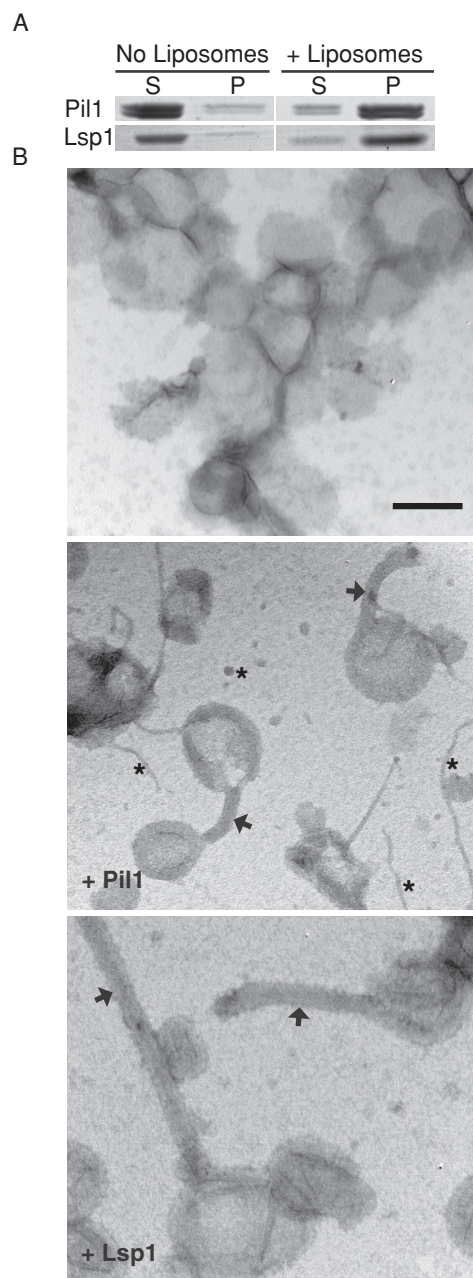


FIGURE 2: Pil1 and Lsp1 bind and tubulate liposomes in vitro. (A) Purified recombinant Pil1 and Lsp1 were incubated with or without bovine brain total lipid extract/PI(4,5)P2 liposomes, ultracentrifuged, and supernatant (S) vs. pellet (P) fractions were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie. (B) Representative electron micrographs of liposomes incubated with either Pil1 or Lsp1. Scale bar, 200 nm. Arrows and asterisks indicate liposome tubules and protein filaments, respectively.

B). Unlike amphiphysin, Pil1 and Lsp1 lack a predicted N-terminal amphipathic helix, and therefore we consider these to be classical BAR domain proteins. The structural models enabled us to identify amino acids that were potentially relevant for Pil1 and Lsp1 function. Indeed, we found a group of highly conserved residues that were structurally equivalent to residues important for amphiphysin function. Specifically, Pil1/Lsp1 Arg-145 and Lys-148 in the α 2 helix and Lys-159 and Lys-165 in the distal extended loop between helices α 2 and α 3 would result in positively charged surface patches on the

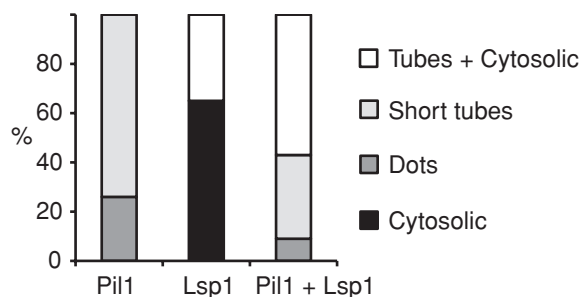
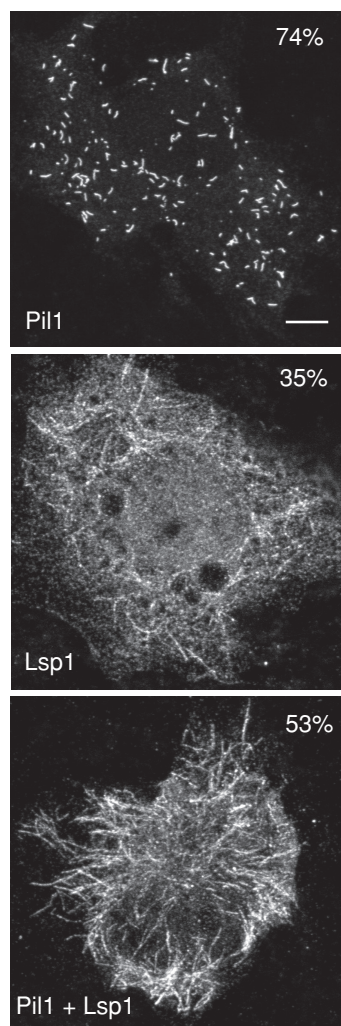


FIGURE 3: Pil1 and Lsp1 form tubular structures in vivo. Confocal immunofluorescence micrographs of COS-7 cells overexpressing untagged Pil1, Lsp1, or both proteins. Percentages indicate the proportion of positively transfected cells that exhibited the described pattern. Scale bar, 6 μ m. Bottom, quantitative analysis of the different distribution patterns of the proteins observed microscopically. More than 75 cells from three independent experiments were analyzed for each condition tested.

concave face of the dimer (Figure 4B). In amphiphysin, equivalent patches were shown to be necessary for binding to and bending of negatively charged membranes (Peter *et al.*, 2004). Further support for the functional importance of these residues was provided by the strict conservation within Pil1 (and Lsp1) homologues (Supplemental Figure S5). Because Pil1, but not Lsp1, is necessary for eisosome

assembly, we targeted conserved Pil1 residues. Thus we replaced Arg-145, Lys-148, Lys-159, and Lys-165 with glutamic acid residues to generate different Pil1 variants that were subsequently examined by cosedimentation assays and fluorescence microscopy. As shown in Figure 4B, all targeted residues are surface exposed. Thus substitutions in these residues would not be expected to alter the overall BAR domain structure (Peter *et al.*, 2004). As in amphiphysin, a double mutant (mut2) reduced the binding to liposomes, and the quadruple mutant (mut3) was more effective (Figure 4C). Remarkably, neither mut2 nor mut3 was able to tubulate liposomes, indicating that the targeted residues are crucial for membrane bending in vitro (Supplemental Figure S5). In addition, mut3 overexpressed in COS-7 cells had a cytoplasmic distribution, establishing that it is unable to promote formation of either dot-shaped clusters or tubular structures (Figure 4D). Thus Pil1 function is dependent on canonical BAR domain residues.

Loss of Pil1 BAR domain positively charged residues alters eisosome biogenesis and plasma membrane organization

Given that Pil1 controls eisosome biogenesis and plasma membrane organization, we asked whether the integrity of Pil1 BAR domain was required for these functions. We introduced BAR domain variants in the context of the *PIL1-GFP* fusion gene into yeast strains as the sole source of *PIL1*. When analyzed by confocal fluorescence microscopy, the single mutant Pil1-R145E showed defects in eisosome organization (Figure 5). This phenotype was also evident for both the extended-loop K159E K165E (mut1) and the helix α 2 R145E K148E (mut2) Pil1-GFP variants. In all cases fluorescence remained highly cytoplasmic, with only a few large eisosomes formed at the cell periphery (Figure 5). Similar to the phenotype exhibited by mut3 in COS-7 cells (Figure 4C), when the extended-loop and concave-surface double mutants were combined, virtually all yeast cells lacked eisosomes with mut3, being located almost exclusively in the cytoplasm (Figure 5, bottom).

Next, we tested whether other eisosomal proteins as well as MCC markers were affected. We monitored Cherry-tagged wild-type versions of Lsp1 and the integral membrane protein Sur7 in the context of GFP-tagged mut2 as the sole source of Pil1. Indeed, in mut2 *pil1* Δ cells, Lsp1 remained highly cytoplasmic, lost its regular plasma membrane pattern, and colocalized with mut2 (Figure 6A). Similarly, Sur7 dispersed homogeneously in the plasma membrane to form foci that colocalized with mut2 eisosomes (Figure 6B). Taken together, these results indicate that Pil1 BAR domain-positive patches are needed for both normal eisosome structure and plasma membrane domain organization.

To gain mechanistic insight, we further characterized the mut2 Pil1 variant. Whereas total protein levels were comparable between wild-type and mut2 Pil1, the number of eisosomes formed by mut2 was decreased threefold (Figure 7, A–C). We observed that mut2 eisosomes were larger and more heterogeneous than wild-type eisosomes (Figure 7D). We also observed that despite forming larger eisosomes, the overall proportion of plasma membrane-associated mut2 was five times lower than that of wild-type Pil1 (Figure 7E). These data suggest that mut2 is as stable as wild-type Pil1 but is defective in eisosome biogenesis. Eisosomes are formed de novo by gradual deposition of Pil1/Lsp1 on the plasma membrane of a nascent cell (Moreira *et al.*, 2009). Once formed, eisosomes were shown to be stable, having minimal exchange of assembled Pil1 subunits with the cytoplasmic pool (Walther *et al.*, 2006). Because mut2 associated poorly with the plasma membrane and remained mostly cytoplasmic, we asked whether mut2 incorporation into growing eisosomes was defective. To address this question, we measured

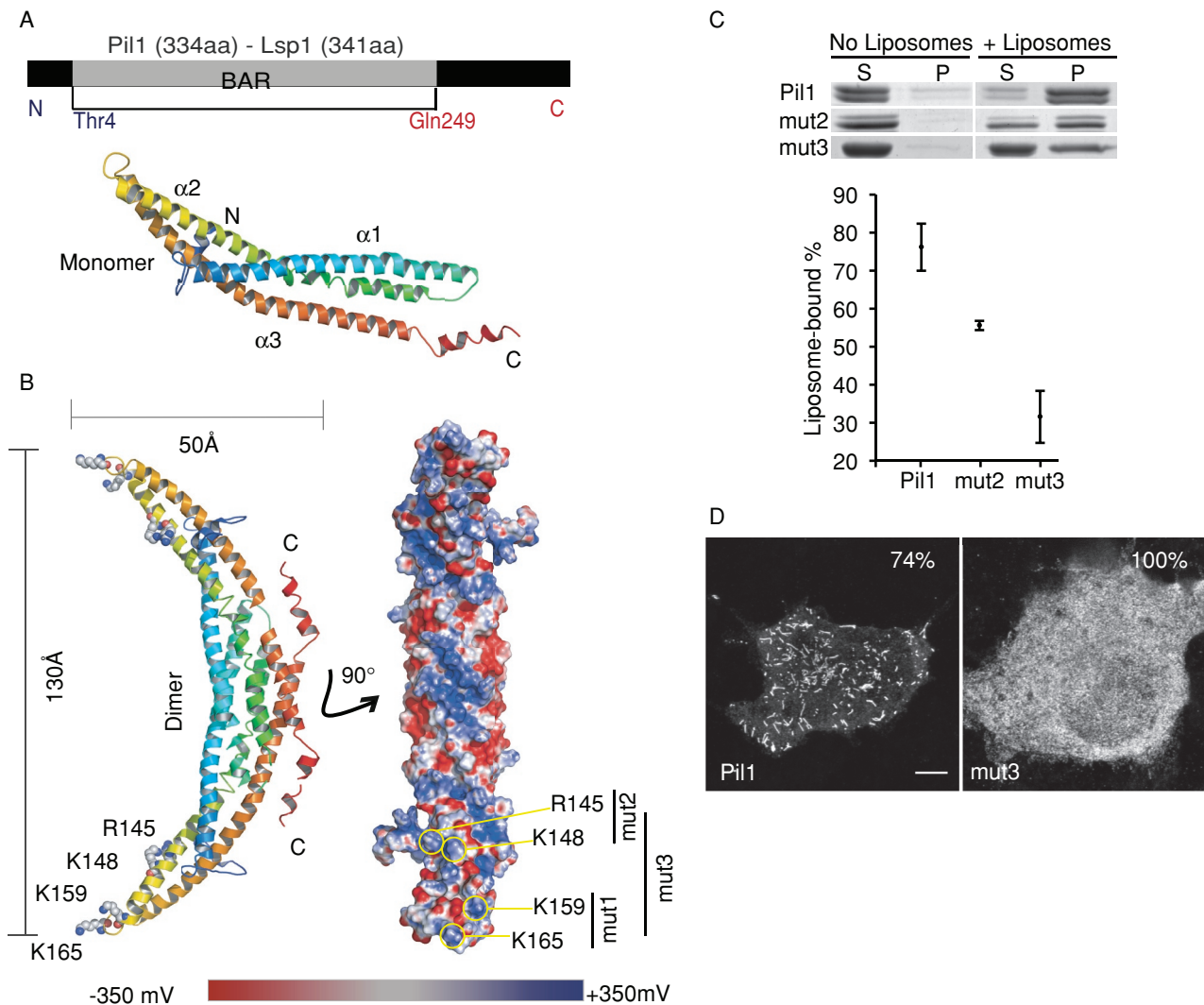


FIGURE 4: Structural modeling and functional analysis of Pil1 BAR domain. (A) Cartoon representation and homology model of a Pil1 monomer based on the crystal structures of five distant homologues. The chain is color coded from blue to red from N-terminus to C-terminus, respectively. Alpha helices are labeled. (B) Dimeric arrangement of Pil1. The modeled monomer was sequentially superimposed onto chains A and B of the *Drosophila* amphiphysin dimer (1URU). Cartoon representation (left) is rotated axially 90°, showing the electrostatic surface of the concave side of the dimer (right). Conserved basic residues that were targeted for mutagenesis studies are indicated. (C) Purified recombinant wild-type, mut2, and mut3 versions of Pil1 were tested for binding to liposomes. Quantification of two independent experiments is in the graph below; error bars correspond to standard deviations. (D) Confocal immunofluorescence micrographs of COS-7 cells overexpressing wild-type or mut3 Pil1. Percentages indicate the proportion of cells that exhibited the pattern shown. Scale bar, 6 μ m.

the formation rate of individual eisosomes in yeast cells expressing Pil1–green fluorescent protein (GFP). As we previously reported, Pil1 assembly was characterized by a period of rapid incorporation followed by a plateau (Figure 8A, left). Compared with wild type, mut2 was incorporated at a similar rate but without reaching a discernible plateau (Figure 8A, right). Prolonged assembly of mut2 was consistent with large eisosomes formed by this mutant but did not explain why it remained highly cytoplasmic (Figure 7). One possibility is that mut2 eisosomes are abnormally unstable, and therefore assembled mut2 subunits exchange at high rates with the cytoplasmic pool. To test whether mut2 eisosomes were unstable, we performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis of GFP-tagged wild-type and mut2 Pil1. Over a 45-min time period after eisosome bleaching, wild-type and mut2 Pil1-GFP fluorescence recovered with similar kinetics, indicating that mut2 eisosomes were as stable as

wild type (Figure 8B). Therefore it is unlikely that eisosome instability causes the observed high levels of cytoplasmic mut2. An alternative explanation for this phenotype is that in mut2 *pil1* Δ cells fewer sites become effective for eisosome assembly (Figure 7C). Given that mut2 protein levels (Figure 7B), assembly rate (Figure 8A), and eisosome stability (Figure 8B) were normal, a limited number of effective nucleation sites should cause a surplus of cytoplasmic mut2. Thus mut2 main defect may be due to failure in nucleation site formation. If correct, introduction of wild-type Pil1 in mut2 *pil1* Δ cells should restore the number of effective nucleation sites, leading to incorporation of mut2 into eisosomes of normal size. When Pil1-Cherry was introduced into mut2 cells, normal eisosome number and size were restored (Figure 8C). Thus we conclude that the conserved positive patch of the Pil1 concave face is important for generation of eisosome nucleation sites at the plasma membrane.

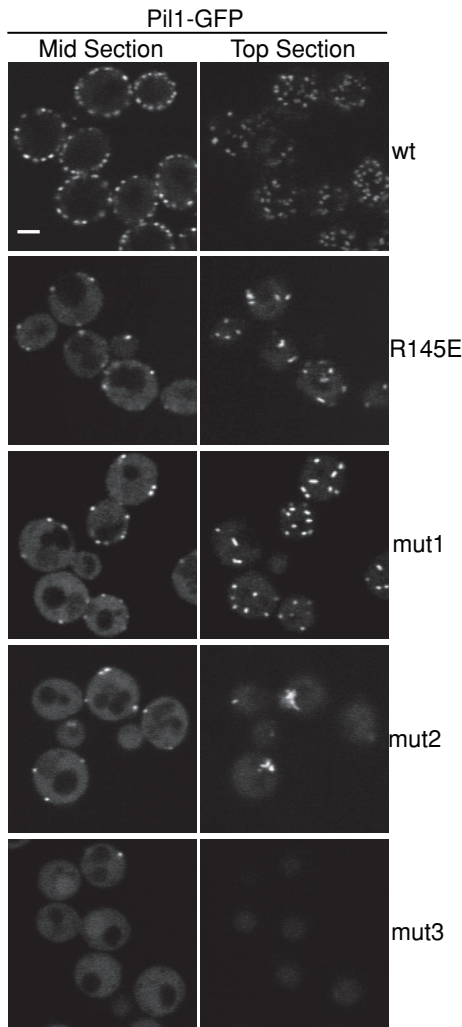


FIGURE 5: Pil1 BAR domain positively charged residues are necessary for eisosome assembly and organization. The C-terminally GFP-tagged versions of wild-type (wt), mut1, mut2, or mut3 Pil1 were expressed under control of the endogenous promoter in *pil1Δ* yeast cells. Representative confocal micrographs of mid and top sections are shown. Scale bar, 2 μ m.

F-BAR PH domains of Slm1 and Slm2 are sufficient for recruitment to eisosomes

Slm1 and Slm2 form an essential protein pair that promotes actin cytoskeleton organization, sphingolipid homeostasis, and cell growth (Audhya *et al.*, 2004; Tabuchi *et al.*, 2006). Fluorescently tagged Slms were visualized as plasma membrane foci that colocalized with eisosomes (Grossmann *et al.*, 2008). Slms mutants lacking PH domains associate poorly with the plasma membrane but are still able to form foci (Audhya *et al.*, 2004; Fadri *et al.*, 2005). Moreover, GFP fused to the PH domain of either Slm1 or Slm2 PH is homogeneously distributed along the plasma membrane, with no distinguishable foci (Yu *et al.*, 2004). These reports indicated that Slms PH domains are sufficient for plasma membrane binding but not for recruitment to eisosomes. Because our bioinformatics results suggested that Slm proteins have F-BAR domains, we tested whether these domains were important for Slms targeting to eisosomes. We generated GFP N-terminally tagged versions of each Slm F-BAR and F-BAR-PH domains and then analyzed their localization in the context of cells expressing Pil1-Cherry. We found that both F-BAR

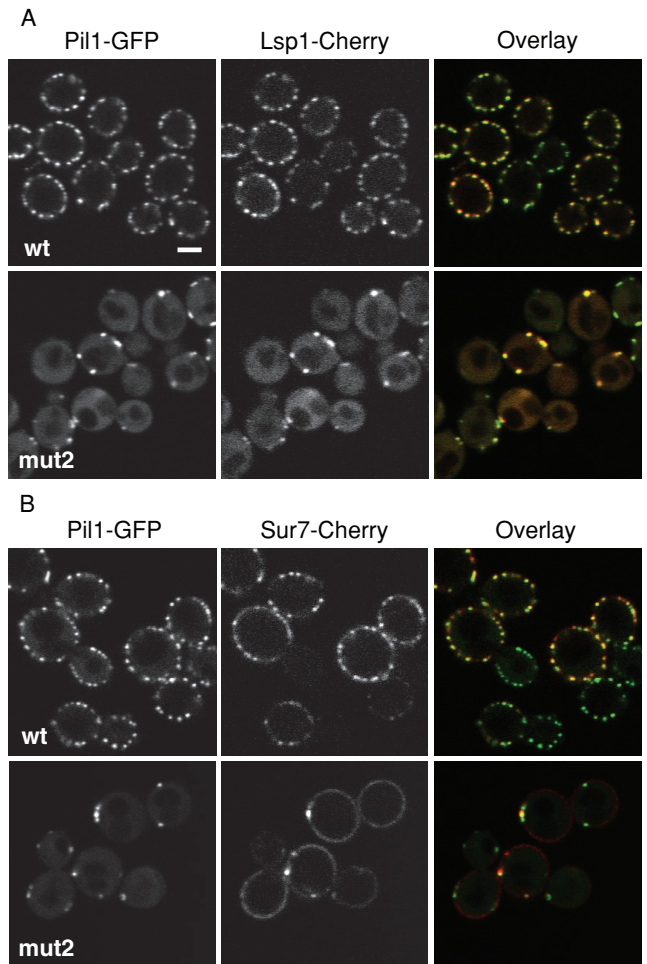


FIGURE 6: MCC organization is disrupted in Pil1 BAR domain mutants. Representative confocal midsection micrographs of Lsp1-Cherry (A) and Sur7-Cherry (B) cells expressing wild-type (wt) and BAR domain mutant variants of Pil1-GFP. Scale bar, 2 μ m.

domains disperse in the cytoplasm and also form foci that are not associated with the plasma membrane (Figure 9). However, when we tested fusions that contained both the F-BAR and the PH domains we found that they colocalized with Pil1-Cherry. These results indicate that the F-BAR and the PH domains collaborate to target Slm proteins to eisosomes.

DISCUSSION

Here we describe how a substantial fraction of eisosome proteins have domains predicted to engage in protein–protein and protein–lipid interactions. The core components of eisosomes, Pil1 and Lsp1, are BAR proteins. Pil1 BAR domain integrity is crucial for both eisosome assembly and plasma membrane domain organization. In addition, TORC2 substrates Slm1 and Slm2 have F-BAR domains that are needed for targeting into eisosomes.

Pil1/Lsp1 BAR domains and eisosome biogenesis

Our study establishes that Pil1 and Lsp1 are BAR domain-containing proteins. Cryo–electron microscopy data show that BAR domain-containing proteins form coats on membrane surfaces and introduce changes in their curvature (Frost *et al.*, 2009). Thus eisosomes may be arranged as bidimensional lattices that structure the yeast plasma membrane into furrow-like invaginations. Eisosome

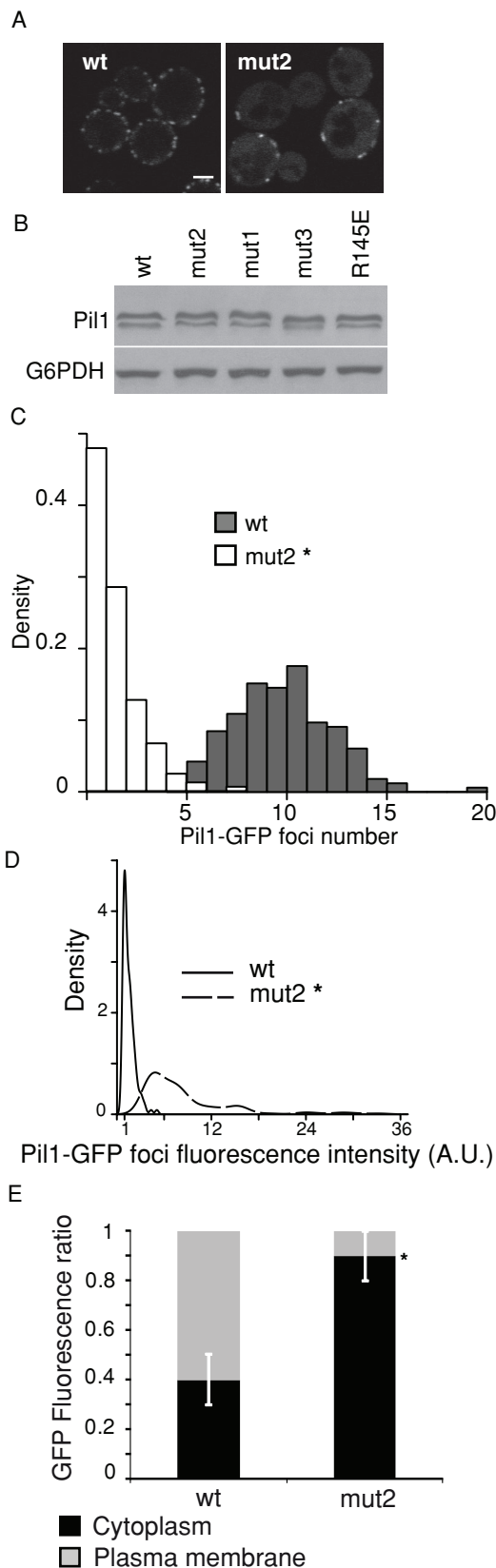


FIGURE 7: Mut2 Pil1 is defective in plasma membrane association and forms abnormally large assemblies. *pil1* Δ yeast cells expressing C-terminally GFP-tagged wild-type (wt) or mut2 Pil1 were grown in SC media at 30°C to mid-log phase and then imaged using the same microscope settings. Fluorescence measurements were made for a total of 150 yeast mother cells with small and medium-sized buds as

biogenesis can be divided into three main stages: nucleation site formation, active assembly, and completion of assembly (Moreira *et al.*, 2009). Eisosome random distribution indicates that nucleation sites are generated by stochastic events (Moreira *et al.*, 2009). We postulate that these stochastic events depend on direct binding of Pil1 to the plasma membrane. In this scenario, cytoplasmic Pil1 dimers (or low-order preassembled oligomers) collide with the newly formed plasma membrane and bind to negatively charged lipids involving BAR domain-mediated electrostatic interactions. Thus the formation of nucleation sites should be modulated by Pil1 cytoplasmic levels (number of collision events) and by lipid-protein interaction strength (stability of the nucleation site formed). Consistent with this hypothesis, the number of eisosomes per cell surface area is directly proportional to Pil1 availability: a surplus of Pil1 leads to an increase in eisosome surface density, and conversely, a shortage of Pil1 results in a decrease in eisosome density (Moreira *et al.*, 2009). The observed phenotypes for mut2 and mut3 Pil1 variants, which have reduced lipid-binding capacity, are also consistent with this hypothesis (Figures 4, 5, 7, and 8 and Supplemental Figure S6). Our analysis of mut2 eisosomes biogenesis and stability also agrees with the presence of defects in nucleation site formation (Figure 8).

Pil1 and Lsp1 are phosphorylated by the eisosome-associated kinases Pkh1 and Pkh2 (Zhang *et al.*, 2004; Walther *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008). Perturbation of Pil1 phosphorylation status affects eisosome assembly, but how assembly is affected is still debated (Walther *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008). Of interest, structural modeling analysis indicates that many phosphorylated Pil1 residues (Ser-26, Thr-28, Ser-41, Ser-45, Ser-59, and Ser-163) lie in the concave face of the BAR domain (Supplemental Figure S7 and additional supplementary material). Further studies dissecting the role of specific Pil1/Lsp1 residues on membrane binding and assembly should clarify this issue. It is highly likely that eisosome biogenesis involves other factors. Indeed, recent analysis of eisosome protein Ymr086w (FEA1) indicated that it regulates eisosomes biogenesis, either by stabilizing formation of nucleation sites or promoting bidimensional assembly (Peter Walter, personal communication).

Eisosome core proteins and BAR domain-dependent plasma membrane organization

Through this study eisosome-mediated membrane bending emerges as the driving force for MCC domain organization. Curvature-induced lipid segregation has been theoretically described and experimentally demonstrated (Markin, 1981; Roux *et al.*, 2005). Thus Pil1/Lsp1-mediated initial membrane bending may induce lipid segregation and thereby facilitate the recruitment of proteins and lipids required for both eisosome building and MCC maturation. This mechanism may be sustained by a positive-feedback cycle for protein/lipid recruitment and curvature propagation that eventually is shut down by Pil1 depletion. We do not know whether Pil1 and Lsp1 are sufficient to build and organize MCCs. In vitro reconstitution of MCC formation using synthetic lipids and purified proteins would be an important step in

part of three independent experiments. (A) Representative mid section confocal micrographs. Scale bar, 2 μ m. (B) Western blot analysis of Pil1-GFP mutants. G6PDH is shown as a loading control. (C) Density distribution of Pil1-GFP foci number in mid confocal sections. (D) Density distribution of fluorescence intensities of GFP foci. (E) Cytoplasmic and plasma membrane-associated GFP fluorescence ratios. Error bars correspond to standard deviations. * $p < 0.05$.

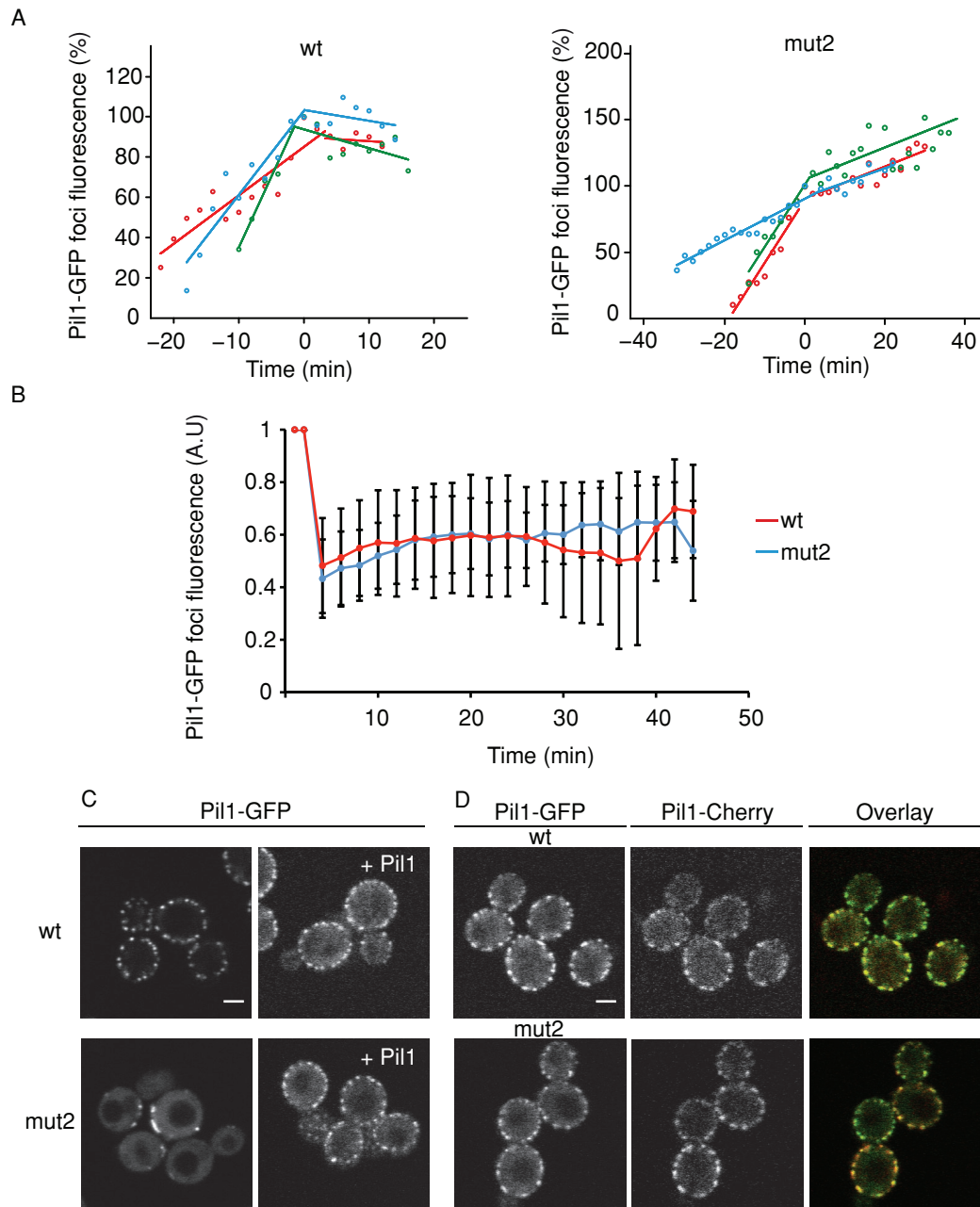


FIGURE 8: Mut2 Pil1 is defective in nucleation site formation. Yeast strains were grown in SC at 30°C to mid-log phase and then imaged by confocal 3D time-lapse microscopy under the same growth conditions. (A) Mut2 assembly rate is normal but prolonged. Measurement of fluorescence intensity of individual Pil1 foci in growing buds. Three representative examples are shown for each strain. Each data set was fit to a bilinear behavior using the Davies test. The point where a change in the slope was detected was defined as time 0 and 100% of relative fluorescence units. Negative slopes observed for wild-type Pil1-GFP fluorescence at late time points are likely due to inefficient bleaching correction (see *Materials and Methods* for details). (B) Mut2 eisosomes are as stable as wild type. Pil1 foci were bleached (time = 0), and fluorescence recovery was monitored over time. Fluorescence measurements were made for a total of 25 bleached foci as part of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. (C, D) Wild-type Pil1 complements mut2. Representative confocal micrographs of mid sections of yeast cells expressing fluorescently tagged versions of Pil1 are shown. (C) GFP-tagged wild-type and mut2 Pil1 cells with (right) and without (left) the wild-type *PIL1* gene under control of its own promoter. (D) GFP-tagged wild-type and mut2 Pil1 cells with an extra copy of wild-type *PIL1-mCherry* under control of *PIL1* native promoter. Scale bars, 2 μ m.

determining the minimal machinery required for eisosome-driven membrane compartmentalization.

There is a remarkable difference between Pil1/Lsp1 and currently described BAR domain-containing proteins: rather than being directly involved in transient changes of membrane structure, Pil1 and

Lsp1 mediate a permanent membrane remodeling event. *S. cerevisiae* BAR domain-containing proteins Rvs161/Rvs167 and Syp1 participate dynamically in different stages of clathrin/actin-mediated endocytosis (Stimpson *et al.*, 2009; Youn *et al.*, 2010). The role of eisosomes in yeast endocytosis is a matter of debate (Walther *et al.*,

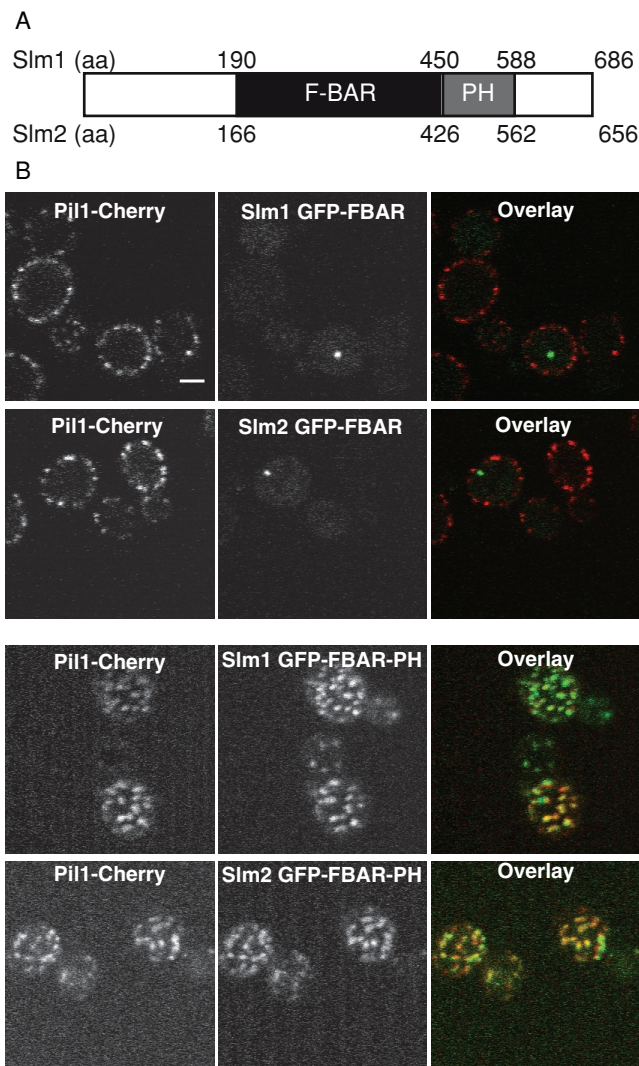


FIGURE 9: Slms F-BAR domains are required for targeting to eisosomes. (A) Cartoon representation of Slm1 and Slm2 domains analyzed in this work. (B) Representative confocal mid section micrographs of Pil1-Cherry cells expressing N-terminally tagged Slm1 and Slm2 F-BAR (top) and F-BAR-PH (bottom) domains. Scale bar, 2 μ m.

2006; Grossmann *et al.*, 2008). Our FRAP analysis showed that eisosomes are not as stable as we reported previously (Walther *et al.*, 2006). The reason for this discrepancy might be that here we monitored fluorescence recovery over a period five times longer, comparable to the length of half the cell cycle. This turnover of Pil1 may be evidence of normal maintenance of the Pil1/Lsp1 coat that holds the furrow-like invaginations. In addition, the turnover could reflect a highly dynamic subpopulation of Pil1 that, like other BAR domain-containing proteins, may be directly implicated in endocytic events.

Recruitment of Slms to the plasma membrane

Our bioinformatics results indicated that the so-called “Slm domains” are likely to be F-BAR domains. We have shown that these domains, in conjunction with their cognate PH domains, were sufficient for targeting to eisosomes (Figure 9). Work from the Emr and Hall groups described different temperature-sensitive Slm1 mutant alleles lacking plasma membrane localization (Audhya

et al., 2004). Of interest, many mutations found in these alleles involved basic residues of its putative F-BAR domain. Isolated Slms PH domains distributed GFP homogeneously at the plasma membrane (Yu *et al.*, 2004). Thus Slms PH domains may confer a broad specificity for the plasma membrane, whereas the F-BAR domains refine this specificity to eisosome-associated plasma membrane domains (MCCs). What do F-BAR PH Slms domains interact with in MCCs? It is possible that an unidentified protein mediates Slms recruitment. However, since PH and BAR domains bind negatively charged lipids, it seems more likely that Slms targeting is mediated by protein–lipid interactions. In vitro binding assays showed that Slms PH domains have very low phosphoinositide-binding specificity (Yu *et al.*, 2004). Several F-BAR domains preferentially bind phosphatidylserine and phosphoinositides (Itoh *et al.*, 2005). Thus it is possible that Slms F-BAR PH domains have a characteristic phosphoinositide-binding preference that is specific for MCCs. As such, it will be of interest to test the membrane-binding preferences of Slms PH domains with and without their cognate F-BAR domains. Another possibility is that Slms F-BAR PH domains sense two MCC features: lipid composition and curvature. Cryo–electron microscopy studies of membrane-bound BAR domain-containing proteins coats showed the existence of periodic discontinuities that leave enough room for access of other proteins to the lipid leaflet (Frost *et al.*, 2008). Thus Slm proteins may interact with the plasma membrane furrow-like invaginations percolating a Pil1-Lsp1 coat.

Slms are TORC2 effectors, they physically interact with TORC2 protein Avo2, and both are phosphorylated in vitro by TORC2 (Audhya *et al.*, 2004). An apparent paradox with this physical link between Slms and TORC2 is that the expected localization for Slms are MCTs, whereas they were found to be localized to eisosomes. Live microscopy data monitoring Slms in the context of TORC2 and eisosomes will help to resolve this issue. It is proposed that, by integrating information from different plasma membrane domains, Slm proteins regulate cytoskeleton dynamics, cell growth, and sphingolipid metabolism (Aronova *et al.*, 2008; Berchtold and Walther, 2009). Further characterization and manipulation of domain-specific Slms targeting cues will facilitate analysis of these intricate signaling networks.

MATERIALS AND METHODS

Growth conditions, yeast strains, and plasmids

Unless otherwise indicated, yeast cells were grown at 30°C in synthetic complete (SC) media. All yeast strains used are listed in Supplemental Table S1. Gene replacements were done by homologous recombination using a standard PCR-based method (Longtine *et al.*, 1998). Variants of pRS306-PIL1-GFP plasmid (Walther *et al.*, 2007) were obtained by site-directed mutagenesis (QuikChange; Stratagene, Santa Clara, CA). Different Slm domains were cloned into pEW331. The amino acid residues included in various constructions were based on complete open reading frame (ORF) sequences (*Saccharomyces* Genome Database [SDG], <http://www.yeastgenome.org>) and were Slm1 BAR 155–484, Slm1 BAR PH 155–588, Slm2 BAR 145–461, Slm2 BAR PH 145–570, Rgc1 BAR 136–510, and Rgc1 BAR PH 136–731. All constructions were verified by DNA sequencing.

Bioinformatics standard and distant homologue searches

Initial searches were done using Position-Specific Iterative (PSI)-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) against the nonredundant database. After the fourth iteration, hits with E values $<10^{-3}$ were selected for further analysis. These selected hits were, in turn, aligned with the

halign procedure from the HHsearch package. Resulting multiple sequence alignments (MSAs) were used to scan the PDB, Pfam, and SCOP databases (Berman *et al.*, 2007; Andreeva *et al.*, 2008; Finn *et al.*, 2010), using the algorithms of HHsearch (Soding, 2005) and COMPASS (Sadreyev *et al.*, 2003). In the case of HHsearch, the CDD (Marchler-Bauer *et al.*, 2007) and SUPFAM (Pandit *et al.*, 2002) databases were also queried. Sequences generating no significant results were iteratively chopped, resubmitted (with sequentially modified BLAST parameters), and resulting MSAs were inspected and edited.

Structural modeling

Homology model for the monomer of Pil1 was built using five different BAR/N-BAR domains as structural templates (1URU, 2RAJ, 2Q13, 2FIC, and 1149). Template crystal structures were superimposed using STAMP (Russell and Barton, 1992). Pil1 and Lsp1 sequences were aligned with this structure-based MSA using T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000). The final MSA was used to build the homology structural model using Modeller (version 9v3). The best model obtained from 50 iterations was determined with the DOPE method, included in the Modeller suite. The overall quality of this model, including side chain and rotamer fixing and rebuilding, was verified with Coot (Emsley and Cowtan, 2004). Dimer assembly was manually built using Coot based on the crystal structure of the amphiphysin BAR domain from *D. melanogaster* as reference (1URU) (Peter *et al.*, 2004). Surface interaction between monomers in the Pil1 dimer obtained were optimized energetically with RosettaDock (Sircar *et al.*, 2010). Electrostatic calculations were made with the Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (Baker *et al.*, 2001). All figures illustrating protein structure were prepared using PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

Phylogenetic reconstructions

Phylogenetic trees were inferred using phyML (Guindon and Gascuel, 2003) with JTT +G+F as protein evolution model (Jones *et al.*, 1992). The evolution model was chosen using ProtTest (Abascal *et al.*, 2005).

Recombinant protein expression and purification

The entire coding sequences of Pil1, mut2, mut3, and Lsp1 were subcloned into the pGEX4T2 vector (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ) and expressed in *Escherichia coli* BL21D3pLys strain. For protein expression, cells were grown to OD_{600 nm} 0.8 in 2 l of Luria–Bertani medium (supplemented with carbenicillin 100 µg/ml) at 37°C and 220 rpm. Then 1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside was added, and cells were grown another 4 h at 25°C and 220 rpm. Cells were harvested and suspended in lysis buffer (1× phosphate-buffered saline [PBS], 0.5 M NaCl, 2 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol [DTT], 400 µg/ml lysozyme, and Complete Protease Inhibitor [Roche Applied Science, Mannheim, Germany]). Cells were disrupted by sonication, and the soluble protein fraction was obtained by centrifugation (17,500 × *g*, 45 min, 4°C) and filtration (0.45-µm filter; Millipore, Billerica, MA). The soluble fraction was injected in a GStap HP (GE Healthcare), and on-column digestion with 5 U/mg of thrombin was performed overnight at 22°C. A second purification step was performed using a Resource-Q ionic interchange column (GE Healthcare). Protein was eluted using 1× PBS with a linear gradient of 1 M NaCl from 1 to 100% and then stored at 4°C. Protein integrity and identity were analyzed by a SDS–PAGE electrophoresis, followed by mass spectrometry.

Liposome preparation, liposome binding, and in vitro tubulation assays

Lipids were combined in mixtures composed of (85/15 mass %) bovine brain total lipid extract/PI(4,5)P2 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), dissolved in chloroform/methanol (2/1 vol %), dried under a stream of argon in glass vials, and desiccated under high-vacuum for 1 h. Lipids were then hydrated with 2 mM DTT in 1× PBS buffer, gently vortexed, subjected to four freeze–thaw cycles, and immediately extruded using 100-nm filters. Homogeneity of liposome preparations was tested using dynamic light scattering. For liposome binding assays, proteins were precentrifuged at 100,000 × *g* for 15 min at 4°C. Protein supernatants were quantified, diluted to 1.6 µM, and incubated with liposomes (1.9 µg/µl) in 1.6 mM DTT 1× PBS buffer for 10 min at room temperature. Protein–liposome mixtures were then centrifuged at 100,000 × *g* for 15 min at 4°C. Supernatant versus pellet fractions were separated by SDS–PAGE and stained with Coomassie. Images of the Coomassie-stained gels were captured using an ImageScanner (GE Healthcare) and analyzed with tool “gels” from ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Liposome-bound values were determined as the pellet percentage in the presence of liposomes subtracted by the same percentage without liposomes.

For tubulation assays, liposomes (1.2 µg/µl) were incubated with recombinant protein (25 µM) for 10 min at room temperature. Samples were loaded on carbon-coated copper grids, negatively stained using 1% uranyl acetate for 2 min at room temperature, and imaged using a JEOL (Peabody, MA) JEM 1010 electron microscope operated at 80 kV.

Fluorescence microscopy

For fluorescence microscopy, yeast cells were grown to mid-log phase in SC medium at 30°C. Cells were mounted in the same media on glass-bottom microplates previously coated with concanavalin A and directly imaged with a Leica TCS SP5 confocal microscope at 30°C. For quantitative analyses of mut2 distribution, fluorescence images to be compared were taken using the same microscope settings. Images were analyzed using ImageJ software. Three independent experiments were done for each analysis, and 50 cells per experiment were analyzed. Stack-by-stack region-of-interest (ROI) subtraction was used for background correction. Because eisosomes are formed *de novo* in daughter cells, only mother cells were analyzed. For eisosome foci analysis a segmentation procedure was used using the manual threshold tool of ImageJ software (with the same parameters used for all of the images of each strain analyzed). Plasma membrane-associated fluorescence of each cell was calculated as the sum of fluorescence of all foci. Then cytoplasm fluorescence was calculated as the subtraction of plasma membrane fluorescence from total fluorescence. Statistical analysis was done using nonparametric tests (Mann and Whitney, 1947).

To measure eisosome formation rate, time-lapse movies were convolved (Huygens Essential, version 3.5) and further analyzed. Individual eisosomes were identified and manually tracked over time. For each time point, Z-sum projections of three stacks encompassing the whole eisosome were used to calculate the integrated fluorescence density. For bleaching correction, total fluorescence of mother cells was recorded over time. Nonimaged mother cells did not undergo detectable changes in Pil1–GFP fluorescence during the time course of the experiment (80 min). Thus we assumed that in time-lapse movies the decay in fluorescence exhibited by mother cells was due to photobleaching. A bleaching correction factor *C* was independently calculated for each movie: $C = \frac{ID_i}{ID(t)}$, where *ID_i* is the averaged whole-mother-cell integrated fluorescence density at

time 0 and ID(t) is the density at a given time. Each data set was analyzed using the package Segmented (<http://cran.r-project.org>). First, the Davies test (Davies, 1987) was applied to evaluate whether each data set adjusted to a linear model with either a single break point (two lines) or no break point (one line). For all cases a single break point was detected with a p value of 0.05. Then segmented regression analysis was applied to determine the pair of slopes found for each data set.

For FRAP experiments cells were first imaged over six Z-stacks using a pinhole of 2 Airy units. ROIs were then bleached with 10 high-intensity laser pulses, and postbleach images were acquired every 2 min using the same settings as in prebleach scanning. Image analysis was done using the double normalization method (Phair *et al.*, 2004). Briefly, average prebleach whole-mother-cell intensity ($I_{\text{whole-pre}}$) divided by the normalized whole-mother-cell intensity at each time point in the postbleach period [$I_{\text{whole-pre}}(t) - I_{\text{base}}(t)$] was multiplied by FRAP-normalized ROI intensities at that time point ($\frac{I_{\text{ROI}}(t) - I_{\text{base}}(t)}{I_{\text{ROI-pre}}}$). Thus, for each time point the double-normalized FRAP values [$I_{\text{ROI-dn}}(t)$] were calculated using the following expression:

$$I_{\text{UP-ROI-dn}}(t) = \frac{I_{\text{ROI}}(t) - I_{\text{base}}(t)}{I_{\text{ROI-pre}}} \times \frac{I_{\text{whole-pre}}}{I_{\text{whole}}(t) - I_{\text{base}}(t)}$$

where $I_{\text{ROI}}(t) - I_{\text{base}}(t)$ is the normalized ROI intensity at each time point, $I_{\text{ROI-pre}}$ is the prebleach ROI intensity, and $I_{\text{base}}(t)$ is the background intensity corresponding to each case (ROI and whole mother cell) at each time point.

Western blots

Cells were grown under the same conditions that were used for live confocal microscopy. Cell-free crude extracts were prepared by bead-beating lysis using 8 M urea, 50 mM HEPES, pH 7.4. Protein concentration was determined by the BCA method (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). An amount of 10 µg/lane of total protein extract was electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST) and 5% nonfat milk for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were washed with PBST, incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature, and developed using an enhanced chemiluminescence kit (Amersham Biosciences, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ). For Pil1 detection polyclonal anti-Pil1 antibody was used at a 1:20,000 dilution (Moreira *et al.*, 2009). Anti-glucose-6-phosphate dehydrogenase (a-G6PDH) antibody (Sigma-Aldrich) was used at a 1:10,000 dilution.

Constructs, COS-7 cell transfection, and immunofluorescence

Pil1, Pil1 mut3, and Lsp1 genes were subcloned in pcDNA3.1+ plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA). Slm2 and Rgc1 BAR and BAR PH domains were cloned in plasmid pEGFP-C3 (Clontech, Mountain View, CA). The limits of constructs, in base pair number of entire ORF sequence from the SGD, are Slm2 BAR 145–461, Slm2 BAR-PH 145–570, Rgc1 BAR 136–510, and Rgc1 BAR-PH 136–731. COS-7 cells (kindly provided by Carlos Robello) were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Coverslip-cultured cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). For immunocytochemistry, after 24 h of transfection, cells were fixed in 4% formaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min, and immunostained with an anti-Pil1 antibody. Secondary antibodies

were conjugated with Alexa Fluor 488 or 633 (Invitrogen). The coverslips were mounted using ProLong Gold antifade reagent from Invitrogen and imaged after 24 h with a Leica TCS SP5 confocal microscope.

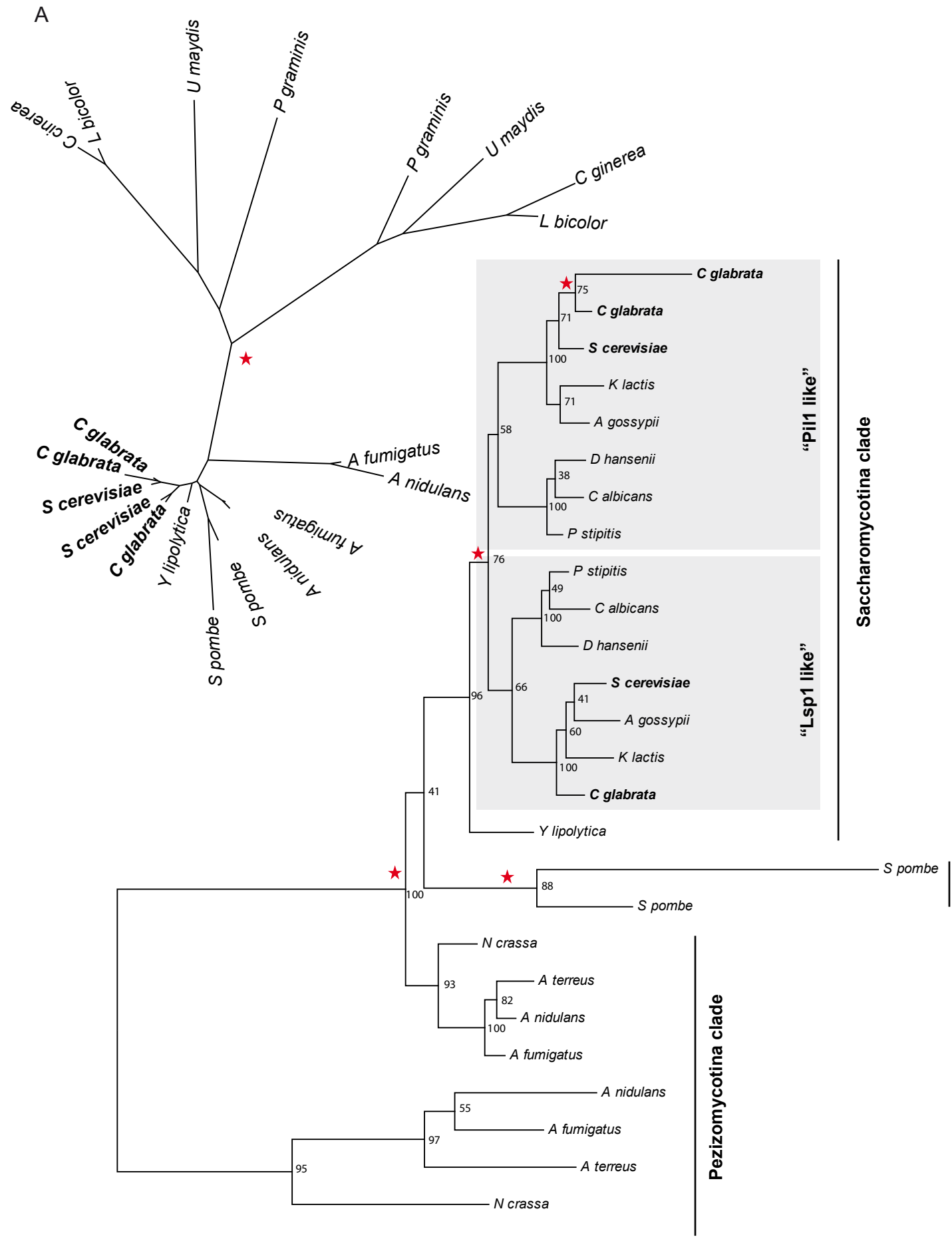
ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hugo Naya for help with statistical analysis and Javier Valdez, Paul Gill, Arlinet Kierbel, Hector Romero, and Alejandro Colman-Lerner for discussions and critical reading of the manuscript. We also thank the Recombinant Proteins Unit, Ana Denicola, and Ernesto Cuevasanta for help with proteins and liposomes and Ariel Chaparro, Ivana Faccini, and Virginia Gorrostorrazo for administrative support. This work was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (INNOVA URUGUAY-DCI-ALA/2007/19.040 URU-UE, P.S.A.; FCE2007_377, M.G.; Sistema Nacional de Becas, A.O.-C.; and Sistema Nacional de Investigadores, L.H., P.S.A.) and the Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas.

REFERENCES

- Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.
- Aguilar PS *et al.* (2010). A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nat Struct Mol Biol* 17, 901–908.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Andreeva A, Howorth D, Chandonia JM, Brenner SE, Hubbard TJ, Chothia C, Murzin AG (2008). Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. *Nucleic Acids Res* 36, D419–D425.
- Aronova S, Wedaman K, Aronov PA, Fontes K, Ramos K, Hammock BD, Powers T (2008). Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell Metab* 7, 148–158.
- Audhya A, Loewith R, Parsons AB, Gao L, Tabuchi M, Zhou H, Boone C, Hall MN, Emr SD (2004). Genome-wide lethality screen identifies new P14,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* 23, 3747–3757.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10037–10041.
- Berchtold D, Walther TC (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell* 20, 1565–1575.
- Berman H, Henrick K, Nakamura H, Markley JL (2007). The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Res* 35, D301–303.
- Collins SR, Kemmeren P, Zhao XC, Greenblatt JF, Spencer F, Holstege FC, Weissman JS, Krogan NJ (2007). Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 6, 439–450.
- Davies RB (1987). Hypothesis testing when a nuisance parameter is present only under the alternative. *Biometrika* 74, 33–43.
- Deng C, Xiong X, Krutchinsky AN (2009). Unifying fluorescence microscopy and mass spectrometry for studying protein complexes in cells. *Mol Cell Proteomics* 8, 1413–1423.
- Emsley P, Cowtan K (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126–2132.
- Fadri M, Daquinag A, Wang S, Xue T, Kunz J (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol Biol Cell* 16, 1883–1900.
- Finn RD *et al.* (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 38, D211–D222.
- Frohlich F, Moreira K, Aguilar PS, Hubner NC, Mann M, Walter P, Walther TC (2009). A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J Cell Biol* 185, 1227–1242.
- Frost A, Perera R, Roux A, Spasov K, Destaing O, Egelman EH, De Camilli P, Unger VM (2008). Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* 132, 807–817.

- Frost A, Unger VM, De Camilli P (2009). The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* 137, 191–196.
- Grossmann G, Malinsky J, Stahlshmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarova M, Tanner W (2008). Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol* 183, 1075–1088.
- Grossmann G, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* 26, 1–8.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52, 696–704.
- Ho Y *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180–183.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4569–4574.
- Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell* 9, 791–804.
- Johannes L, Mayor S (2010). Induced domain formation in endocytic invagination, lipid sorting, and scission. *Cell* 142, 507–510.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8, 275–282.
- Krogan NJ *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637–643.
- Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297, 1193–1196.
- Lingwood D, Simons K (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46–50.
- Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953–961.
- Luo G, Gruhler A, Liu Y, Jensen ON, Dickson RC (2008). The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J Biol Chem* 283, 10433–10444.
- Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* 14, 4427–4436.
- Mann HB, Whitney DR (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* 18, 50–60.
- Marchler-Bauer A *et al.* (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 35, D237–D240.
- Markin VS (1981). Lateral organization of membranes and cell shapes. *Biophys J* 36, 1–19.
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 291–325.
- Masuda M, Mochizuki N (2010). Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Semin Cell Dev Biol* 21, 391–398.
- Moreira KE, Walther TC, Aguilar PS, Walter P (2009). Pil1 controls eisosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 20, 809–818.
- Munro S (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377–388.
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000). T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205–217.
- Pandit SB, Gosar D, Abhiman S, Sujatha S, Dixit SS, Mhatre NS, Sowdhamini R, Srinivasan N (2002). SUPFAM—a database of potential protein superfamily relationships derived by comparing sequence-based and structure-based families: implications for structural genomics and function annotation in genomes. *Nucleic Acids Res* 30, 289–293.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495–499.
- Phair RD, Gorski SA, Misteli T (2004). Measurement of dynamic protein binding to chromatin in vivo, using photobleaching microscopy. *Methods Enzymol* 375, 393–414.
- Poveda JA, Fernandez AM, Encinar JA, Gonzalez-Ros JM (2008). Protein-promoted membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1583–1590.
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P, Goud B (2005). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J* 24, 1537–1545.
- Russell RB, Barton GJ (1992). Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins* 14, 309–323.
- Sadreyev RI, Baker D, Grishin NV (2003). Profile-profile comparisons by COMPASS predict intricate homologies between protein families. *Protein Sci* 12, 2262–2272.
- Sircar A, Chaudhury S, Kilambi KP, Berrondo M, Gray JJ (2010). A generalized approach to sampling backbone conformations with RosettaDock for CAPRI rounds 13–19. *Proteins* 78, 3115–3123.
- Soding J (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21, 951–960.
- Stimpson HE, Toret CP, Cheng AT, Pauly BS, Drubin DG (2009). Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol Biol Cell* 20, 4640–4651.
- Stradalova V, Stahlshmidt W, Grossmann G, Blazikova M, Rachel R, Tanner W, Malinsky J (2009). Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci* 122, 2887–2894.
- Tabuchi M, Audhya A, Parsons AB, Boone C, Emr SD (2006). The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol Cell Biol* 26, 5861–5875.
- Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1, 33–39.
- Tanos B, Rodriguez-Boulan E (2008). The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* 27, 6939–6957.
- Walther TC, Aguilar PS, Frohlich F, Chu F, Moreira K, Burlingame AL, Walter P (2007). Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO J* 26, 4946–4955.
- Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998–1003.
- Youn JY *et al.* (2010). Dissecting BAR domain function in the yeast amphiphysins Rvs161 and Rvs167 during endocytosis. *Mol Biol Cell* 21, 3054–3069.
- Young ME, Karpova TS, Brugger B, Moschenross DM, Wang GK, Schneider R, Wieland FT, Cooper JA (2002). The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol* 22, 927–934.
- Yu H *et al.* (2008). High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* 322, 104–110.
- Yu JW, Mendrola JM, Audhya A, Singh S, Keleti D, DeWald DB, Murray D, Emr SD, Lemmon MA (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 13, 677–688.
- Zhang X, Lester RL, Dickson RC (2004). Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem* 279, 22030–22038.



Olivera-Couto et al., Figure S1

PIL1 100 200 300 400 500 600 700

PIL1 ...TYSLRNSRAPTASQLQNPPPPSTTKGRFFGKGG**L**A**Y**S**F**R**R**S**A**A**G**A**F**G**P**E**L**S**R**K**L**S**Q**L**V**K**I**E**K**N**V**L**R**S**M**E**L**T**A**
li49SR..T.V.D.**L**E**L**E**L**E**L**O**I**E**L**L**R**E**T**K**R**K**Y**E**S**V**L**O**I**G**R**A**L**T**A**H**L**Y**S**.**L**L**O**T**Q**
luruKVDR..T....AD**E**I**F**D**D**H**L**N**N**F**N**R**Q**Q**A**S**A**N**R**L**Q**K**E**F**N**Y**I**R**C**V**R**A.**A**Q**A**A**S**
2ficEQF.EQCV**Q**N**F**N**K**Q**L**T**E**G**T**R**L**O**K**D**L**R**T**Y**L**A**S**V**K**A**M**H**E**A**S**K**K**.**L**N**E**C**L**
2q13EETL.....EDSP**Q**T**R**S**L**L**G**V**F**E**E**D**A**T**A**I**S**N**Y**M**N**Q**L**Y**Q**A**M**H**R**I**Y**D**A**Q**N**E.**L**S**A**A**T**
2raj AERDEL**A**G**V**M**I**F**S**T**M**E**P**E**A**P.D**L**.....D**L**.V**E**I**E****Q**K**C**E**A**V**G**K**F**T**K**A**M**D**D**G**V**K**E**L**L**T**V**G**Q**E**H**W**K**R**C**T**G**P**L**P**K**E**Y**
LSP1 ...TYSLRNQRAPTA**A**E**L**Q**A**P**P**P**P**S**S**T**K**S**K**F**F**G**K**A**S****I**A**S**S**F**R**K**N**A**A**G**N**F**G**P**E**L****A**R**K****L**S**Q**L**V**K**T**E**K**G**V**L**R**A**M**E**V**V**A**

PIL1 800 900 1000 1100 1200

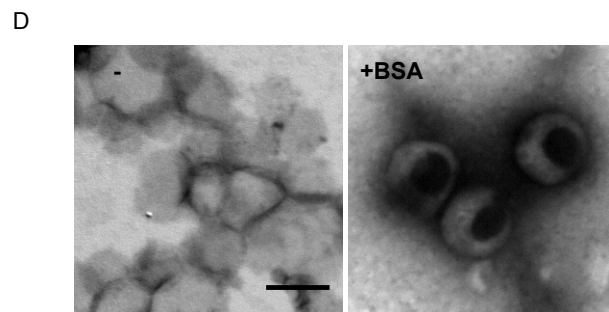
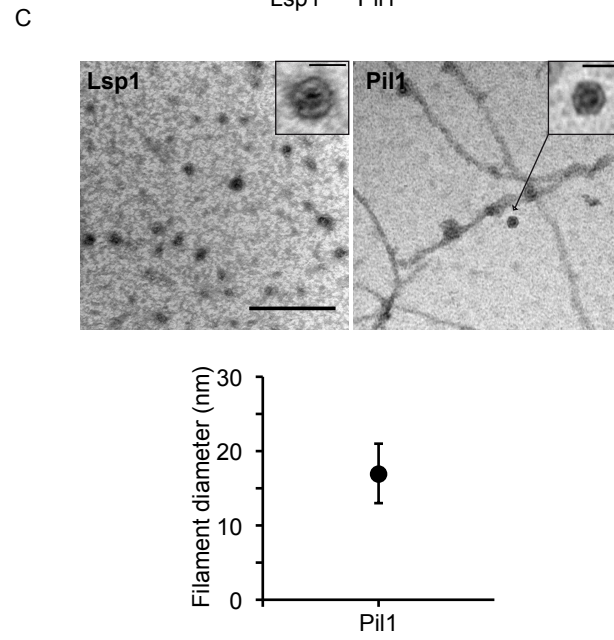
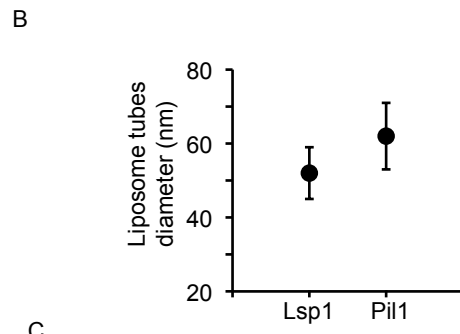
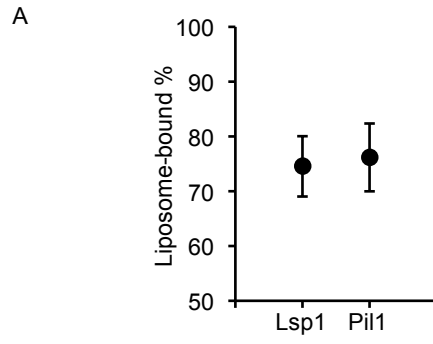
PIL1 N**E**R**R**D**A****A**K**Q**L**S**.....I**W**G**L**E**N**D**D**D**V**S**D**I**T**D**K**L**G**V**L**I**Y**E**V**S**E**L**D**D**Q**F**I**D**R**
li49 H**A**L**G**D**A**F**A**D**L**S.Q.....K**S**P**E**L.....Q.E.E**F**G**Y**N**A**E**T**Q**K**L**L**C**K**N**G**E**T**L**L**G**A**.V**N**.F.F**V**S**S**I**N**T.
luru K**T**L**M**D**S**V**C**E**I**Y**E**P.....Q.....W.S**G**.Y**D**A**L**Q**A**Q**T**G**A**S**E**S**L**W**A**D**F**A**H**K**L**G**D**Q.V**L**I**P**L**N**T.
2fic Q**E**V**Y**..E.....P**D**W.P**G**R**D**E**A**N**K**I**A**E**N**D**L**L.W**M**.D.Y**H**Q**K**L**V**D**Q**
2q13 H**L**T**S**K**L**L**K**E**Y**..E**K**Q**R**F**P**L**D**..E**V**M.....S**S**T..L**Q**O**F**S**K**V**I**D**E**L**S**S**C**H**A**V**L**S**T**Q.L**A**.D**A**M**M**F**P**I**T**Q.
2raj Q**K**I**G**K**A**L**Q**S**L**A.T.....V**F**S**S**G**Y**Q**E**T**D**L**N**.D**A**I**T**.E**A**G**K**T**Y**E**E****I**A**S**L**V**A**E**Q**P**K**D**L**H**.F.L**M**E**C**N**H**E.
LSP1 S**E**R**R**E**A****A**K**Q**L**S**.....L**W**G**A**D**N**D**D**D**V**S**D**V**T**D**K**L**G**V**L**I**Y**E**L**G**E**L**Q**D**Q**F**I**D**K**

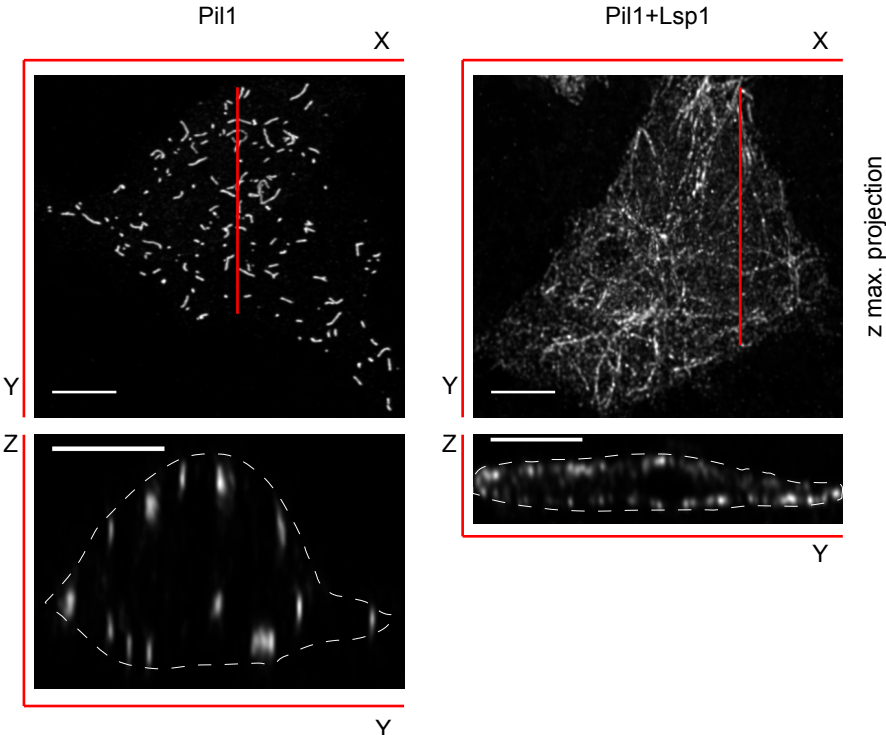
PIL1 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900

PIL1 Y**D**Q**Y**R**L**T**L**K**S**I**R**D**I**E**G**S**V****Q**P**S**R**D**R**K**D**K**I**T**D**K**I**A**Y**L**K**Y**K**D**P**Q**S**P**.....K**I**E**V**L**E**Q**E**L**V**R**A**E**A**E**S**L**V**A**E**A**Q**L**S**N**I**T**R**
li49 L**V**T**K**..T**M**E**D**T**L**M**T**V**K**Q**Y**E**A**A**R**L**E**Y**D**A**Y**R**T**D**L**E**E**L**S**L**G**...P**R**..D..A**G**T**R**..G**R**L**E**S**A**Q**A**T**F**Q**A**H**R**D**K**Y**E**K**L**R**G**
luru Y**T**G...Q**F**P**E**M**K**K**V**E**K**R**N**R**K**L**I**D**Y**D**G**Q**R**H**S**F**Q**N**L**Q**A**N...A**N**..K**R**K**D**..D**V**.K**L**T**K**.G**R**E**Q**L**E**E**A**R**R**T**Y**E**I**L**N**T
2fic A**L**L...T**M**D**T**Y**L**G**Q**F**P**D**I**K**S**R**I**A**K**R**G**R**K**L**V**D**Y**D**S**A**R**H**H**Y**E**S**L**Q**T**K**I**..A**K**A**E**..E**E**L**I**K**A**Q**K**V**F**E**M**N**V**D**L**Q**E**E**L**P
2q13 F**K**E**R**..D**L**K**E**I**L**T**L**K**E**V**F****Q**I**A**S**N**D**H**D**A**A**I**N**R**Y**S**R**L**.....S**K**..K..R..E**N**D**K**V**K**Y**E**V**T**E**D**V**Y**T**S**R**K**K**Q**H**Q**T**M**M
2raj Y**K**G...F**L**G**C**F**P**D**I**I**G**T**H**K**G**A**I**E**K**V**K**E**S**D**K**L**V**A**T**S.....K**I**..T**L**Q**D**K**Q**N**M**V**K**R**V**S**I**M**S**Y
LSP1 Y**D**Q**Y**R**V**T**L**K**S**I**R**N**I**E**A**S**V****Q**P**S**R**D**R**E**K**I**T**D**E**I**A**H**L**K**Y**K**D**P**Q**S**T.....K**I**P**V**L**E**Q**E**L**V**R**A**E**A**E**S**L**V**A**E**A**Q**L**S**N**I**T**R**

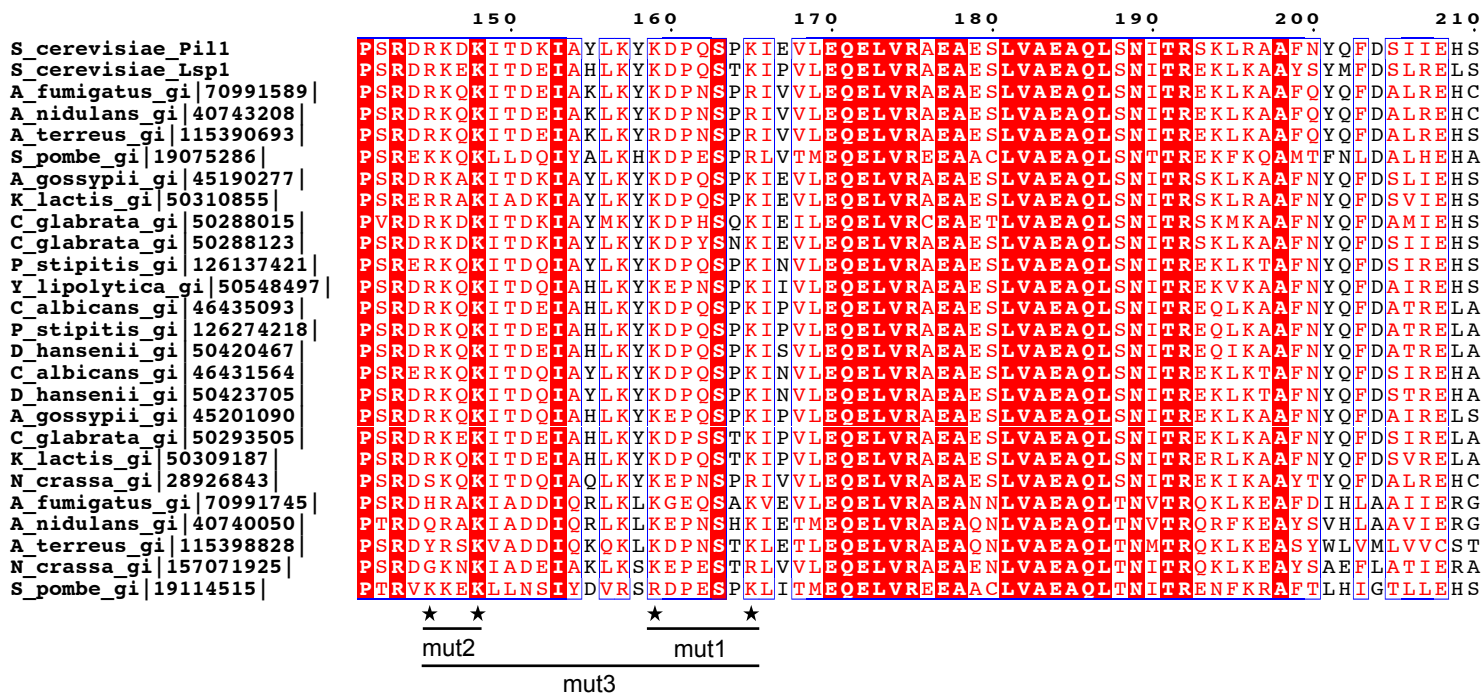
PIL1 2000 2100 2200 2300 2400

PIL1 S**K**L**R****A**A**F**N**Y**Q**F**D**S**I**I**E**H**S**E**K**I**A**L**I**A**G**Y**G**K**A**L**L**E**L**L**D**D**S**P**V**T**P**G**E**T**R**P**A**Y**D**G**Y**E**A**S**K**Q**
li49 D**V**A**I**K**L**K**F**L**E**E**N**K**I**K**V**M**H**K**Q**L**L**L**F**H**N**A**V**S**A**Y**F**A**G**N**Q**K**Q**L**E**.Q**T**.....
luru E**L**H**D**E**L**P**A**L**Y**D**S**R**I**L**F**L**V**T**N**L**Q**T**L**F**A**T**E**Q**V**F**H**N**E**T**A**K**I**Y**S**.E**L**E**A**I**V**D..K**L**A**T**E**S**.Q
2fic S**L**W**N**S**R**V**G**F**Y**V**N**T**F**Q**S**I**A**G**L**E**E**N**F**H**K**E**M**S**K**L**N**Q**N**L**N**D**V**L**V**.G**L**.....
2q13 H**Y**F**C**A**L**N**T**L**Q**Y**K**K**K**I**A**L**L**E**P**L**L**G**Y**M**Q**A**Q**I**S**F**F**K**M**G**S**E**N**L**N**E**Q**L**E**E**F**L**A**.N**I**G**T**.S**V**Q
2raj A**L**Q**A**E**M**N**H**F**H**S**N**R**I**Y**D**Y**N**S**V**I**R**L**Y**L**E**Q**Q**V**Q**F**Y**E**T**I**A**E**K**L**R**.Q**A**L**S**R**F**P**V**...M....
LSP1 E**K**L**K****A**A**Y**S**Y**M**F**D**S**L**R**E**L**S**E**K**F**A**L**I**A**G**Y**G**K**A**L**L**E**L**L**D**D**S**P**V**T**P**G**E**A**R**P**A**Y**D**G**Y**E**A**S**R**Q**

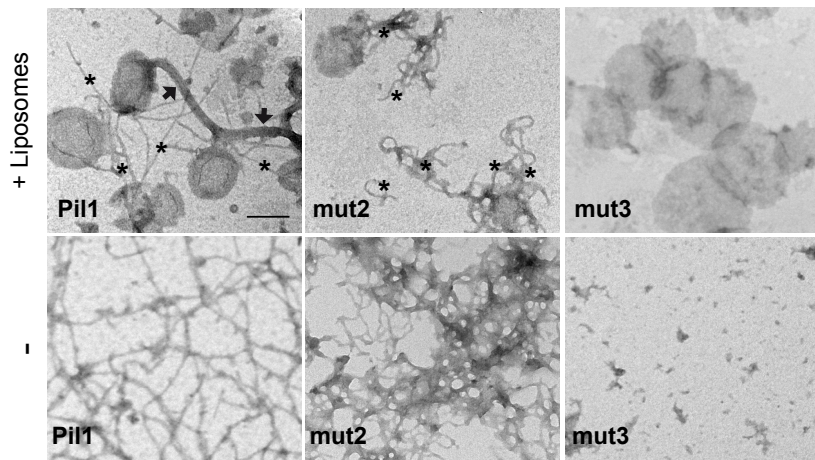


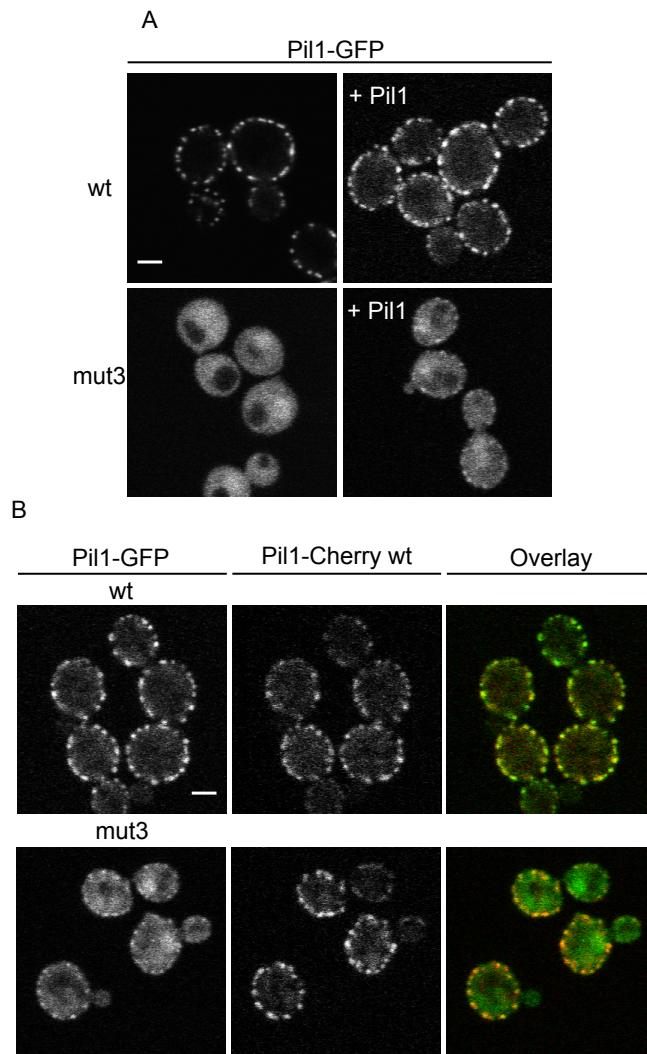


A



B





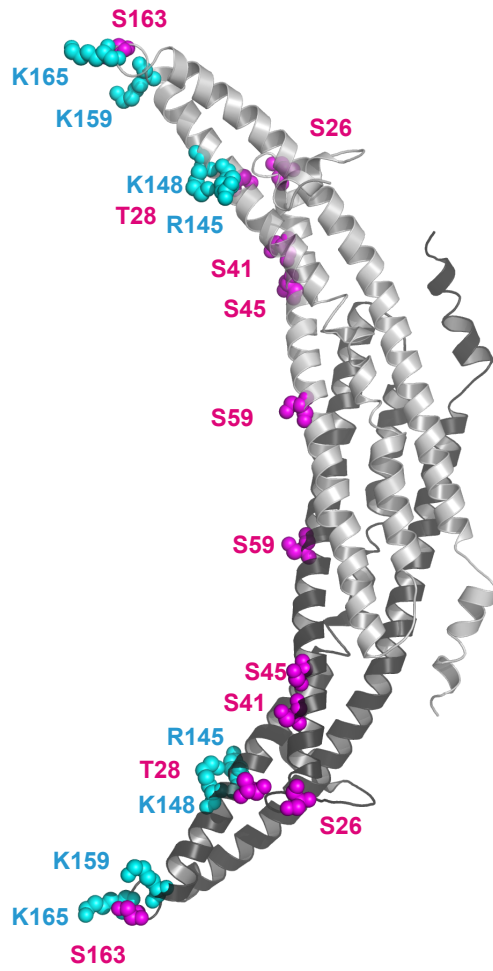


Table S1. Yeast strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Source
PSAY592	W303 <i>MATα pil1::KAN</i> LSP1-CHERRY-HIS3	Lab collection
PSAY855	W303 <i>MATα pil1::KAN</i> LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1-GFP-URA3	This study
PSAY848	W303 <i>MATα pil1::KAN</i> LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 R145E-GFP-URA3	This study
PSAY860	W303 <i>MATα pil1::KAN</i> LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)	This study
PSAY861	W303 <i>MATα pil1::KAN</i> LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 K159E K165E-GFP-URA3 (mut1)	This study
PSAY876	W303 <i>MATα pil1::KAN</i> LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 R145E K148E K159E K165E-GFP-URA3 (mut3)	This study
PSAY437	W303 <i>MATα pil1::LEU</i>	Lab collection
PSAY872	W303 <i>MATα pil1::LEU</i> PIL1-GFP-URA3	This study
PSAY873	W303 <i>MATα pil1::LEU</i> PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)	This study
PSAY874	W303 <i>MATα pil1::LEU</i> SUR7-CHERRY::KAN PIL1-GFP-URA3	This study
PSAY875	W303 <i>MATα pil1::LEU</i> SUR7-CHERRY::KAN PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)	This study
PSAY900	W303 <i>MATα</i> PIL1-CHERRY-KAN	This study
PSAY928	W303 <i>MATα</i> PIL1-CHERRY-KAN PIL1-GFP-URA3	This study
PSAY927	W303 <i>MATα</i> PIL1-CHERRY-KAN PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)	This study
PSAY928	W303 <i>MATα</i> PIL1-CHERRY-KAN PIL1 R145E K148E K159E K165E-GFP-URA3 (mut3)	This study
PSAY907	S288c <i>MATα</i> PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm1 F-BAR	This study
PSAY929	S288c <i>MATα</i> PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm1 F-BAR-PH	This study
PSAY908	S288c <i>MATα</i> PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm2 F-BAR	This study
PSAY909	S288c <i>MATα</i> PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm2 F-BAR-PH	This study
PSAY695	S288c <i>MATα</i> PIL1-MARS-KAN	Lab collection
PSAY516	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb</i>	Lab collection
PSAY230	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb</i> PIL1-GFP-URA	This study
PSAY231	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb</i> PIL1 R145E K148E-GFP-URA (mut2)	This study
PSAY232	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb</i> PIL1 R145E K148E K159E K165E-GFP-URA (mut3)	This study

3.1. Bases moleculares de la formación de eisosomas.

3.1.1- Realización de inferencia bioinformática de dominios proteicos con función molecular conocida para las diferentes proteínas eisosomales.

Para poder explorar posibles homologías entre proteínas eisosomales y dominios proteicos de función conocida, se realizó una búsqueda bioinformática sistemática y robusta diseñada para determinar homologías remotas, utilizando metodologías en forma anidada e iterativa y aplicando algoritmos basados en Modelos Ocultos de Markov (Soding, 2005) (Figura 1 (Olivera-Couto et al, 2011)). Dicho procedimiento fue aplicado a una serie de proteínas eisosomales residentes tanto en forma estable como transitoria (Tabla 1 (Olivera-Couto et al, 2011)). En la Tabla 2 (Olivera-Couto et al, 2011) se resumen los resultados obtenidos que aún no habían sido reportados en otros trabajos. En forma general, la totalidad de los dominios proteicos identificados están implicados en interacciones de tipo proteína-proteína así como proteína-lípido. Dentro de estos se puede destacar la homología lejana con el dominio proteico perteneciente a la superfamilia BAR (bin1/amphyphisin/rvs161) presente en las proteínas eisosomales parálogas Pil1p y Lsp1p, los residentes estables más abundantes, así como en Slm1p y Slm2p, dos residentes transitorios. Para el caso de Pil1p y Lsp1p, el dominio BAR involucra un 70% de la longitud total de dichas proteínas. Con una identidad aminoacídica del 14%, dicho resultado de homología lejana resultó altamente interesante ya que la familia BAR tiene como característica definitoria la unión a membranas biológicas junto con la capacidad de censar e inducir en forma activa variaciones de la curvatura de la misma (dos características que podrían explicar varias de las propiedades celulares de los eisosomas) (Frost et al, 2009; Gallop & McMahon, 2005).

3.1.2- Corroboración experimental (mediante metodologías de bioquímica, biología molecular y biología celular; tanto *in vivo* como *in vitro*) de la

existencia de los dominios BAR en Pil1p y Lsp1p, así como determinación de su función molecular.

Para proceder a la corroboración experimental de los resultados bioinformáticos, se clonaron las proteínas Pil1p y Lsp1p en vectores de expresión para levaduras y luego fueron sub-clonadas en vectores para células de mamíferos y *E. coli*, pensando poder estudiarlas tanto en el sistema natural, en un sistema eucariota superior heterólogo así como pensando también en poder purificarlas y realizar estudios *in vitro*. Para esto se utilizaron los plásmidos pRS306, pcDNA3.1+ y pGEX4T2, respectivamente. Para los experimentos *in vitro* se expresaron y purificaron las proteínas recombinantes. Para esto se utilizó un proceso doble de purificación comprendido por una cromatografía de afinidad (mediante el uso de una etiqueta de GST que luego fue eliminado con el uso de una proteasa específica) y una cromatografía de intercambio iónico (en colaboración con la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo). Así se pudo obtener proteína pura, la cual fue utilizada para los ensayos *in vitro*.

Por un lado, de forma de poder evaluar la capacidad de unión de la proteína a membranas lipídicas, se realizaron experimentos de co-sedimentación por ultracentrifugación utilizando las proteínas purificadas en presencia y ausencia de liposomas sintetizados *in vitro*. Los liposomas fueron sintetizados mediante el método de extrusión y utilizando mezclas de lípidos naturales (a partir de extractos lipídicos de cerebro porcino) suplementados con PI(4,5)P₂ (cedidos gentilmente por la profesora Ana Denicola, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UDeLaR). Como se puede ver en la Figura 2a (Olivera-Couto et al, 2011), tanto Lsp1p como Pil1p se unen en forma apreciable a los liposomas (en el control sin liposomas ambas proteínas aparecen en el sobrenadante, mientras que en presencia de los liposomas ambas proteínas sedimentan junto a los mismos apareciendo en el precipitado).

Con las proteínas purificadas y los liposomas sintetizados se realizaron experimentos de microscopía electrónica de transmisión para poder evaluar si las proteínas en cuestión son capaces de inducir cambios en la curvatura de

los liposomas. Los liposomas solos pudieron ser observados como esféricos de un diámetro en torno a los 200 nm (Figura 2b (Olivera-Couto et al, 2011)). Por otro lado, al observar las proteínas purificadas se pudo determinar que estas se encuentran en forma de polímeros filamentosos. Finalmente, al observar tanto Pil1p como Lsp1p en presencia de los liposomas, se pudo observar la presencia de liposomas tubulados (Figura 2b (Olivera-Couto et al, 2011)).

Resumiendo los resultados anteriormente descritos se puede afirmar que los dominios identificados tanto en Pil1p como en Lsp1p, son capaces de unirse a bicapas lipídicas y de deformarlas tubularmente, *in vitro*.

Con el objetivo de determinar si el dominio BAR de Pil1p y Lsp1p era capaz de tubular membranas *in vivo*, se expresaron dichas proteínas en un sistema celular heterólogo. En particular se expresaron en células COS7, mediante el uso del plásmido pcDNA3.1+. Las células COS7 fueron transfectadas con dicho plásmido mediante el uso de Lipofectamina (Invitrogen). Para la determinación de la localización subcelular de Pil1p y Lsp1p, se utilizaron anticuerpos específicos (cedidos gentilmente por el profesor Tobias Walther, Genetics and Complex Diseases Howard Hughes Medical Institute, Harvard University) y las células transfectadas fueron observadas mediante microscopía confocal. Ambas proteínas exhibieron una distribución en forma de tubos, distribución que se vió exacerbada en células transfectadas con plásmidos de expresión de *PIL1* y *LSP1* simultáneamente (Figura 3 (Olivera-Couto et al, 2011)). Lamentablemente, a pesar de haber intentado utilizar variados marcadores de membrana (tanto lipídicos como proteicos), no se logró observar ésta con la resolución necesaria para determinar si los tubos proteicos observados de Pil1p y Lsp1p correspondían a la proteína unida a la membrana plasmática. Sin embargo, los mismos experimentos fueron realizados en células epiteliales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) polarizadas y la profundidad de dichas células permitió determinar que los tubos proteicos estaban asociados a la membrana plasmática apical principalmente (Figura S4 (Olivera-Couto et al, 2011)).

Así se puede afirmar que tanto Pil1p como Lsp1p son capaces de formar estructuras tubulares asociadas a la membrana plasmática, *in vivo*, y que dicha capacidad se ve potenciada cuando las dos proteínas están presentes.

3.2. Bases moleculares del mecanismo de generación de dominios de membrana dependiente de eisosomas.

3.2.1- Caracterización experimental de la importancia de los dominios BAR, en el contexto de la biología celular de los eisosomas.

Para determinar la importancia y el rol de los dominios BAR de Pil1p y Lsp1p dentro de la biología de los eisosomas, en primer lugar se generaron cepas de levaduras donde se deletaron los genes que codifican para las proteínas Pil1p o Lsp1p y se sustituyeron por genes de las proteínas salvajes o mutageneizados de forma puntual y siempre fusionados corriente abajo al gen de la proteína fluorescente verde (GFP, en inglés) bajo la regulación del promotor natural de dichos genes. Para esto, en primer lugar se construyeron modelos por homología de la estructura de los dominios BAR de Pil1p y Lsp1p, mediante la superposición de las estructuras cristalográficas de dominios homólogos utilizando el programa MODELLER. Mediante el análisis de dichos modelos se pudieron identificar residuos aminoacídicos candidatos a ser estructuralmente importantes para el funcionamiento de los dominios. En la Figura 4 (partes a y b) y Figura S5 (Olivera-Couto et al, 2011) se pueden observar los modelos obtenidos así como los residuos identificados. Éstos últimos son cuatro residuos aminoacídicos, altamente conservados en todas las secuencias de proteínas homólogas en otros hongos (fueron admitidas solo posiciones fijadas o con cambios conservativos) y que están expuestos a la superficie cóncava positiva del dímero del dominio BAR (superficie postulada como responsable de la interacción con la bicapa lipídica así como responsable de la generación de un cambio en la curvatura de la misma) (Frost et al, 2009; Gallop & McMahon, 2005).

Ya con los genes silvestres *PIL1* y *LSP1* aislados e insertados dentro del vector pRS306 (y fusionados al gen de GFP) se realizó mutagénesis dirigida sobre ellos basándose en los resultados obtenidos mediante modelado de la estructura tridimensional. El uso de la fusión a GFP no afecta la localización de Pil1p, como ya ha sido reportado anteriormente (Walther et al, 2006). Para la mutagénesis se utilizó la metodología de “QuickChange” de Stratagene. Se construyeron así plásmidos para las mutantes simples (en un solo residuo aminoacídico) así como para diferentes combinaciones de residuos mutados, dando lugar a las variantes mut1, mut2 (dos residuos mutados) y mut3 (cuatro residuos mutados) (Figura 4b (Olivera-Couto et al, 2011)). Posteriormente, se analizaron los efectos de dichas variantes tanto *in vivo* como *in vitro*. Se pudo observar por microscopía electrónica como las versiones mutadas de Pil1p tienen reducida la afinidad por los liposomas (Figura 4c (Olivera-Couto et al, 2011)) y no se pudo observar que las versiones mutadas de Pil1p formaran polímeros proteicos en forma de tubos ni *in vitro* ni en sistemas celulares heterólogos, en ninguno de los experimentos realizados (Figura 4d y Figura S5 (Olivera-Couto et al, 2011)).

En las Figura S5 y 6 (Olivera-Couto et al, 2011) se pueden observar imágenes confocales de levaduras expresando las diferentes variantes mutadas de Pil1p-GFP. Claramente se puede decir que las diferentes mutantes analizadas presentan un fenotipo de malformación de los eisosomas debido a que en dichas células el número de eisosomas se ve reducido y su tamaño aumentado, habiendo al mismo tiempo más proteína dispersa en el citoplasma, Figura 5 (Olivera-Couto et al, 2011). La cantidad de proteína total se ve invariada Figura 7b (Olivera-Couto et al, 2011). Dicho fenotipo fue analizado en detalle para el caso de la variante mut2 y los resultados de dicho análisis cuantitativo aparecen detallados en la Figura 7 (Olivera-Couto et al, 2011).

Para determinar si dicha desorganización de los nanodominios eisosomales se ve extendida a otros componentes de los mismos, se observaron en el contexto de las diferentes variantes mutadas de Pil1p-GFP, otros componentes eisosomales. Como se puede ver en la Figura 6 (Olivera-Couto et al, 2011) tanto Lsp1p-Cherry como Sur7p-Cherry pierden su distribución natural cuando

el dominio BAR de Pil1p está mutageneizado. Dichos resultados muestran que el dominio BAR de Pil1p es necesario para una correcta organización de los nanodominios eisosomales.

Para profundizar más en el entendimiento del fenotipo causado por mut2 (Figura 7 (Olivera-Couto et al, 2011)) se decidió estudiar la biogénesis eisosomal en el contexto de dicha variante. La biogénesis de los eisosomas está acoplada al ciclo celular: los eisosomas sólo se forman, *de novo*, durante el crecimiento celular (cuando se genera una célula hija) y por lo tanto existe un aumento de la cantidad de membrana plasmática (Moreira et al, 2009). La proteína se sintetiza y se ensambla sobre la nueva membrana plasmática. Para el estudio de dicho proceso, se realizó un seguimiento durante todo el ciclo celular mediante microscopía confocal, observando Pil1p-GFP durante la formación de cada eisosoma. A partir de dichas imágenes se realizó una cuantificación de la fluorescencia de cada eisosoma para cada tiempo y se graficaron los valores obtenidos. En la Figura 8a (Olivera-Couto et al, 2011) se puede observar como para el caso de la proteína salvaje, como ya había sido reportado por Moreira (Moreira et al, 2009), el proceso de formación del eisosoma se puede dividir en tres etapas principales: formación del sitio de nucleación, ensamblaje activo y fase estacionaria. En la fase estacionaria ya no se observa aumento en la intensidad de fluorescencia (y hasta se puede observar un decaimiento de la misma causado por la incapacidad que se tiene al querer corregir el efecto de quemado de los fluoróforos a tiempos de observación muy largos). Para el caso de mut2, el proceso observado es diferente: nunca se llegó a observar una fase estacionaria, por lo que los pocos eisosomas que se forman en estas células crecen por tiempos mucho más prolongados que las células salvajes.

En último lugar se analizó mediante FRAP (“Fluorescence Recovery After Photobleaching” en inglés) el recambio proteico de las subunidades de proteína Pil1p-GFP dentro de cada eisosoma. En este caso no se detectaron diferencias apreciables entre la proteína salvaje y mut2, indicando que el recambio proteico no está afectado en esta variante (Figura 8b (Olivera-Couto et al, 2011)).

En resumen a partir del trabajo publicado (Olivera-Couto et al, 2011) se puede afirmar que las proteínas eisosomales Pil1p, Lsp1p, Slm1p y Slm2p están compuestas por un grupo de dominios proteicos pertenecientes a la super familia BAR. En particular, Pil1p y Lsp1p, gracias al dominio BAR que presentan, son capaces de unirse y de modificar la curvatura de membranas biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Dicha función molecular es central para que la formación de los dominios eisosomales en las células de levaduras en división pueda darse en forma normal y por lo tanto para que la distribución de los distintos componentes proteicos eisosomales se de en forma correcta. Dichos resultados serán analizados en mayor detalle en la sección Discusión (4).

Article

Eisosomes Are Dynamic Plasma Membrane Domains Showing Pil1-Lsp1 Heteroligomer Binding Equilibrium

Agustina Olivera-Couto,¹ Valentina Salzman,¹ Milagros Mailhos,¹ Michelle A. Digman,^{2,3} Enrico Gratton,^{2,*} and Pablo S. Aguilar^{1,*}

¹Laboratorio de Biología Celular de Membranas, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ²Laboratory for Fluorescence Dynamics, Department of Biomedical Engineering, University of California-Irvine, Irvine, California; and ³Centre for Bioactive Discovery in Health and Ageing, School of Science and Technology, University of New England, Armidale, Australia

ABSTRACT Eisosomes are plasma membrane domains concentrating lipids, transporters, and signaling molecules. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, these domains are structured by scaffolds composed mainly by two cytoplasmic proteins Pil1 and Lsp1. Eisosomes are immobile domains, have relatively uniform size, and encompass thousands of units of the core proteins Pil1 and Lsp1. In this work we used fluorescence fluctuation analytical methods to determine the dynamics of eisosome core proteins at different subcellular locations. Using a combination of scanning techniques with autocorrelation analysis, we show that Pil1 and Lsp1 cytoplasmic pools freely diffuse whereas an eisosome-associated fraction of these proteins exhibits slow dynamics that fit with a binding-unbinding equilibrium. Number and brightness analysis shows that the eisosome-associated fraction is oligomeric, while cytoplasmic pools have lower aggregation states. Fluorescence lifetime imaging results indicate that Pil1 and Lsp1 directly interact in the cytoplasm and within the eisosomes. These results support a model where Pil1-Lsp1 heterodimers are the minimal eisosomes building blocks. Moreover, individual-eisosome fluorescence fluctuation analysis shows that eisosomes in the same cell are not equal domains: while roughly half of them are mostly static, the other half is actively exchanging core protein subunits.

INTRODUCTION

Compartmentalization of the plasma membrane allows both prokaryote and eukaryote cells to efficiently coordinate essential functions such as cell division and trafficking of materials and information (1,2). Above the micron scale, plasma membrane heterogeneity is evident in eukaryotic-polarized cells where apical and basolateral domains, formed by the polarized trafficking machinery and maintained by tight junctions, ascertain epithelial functional identity (3). Below the micron scale, plasma membrane nanodomains exhibit high diversity of temporal and spatial scales extending from tens to hundreds of nanometers and from milliseconds to minutes and even permanent residency within a cell lifespan (4,5). Our understanding of nanoscale plasma membrane domains composition has been deeply enriched by live microscopy studies using fluorescently labeled proteins and lipids. These studies have unequivocally shown the existence of plasma membrane nanodomains, and their mechanisms of formation, maintenance, and disassembly are under

intense debate and study (2,6). Proposed mechanisms focus on confinement within fences formed by membrane proteins anchored to the cytoskeleton, preferential chemical associations among proteins and lipids, and clustering of protein and lipids by membrane-associated scaffolding proteins (2,7).

The plasma membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, contains at least a dozen different nanodomains that exhibit different morphologies and dynamic behaviors (8). Among them, there are topographically distinctive domains, which are shaped as 200–400-nm long and 50-nm-deep invaginated furrows (9,10). Depending on the cell size, there are between 20 and 50 furrows per cell, showing an even distribution and a rather constant density of 0.33 ± 0.06 domains/ μm^2 cell surface. These plasma membrane furrows concentrate at least 23 different proteins including nutrient transporters such as Can1 and Tat2 (11,12), membrane-associated signaling proteins such as Pkh1 and Pkh2 kinases (13,14), and the target of rapamycin complex 2 (TORC2) effectors Slm1 and Slm2 (15,16). Two highly abundant membrane-associated proteins, Pil1 and Lsp1, constitute the structural core of these domains (9,17). For each one of these invaginated furrows, it is estimated that 2000–5000 units of both Pil1 and Lsp1 are assembled on the cytoplasmic side of the plasma membrane (17). Pil1 and Lsp1 assemblies have been named “eisosomes” (17) whereas the plasma membrane domains concentrating Can1 and other nutrient

Submitted September 26, 2014, and accepted for publication February 12, 2015.

*Correspondence: pablo.aguilar@pasteur.edu.uy or egratton22@gmail.com

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Valentina Salzman's current address is Instituto de Investigaciones Biológicas, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

Editor: Paul Wiseman.

© 2015 The Authors
0006-3495/15/04/1633/12 \$2.00



transporters have been named “membrane compartment occupied by Can1” (MCC) (12). Eisosomes and MCCs both constitute the same subcellular structure: the plasma membrane furrowlike invagination. For simplicity, we will use the term “eisosomes” to describe the plasma membrane invaginated furrows and the proteins that partition within. Eisosomes are immobile domains that are formed *de novo* in the buds of dividing cells (18). The cytoplasmic pools of the core proteins Pil1 and Lsp1 join the plasma membrane of growing buds in a coordinated fashion with other eisosome components. *PIL1* expression oscillates in synchronicity with the cell cycle, matching high expression levels with eisosome formation and buds’ plasma membrane growth (18). Pil1 is a major player in eisosomes assembly and maintenance. Deletion of *PIL1* leads to disappearance of furrow membrane invaginations and dramatic relocation of all other known eisosome components: integral membrane proteins spread along the plasma membrane and membrane-associated proteins, including Lsp1, fall into the cytoplasm. In the absence of Pil1, very few and large clusters, referred to as “eisosome remnants”, persist at the plasma membrane concentrating a fraction of the original eisosomal proteins (17).

Remarkably, this phenotype is not mimicked by the absence of Lsp1, which is 74% identical in amino-acid sequence to Pil1. Lsp1 and Pil1 are bar/amphyphysin/rvs (BAR) domain-containing proteins able to form a membrane-bound scaffold imposing membrane curvature *in vitro* and *in vivo* (19–21). Besides all these extensive studies, the molecular mechanism of eisosome formation and maintenance are still poorly understood. Other eisosome components such as the tetraspanning membrane protein Nce102 and the membrane-associated protein Seg1 are required for efficient incorporation of Pil1 into eisosomes, but their molecular structures and mechanisms of action are still unknown (22,23). Crystallographic studies show that Lsp1, like canonical BAR domain proteins, forms a homodimer *in vitro* (20). However, whether the cytoplasmic pools of Pil1 and Lsp1 form homo- and/or heterodimers, or even higher-order preassembled units *in vivo*, remains uncertain. *In vitro*, Pil1 and Lsp1 are able to directly bind to lipids, but it is unknown whether their cytoplasmic pools are either already bound to intracellular membranes or behave as free diffusing entities. To further contribute to our understanding of eisosome assembly and maintenance mechanisms, we have focused on Pil1 and Lsp1, addressing quantitative aspects of these proteins’ dynamics in live cells.

In this work, by using fluorescence fluctuation analytical methods we have determined the dynamic behavior of cytoplasmic Pil1 and Lsp1 *in vivo*. We have also found that roughly half of the eisosome population contains a dynamic pool of Pil1 and Lsp1. Number and brightness (N&B) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) analysis show that these dynamic pools are oligomeric with slow dynamics that fit with a binding-unbinding equilibrium. Finally, using fluorescence lifetime imaging on live

cells, we demonstrated that Pil1 and Lsp1 form heterodimers in the cytoplasm and within the eisosomes.

MATERIALS AND METHODS

The *S. cerevisiae* strains, reagents, media, and growth conditions, Western blotting, microscope setups, mathematics, and data processing are detailed in the [Supporting Material](#).

RESULTS

Eisosome core proteins Pil1 and Lsp1 exhibit diffusive behavior within the cytoplasm

In mitotically active yeast cells, eisosomes are formed *de novo* in the growing buds by progressive deposition of Seg1, Pil1, Lsp1, and the rest of eisosomal components (18,19,23). Before the bud reaches its final size, well before cytokinesis, deposition of Pil1 (and, presumably, the other major eisosome structural components) has already reached a plateau (18,19). After cytokinesis, when the detached bud turns itself into a novel mother cell, eisosome biogenesis is again initiated toward the new growing bud. Thus, in contrast to growing buds, mother cells contain a population of already assembled eisosomes where the average Pil1-GFP intensity per eisosome remains invariant during a complete cell cycle. It has been previously proposed that, in mother cells, the already assembled eisosomes cores are static; that is, they do not actively exchange core subunits because Pil1-GFP fluorescence recovers very slowly after bleaching (17). However, similar fluorescence-recovery-after-photobleaching experiments performed at physiological temperature (30°C) suggest that, over a time period equivalent to one-half of a cell cycle (45 min), the mother cell’s eisosomes exchange ~30% of their Pil1-GFP content (19). To gain a better understanding of the molecular dynamics of already assembled eisosomes, we decided to first characterize their core components in different compartments of mother cells.

For this, we used FCS analysis of temporal fluorescence intensity fluctuations to obtain both high-resolution data on molecular dynamics within a single illumination volume (point-scanning FCS) and positional information of different molecular dynamics (orbit-scanning FCS). Yeast strains bearing single-copy versions of C-terminally tagged Pil1 and Lsp1 driven by their native promoters and located in the natural genomic loci were scanned using a two-photon excitation fluorescence microscope equipped with a photon-counting detector. Point and circular scans were performed on different compartments of mother cells. The trajectory of the circular scans was chosen encompassing the cytoplasm, the plasma membrane, and eisosomes (Fig. 1 A).

Control point FCS and orbit-scanning FCS experiments on yeast cells with no fluorescent protein showed minimal autofluorescence and no correlations were detected. On the other hand, control-point FCS experiments with cytoplasmic monomeric Venus (mVenus) expressing cells

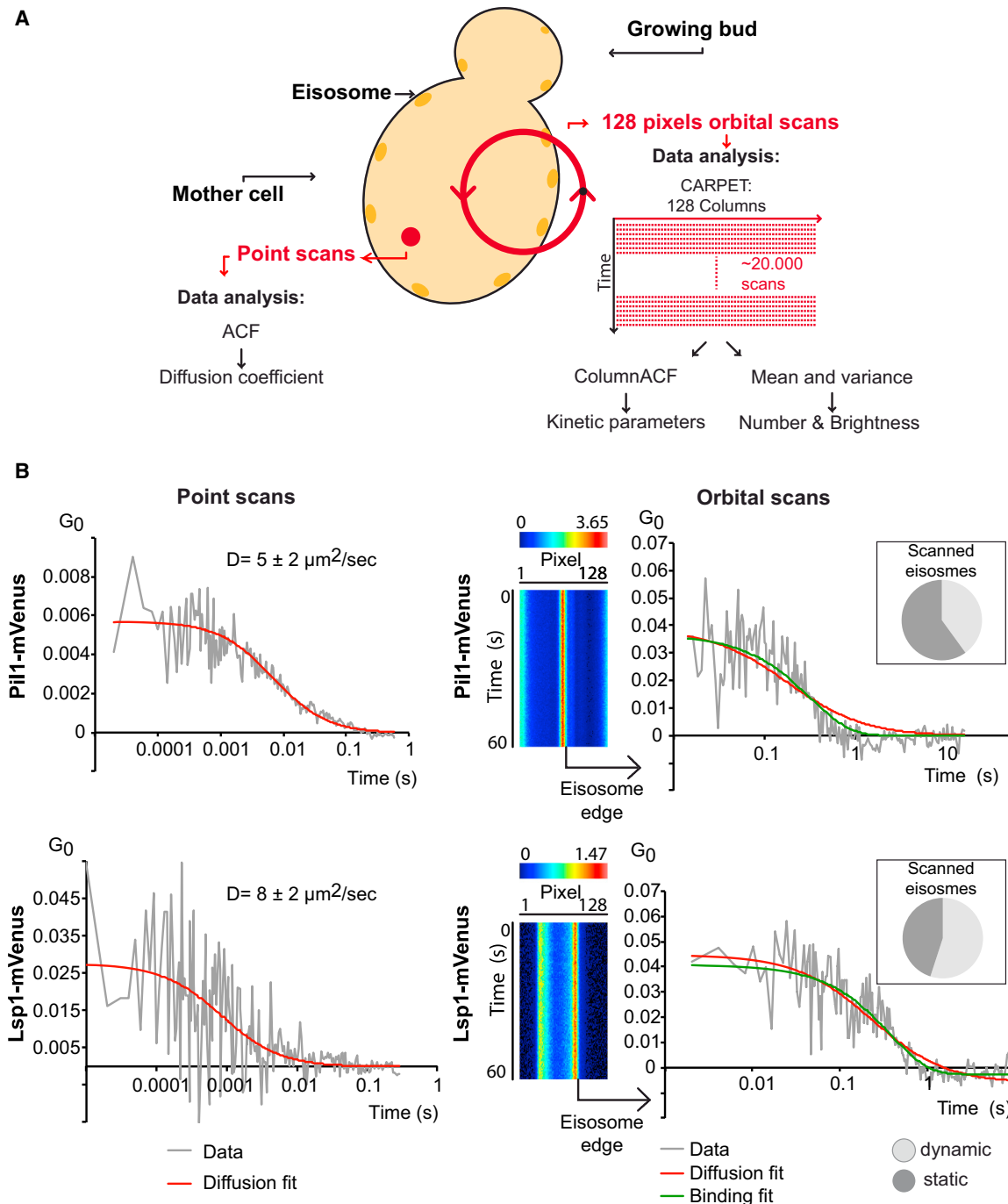


FIGURE 1 ACF analysis of Pil1 and Lsp1 at different subcellular locations. (A) Graphic representation of point- and circular-scans-based ACF analysis. Each yeast cell is focused at the equatorial plane and scanned by an immobile beam positioned at the cytoplasm (*point*) or by a circular orbit that passes through an eisosome. (B) (Left panels) Pil1 and Lsp1 exhibit cytoplasmic free diffusion dynamics. Representative ACF plots and free diffusion fittings of data coming from indicated yeast strains that were subjected to point scans at the cytoplasm. (Right panels) Circular scans reveal Pil1 and Lsp1 dynamic populations at the eisosome's edges. Representative fluorescence intensity carpets of Pil1-mVenus and Lsp1-mVenus cells are shown. ACF was calculated for each column/pixel of the carpet. When detected, autocorrelation data was plotted and fitting to free diffusion (*red*) and binding-unbinding equilibrium (*green*) models were tested. (Insets) Distribution of dynamic and nondynamic Pil1 and Lsp1 pools over a total of 25 and 20 individually scanned eisosomes, respectively. Parameter values (D_{app} , G_0 , K , and A) and fitting statistics of analyzed cells are given in Table S1. To see this figure in color, go online.

evidenced autocorrelation yielding an apparent diffusion coefficient (D_{app}) of $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Fig. S1), which is consistent with the dynamic behavior of this protein in bacterial cells (24) and of similar fluorescent proteins located in the budding yeast's cytoplasm (25). Data obtained from cytoplasmic point scans of Pil1-mVenus cells were individually fit to a free diffusion model. After fitting analysis, we could determine that cytoplasmic Pil1-mVenus dynamic behavior is compatible with free diffusion exhibiting a D_{app} of $5 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Fig. 1 B, top-left panel). Equivalent imaging, processing, and analysis for Lsp1-mVenus cells indicated that, like Pil1-mVenus, the dynamic behavior of Lsp1-mVenus obeys free diffusive kinetics with a D_{app} of $8 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Fig. 1 B, bottom-left panel).

A subset of eisosomes exhibits binding-unbinding Pil1 and Lsp1 dynamics

Overall, these results show that cytoplasmic Pil1 and Lsp1 pools behave as relatively free diffusing molecules with D_{app} that are compatible with low aggregation states (monomeric to oligomeric). Point-FCS provides dynamic information at a single spatial location and turned out to be inadequate to obtain meaningful data when sampling at eisosome cores or eisosome edges was attempted. To address the dynamic behavior of Pil1 and Lsp1 we employed orbital scans, which enabled us to simultaneously evaluate different cellular locations (Fig. 1 A). Orbital scans have sampling interval times much longer than those used for point-FCS sampling. Although this sampling frequency is too slow to detect free diffusing monomeric molecules like mVenus, it allowed us to detect slower moving particles, which is something we can expect from plasma membrane proteins and/or large complexes within the cytoplasm. To simplify the analysis visualization, the intensity data captured by the scanning orbit is displayed in two-dimensional carpets where the x dimension corresponds to each orbit pixel and the y dimension corresponds to time (Fig. 1 B, right panels). Autocorrelation analysis for each point in the orbit (the columns in the carpet) was performed for >20 Pil1-mVenus and >25 Lsp1-mVenus cells registered over three independent experiments. This analysis enabled us to identify a common pattern: autocorrelation was detected in pixels located at the edges of eisosomes and not within them (Fig. 1, right panel). Fitting of the autocorrelation function (ACF) was done using a free diffusion null hypothesis model, but results indicated that this model was not fitting the data well. The deficient fittings to a free diffusion model of the ACFs of moving particles located at the eisosomes edges were characterized by a narrowing of the ACFs with respect to the model (see examples for Pil1 and Lsp1 in Fig. 1 B). In contrast, all diffusion models, regardless of whether they represent normal, hindered, or anomalous diffusion, will produce a broader ACF. Instead, we

have observed a narrowing of the ACF, which is typical of binding equilibrium. Consistently with this hypothesis, an ACF exponential formula characteristic of binding-unbinding equilibrium to an immobile fraction (the eisosome core) provided a better fit in the totality of pixels analyzed, giving mean first-order kinetic constants of $2.9 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ for Pil1-mVenus and $3.1 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ for Lsp1-mVenus (Table S1).

These results suggest that, within mother cells, both Pil1 and Lsp1 partition in at least three dynamically different populations: 1) an immobile fraction at the eisosome's core, 2) a cytoplasmic free-diffusing fraction with D_{app} compatible with monomeric or low aggregation states, and 3) an eisosome-associated fraction that is dominated by a binding-unbinding equilibrium behavior and localizes at the eisosomes edges. Remarkably, the eisosome-associated dynamic fraction detected at some eisosomes was absent in other eisosomes of cells that were similarly grown and scanned. Orbital-scan measurements and ACF analysis showed that the eisosome-associated Pil1 and Lsp1 dynamic populations were present in 40 and 55% of individually scanned eisosomes, respectively (see Fig. 1 B, insets, right panels). Moreover, for both proteins, these mobile fractions were always detected at the eisosome edges and not at the eisosomes cores. Thus, our results indicate that a subset of mother cell eisosomes is static whereas there is another fraction of eisosomes with boundaries containing dynamic pools of Pil1 and Lsp1.

Number and brightness analysis reveals the aggregation states of the different eisosome core proteins' subcellular pools

Diffusion coefficient values obtained by ACF analysis suggest that cytoplasmic Pil1 and Lsp1 exist as either monomeric or low aggregation states. Moreover, whether the eisosome-associated Pil1 and Lsp1 dynamic pools are either monomeric or preassembled is also uncertain. To address these points, we obtained a cellular map of Pil1 and Lsp1 aggregation states performing N&B analysis over the same temporal intensity fluctuations data analyzed by ACF. N&B is based on moment-analysis that utilizes the average intensity and the variance in the intensity distribution at each pixel to calculate the number (N) of diffusing particles within the illumination volume and their apparent brightness (B) (26). In the simplest case, the molecular brightness ϵ (where $\epsilon = B-1$) of an n -mer oligomer is n times the monomer brightness. Thus, providing a pixel-by-pixel map of number and brightness in an image, N&B analysis enables us to determine the oligomerization state/s of proteins in living cells with high spatial resolution (see the Supporting Material for a more detailed description).

Intensity fluctuations data of mVenus-bearing cells were used as the reference of the brightness of the monomeric

fluorophore. Because we used a yeast strain that expresses mVenus from a multicopy plasmid and because the number of copies per genome of this type of expression vectors varies from cell to cell (27), the resulting population of mVenus cells has a wide distribution of mVenus intensities. This cell-to-cell variation in mVenus expression levels enabled us to determine that our brightness calculations were robust over a wide range of fluorescence intensities. Within each experimental set, mVenus brightness histograms were fitted to Gaussian distributions and used to calculate the average monomeric brightness value (Fig. 2 A). Pil1-mVenus brightness histograms exhibited a predominant population similar to mVenus and a minor population corresponding to higher brightness values (Fig. 2 A). Visual inspection of intensity and brightness values in the expanded orbits carpets, where the x dimension corresponds to each orbit pixel and the y dimension corresponds to independent measurements, suggested that the cytoplasm is mainly occupied by Pil1-mVenus with the brightness values similar to mVenus whereas higher brightness populations are found at eisosome's edges (Fig. 2 B). Similar brightness populations were detected for Lsp1-mVenus (data not shown). On the other hand, the eisosome core immobile fraction displays monomeric brightness values, which were more likely to have originated from fluctuations of the cytosolic pool.

To quantitatively assert the subcellular distribution of the different oligomeric populations, we segmented the orbit scans in three subcellular compartments (cytoplasm, eisosome core, and eisosome plus edges) using the intensity profile of the carpet (Fig. 3 A). Then, we classified brightness values in three categories: monomers, oligomers, and multimers, taking mVenus brightness values as a reference (see Fig. 3 B and the Supporting Material). The statistical analysis represented as overlapped box and dot plots confirms what is observed in Fig. 2 B: in wild-type cells, only 8% of Pil1-mVenus corresponds to oligomers, and multimers are few. Moreover, this analysis reinforces the hypothesis that eisosome edges are populated by a dynamic oligomeric fraction of Pil1, as has already been shown in Fig. 2 B. Considering all these results, we interpret the presence of Pil1 oligomers as a dynamic subpopulation that binds and dissociates from eisosomes with a kinetic constant of $2.9 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ (Figs. 1, 2, and 3 and Table S1). We note that fluctuations at both edges of the same eisosome are uncorrelated, ruling out that eisosome movements, as a whole, are responsible for the fluctuations at the eisosomes' edges.

Number and brightness plots provide the opportunity to determine the averaged distance between oligomers and the eisosome core. For this, we selected the number and brightness profiles of all the eisosomes with detected oligomers and fitted N&B profiles to Gaussian distributions (Fig. S2). Mapping of the centers of mass of the resulting Gaussian fits indicated that the mean distance

between oligomers and eisosomes is $275 \pm 60 \text{ nm}$, a value that resides within the dimensions of eisosomes (200–400-nm long and 50-nm deep). We asked whether this oligomeric population of Pil1 is sensitive to protein concentration. To address this point, we analyzed cells in which a high-copy vector containing *PIL1-mVENUS* was the sole source of Pil1 (see Materials and Methods for more details). Overexpression of Pil1 produces a normal number of eisosomes per cell, but with higher content of Pil1 per eisosome (18). N&B analysis of *PIL1*-overexpressing cells showed that, indeed, an increase in Pil1 protein concentration correlates with the appearance of higher amounts of oligomers and even higher-order assemblies (Figs. S3 and 3 B). Quantitative analysis of the cytoplasm fluorescence average intensity and brightness of overexpressed Pil1-mVenus showed that the artificial increment of cytoplasm protein concentration leads to the generation of bigger oligomeric and even multimeric aggregates of Pil1-mVenus within the cytoplasm (Fig. S3 C).

Fluorescence lifetime quenching analysis demonstrates that Pil1 and Lsp1 directly interact in the cytoplasm and at eisosomes

Our results indicate that Pil1 and Lsp1 coexist in the cytoplasm of mother cells sharing similar D_{app} (Fig. 1). Immunoprecipitation of whole-cell extracts followed by mass spectrometry analysis shows that both proteins physically interact in a close to equimolar relationship (17). In vitro, both proteins Pil1 and Lsp1 are able to form homodimers and high-order macromolecular assemblies (19–21). Despite all this evidence, it is still unknown whether the eisosome core proteins interact directly in live cells.

To address this point, we first asked whether *LSP1* deletion changes Pil1's cytoplasmic aggregation state. Previously, it has been shown that in the absence of Lsp1, there is a slight decrease in the number of eisosomes per cell (0.7-fold) and moderate increases in Pil1-GFP cytoplasmic and eisosome contents (1.8-fold and 1.7-fold, respectively), indicating that Pil1 by itself is still able to form wild-type-like eisosomes (17,18,22). Regardless of the mild phenotype of eisosomes' organization showed by *lsp1Δ* cells, N&B analysis of Pil1-mVenus revealed a more specific phenotype (Fig. S4). When compared with wild-type cells, N&B maps and box plots of *lsp1Δ* cells showed an overall increase in Pil1-mVenus brightness values. This increase is evident at eisosome edges and it is also detected within the cytoplasm (Fig. S4). These results, indicating that the lack of Lsp1 leads to an increase in the cellular content of Pil1 with higher brightness values, suggest that Pil1 homo-aggregation replaces Pil1-Lsp1 heterodimers that normally exist in wild-type cells.

To challenge this hypothesis, we performed Förster resonance energy transfer (FRET) experiments between Pil1 and

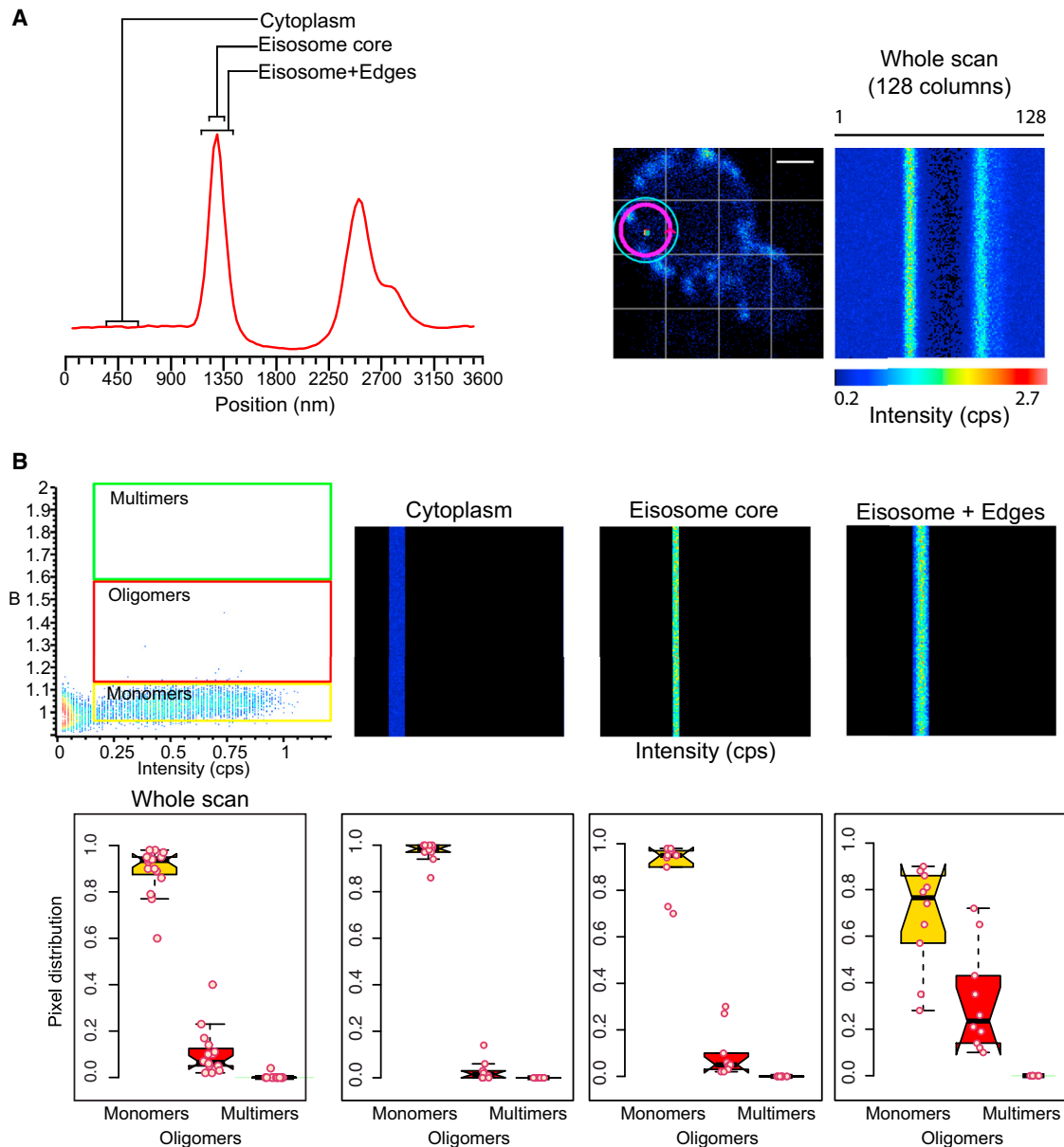


FIGURE 3 Pil1 aggregation states subcellular quantitation. (A) Subcellular compartments definition criteria. (Red) Intensity profile of a 128-pixel circular scan of a Pil1-mVenus yeast cell. Eisosome core consists of a 212-nm-wide area encompassing the intensity center of mass. Eisosome edges are defined as the eisosome core's contiguous 159-nm-wide areas and the cytoplasmic compartment is defined as the central 530-nm-wide area of cytoplasmic signal (for a more detailed explanation, see the [Supporting Material](#)). Scale bar: 2 μ m. (B) Monomeric, oligomeric, and multimeric ranges of brightness values were defined in relation to mVenus brightness-value distributions (for a more detailed explanation, see the [Supporting Material](#)). Intensity value (I-) carpets for each subcellular compartment as defined in (A) are shown. Boxplots show the statistical analysis of the pixel distribution belonging to each species in the whole scan and within each subcellular compartment as defined in (A). Data from three independent experiments with at least six cells per experiment were analyzed. To see this figure in color, go online.

pixels showed a clear decay in the donor lifetime, indicating that Pil1 and Lsp1 directly interact *in vivo* (Fig. 4 A, *two left panels*). To identify the subcellular source/s of the FRET signal we filtered the pixels into cytoplasm, eisosomes, and eisosome edge compartments (Fig. 4 B). In all cases, filtered pixels were displaced toward lower lifetime values, indicating that Pil1-Lsp1 direct interaction occurs in all subcellular compartments (Fig. 4 C, *two left panels*).

This result was independent of the protein donor carrier protein and, moreover, we observed higher FRET efficiency when the mCerulean carrier was Lsp1 (Fig. 4 C and Table 1). Considering unquenched mCerulean lifetimes in donor-only strains and autofluorescence, we calculated the FRET efficiencies for the donor-acceptor strains (see the [Supporting Material](#) for details). Table 1 summarizes the different FRET efficiencies for the complete set of

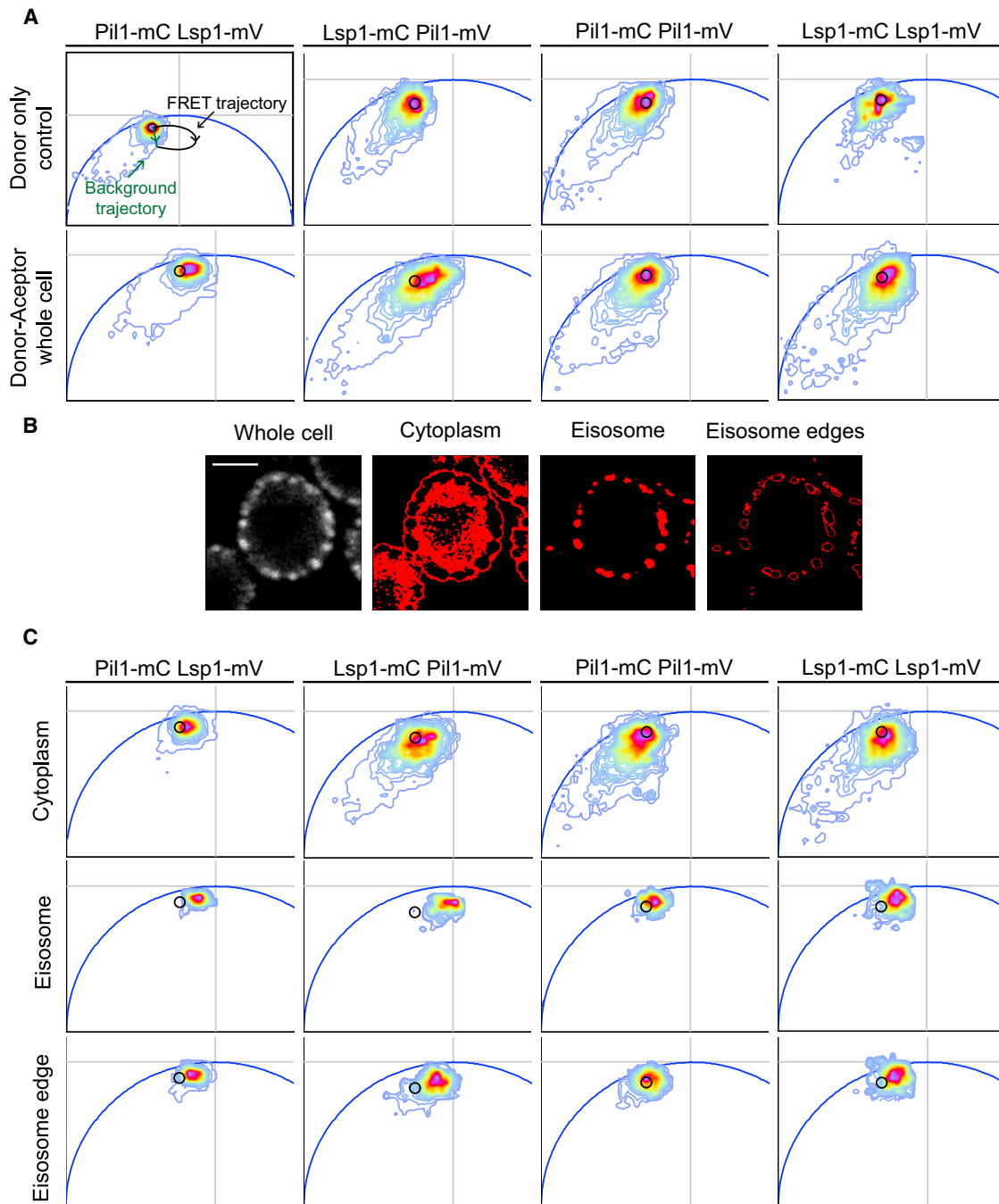


FIGURE 4 FLIM-FRET analysis of Pil1 and Lsp1 direct interactions in vivo. All possible combinations of mCerulean- and mVenus-tagged Pil1 and Lsp1 strains were imaged with a two-photon microscope equipped with a FLIMbox (ISS, Champaign, IL) and results were analyzed using the phasor plot approach. (A) Phasor distribution of lifetimes measured in cells expressing the fluorescent donor-only controls (Pil1-mCerulean or Lsp1-mCerulean) or donor-acceptor pairs. A theoretical FRET trajectory (black curved arrow) and a background trajectory (green arrow) are shown within the Pil1-mCerulean donor-only phasor plot (upper-left). The trajectory originates at the black circle (which represents 0% FRET efficiency), whereas the trajectory's end corresponds to 100% FRET efficiency. The black circle is concentric to the donor-only pixel distribution center-of-mass, and encompasses 80% of the pixels. This circle is repeated in phasor plots above as a visual reference of the donor-only center-of-mass position. (B) Example of fluorescence-intensity-based subcellular compartments segmentation. Scale bar, 2 μ m. (C) Phasor plots of pixels' lifetimes corresponding to the subcellular compartments as defined in (B). All phasor plots presented with pixel distribution lifetimes were built from the integration of six or more cells in each plot. From violet until red color, one standard deviation of the pixel dispersion is comprehended, and two standard deviations are contained until yellow. Phasor plots are shown zoomed-in for better visualization. To see this figure in color, go online.

TABLE 1 FRET efficiencies

Strain	Whole cell	Eisosome	Eisosome edge	Cytoplasm
Pil1-mC Lsp1mV	5	10	10	5
Lsp1mC-Pil1mV	12	20	17	12
Lsp1-mC Lsp1-mV	20	30	20	0
Pil1-mC Pil1-mV	10	20	15	0
Pil1-mC Pil1-mV <i>lsp1Δ</i>	5	28	18	10

Yeast strains expressing the different possible donor-acceptor FRET pairs were imaged for fluorescence lifetime data acquisition (see the [Supporting Material](#) for detail). For each strain, pixel distribution lifetimes coming from at least six different cells were integrated within the same phasor plot. FRET trajectories in the phasor plots were calculated and, for each subcellular segmentation, the FRET efficiency of the center of mass of pixel distribution in the phasor plot was calculated using the FRET calculator of SIMFCS (Globals Software, Laboratory for Fluorescence Dynamics, <http://www.lfd.uci.edu/globals/>). See [Figs. 4](#) and [S5](#) for visual inspection of phasor plots for center-of-mass positions and pixel population dispersions.

analyzed cells, discriminating among the different subcellular regions.

Thus, our point-FCS ([Fig. 1](#)), N&B ([Figs. 2](#) and [3](#)), and FLIM-FRET results strongly suggest that the cytoplasm of wild-type cells is populated by Pil1-Lsp1 heterodimers. However, these findings do not rule out the existence of a more complex scenario where Pil1-Pil1 and/or Lsp1-Lsp1 homodimers also contribute to eisosome structure. To address this possibility, we constructed heterozygote diploid strains containing either Pil1-mCerulean/Pil1-mVenus or Lsp1-mCerulean/Lsp1-mVenus pairs ([Table S2](#)) and performed live FLIM-FRET experiments. Phasor plots of the whole cellular signal showed decreases in the donor lifetime in Lsp1-Lsp1 pairs ([Fig. 4 A, right panel](#)) and, to a lesser extent, in Pil1-Pil1 pairs as well ([Fig. 4 A, third panel](#)). Phasor plot of the different subcellular compartments showed a donor lifetime reduction in eisosome and eisosome-edge pixels, but not in cytoplasmic pixels ([Fig. 4 C, right panels](#)). Calculated FRET efficiencies for both homo pairs across different cellular compartments confirm the lack of homotypic interaction in the cytoplasm and the presence of Pil1-Pil1 and Lsp1-Lsp1 interactions at eisosomes and eisosome edges ([Table 1](#)). We interpret the existence of homotypic interactions to be a result of higher-order assembly of Pil1-Lsp1 heterodimers at eisosomes and eisosomes' edges.

DISCUSSION

Using a complementary set of fluorescence fluctuation analysis methods, we have systematically addressed the dynamic properties of eisosome core proteins Pil1 and Lsp1 in live cells. In a simplistic view, eisosome assembly occurs in daughter cells (growing buds), whereas, in mother cells, already-assembled eisosomes are in a steady state. In this work, we focused on Pil1 and Lsp1 behavior within the cytoplasm and eisosome compartments of mother cells.

Further work will be directed toward the understanding of eisosome assembly in daughter cells.

Based on several examples of our experimental evidence, we propose that the Pil1-Lsp1 heterodimer constitutes the eisosome's minimal building block, as follows. First, Pil1-mVenus (molecular mass 65.8 kDa) and Lsp1-mVenus (molecular mass 65.5 kDa) cytoplasmic populations exhibit D_{app} ($5 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $8 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, respectively) that, when compared with mVenus (molecular mass 27.5 kDa, $D_{app} = 11 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$), are compatible with dimeric or low aggregation states ([Fig. 1](#)). Second, live FLIM-FRET results indicate Pil1 and Lsp1 directly interact in the cytoplasm and eisosomes ([Fig. 4](#) and [Table 1](#)). Third, similar FLIM-FRET experiments detected Pil1-Pil1 and Lsp1-Lsp1 homotypic interactions only where assembled scaffolds and oligomers are present ([Fig. 4](#) and [Table 1](#)). Because the Pil1-Pil1 donor-acceptor pair does exhibit positive FRET signals at cytoplasmic pixels in *lsp1Δ* cells ([Fig. S5](#) and [Table 1](#)), we reason that negative FLIM-FRET results for Pil1-Pil1 cytoplasmic homotypic interaction in wild-type cells cannot be attributed to insufficient closeness and/or orientation of the donor and acceptor dipoles. Fourth, N&B analysis of Pil1-mVenus and Lsp1-mVenus in wild-type cells detected cytoplasmic brightness values equivalent to mVenus only ([Figs. 2](#) and [3](#), and data not shown). Although we cannot rule out the possibility that a fraction of cytosolic Pil1 and/or Lsp1 may exist in a monomeric state, the cytoplasmic dominance of monomeric brightness values for both proteins is better interpreted as arising from Pil1-Lsp1 heterodimers. Based on ACF and N&B analysis, we calculate the concentration of Pil1-Lsp1 cytoplasmic heterodimers to be ~400–800 nM. Thus, our results suggest that the cytoplasm of mother cells contain mainly Pil1-Lsp1 heterodimers in the nanomolar concentration range. Both point and orbital scans were applied to mother cells carrying small- to mid-size buds, and therefore, our estimations integrate cells that transit the G2/M phase. This is relevant in the context of eisosome biogenesis, which is cell-cycle-regulated and occurs in correlation with a burst of Pil1 total protein levels during G2/M phase ([18](#)). However, as of this writing, whether Pil1-Lsp1 cytoplasmic heterodimers levels fluctuate during the cell cycle, and growing buds are occupied by similar Pil1-Lsp1 cytoplasmic species and concentrations, is unknown.

Although orbital scans were performed over a wide range of sampling intervals (488–122 Hz), we were unable to detect autocorrelation of fluorescence fluctuations at eisosome cores. However, the presence of Pil1 and Lsp1 mobile fractions immediately located next to eisosome highest-intensity pixel values indicates that already-built eisosomes are not completely static assemblies, but instead exhibit heterogeneous dynamics. ACF analysis suggests that both Pil1 and Lsp1 eisosome-associated mobile fractions follow first-order binding-unbinding kinetics with similar rate constants ([Fig. 1](#)). Brightness values indicate the existence of similar

aggregation states for both proteins, and FLIM-FRET results indicate that Pil1 and Lsp1 directly interact at eisosomes borders, where oligomers are located (Fig. 4). Taken altogether, our results support the idea that the independently observed Pil1 and Lsp1 oligomers belong to the same dynamic entity.

Which is the subcellular compartment where Pil1-Lsp1 oligomers partition? As of this writing, whether it is the plasma membrane or the cytoplasm is unknown. Because oligomers are not detected further away from eisosomes, it seems unlikely that they partition within the cytoplasm. Quantification of the most probable distances between the eisosomes' centers of mass and oligomers give values within the range of eisosome dimensions. Because of the comparable dimensions of the point-spread function (PSF) of our scanning system (300-nm axial diameter) and eisosome dimensions, we acknowledge that eisosomes can be encompassed by a single PSF. However, Gaussian fits for N&B distributions locate brightness centers away from eisosome centers of mass within a distance that is comparable with PSF axial diameter (Fig. S2). Therefore, we propose that oligomers are located at or near to eisosome edges. Taken together, the binding-equilibrium-dominated kinetics and the short-range location area suggest that oligomers are plasma-membrane-bound entities. In this view, steady-state eisosomes exchange Pil1-Lsp1 oligomeric subunits composed by Pil1-Lsp1 heterodimers that are still attached to the plasma membrane. Either total-internal-reflection-fluorescence microscopy coupled to ACF analysis or super-resolution live imaging techniques compatible with single-particle tracking should help to clarify this issue.

Remarkably, orbital scans, ACF, and N&B analysis of eisosomes with similar intensity profiles show that not all, but a subset, contains dynamic Pil1-mVenus and Lsp1-mVenus oligomers (Fig. 1 B, right panel insets). Thus, we can distinguish at least two different populations of mother cells' eisosomes: one where the main structural proteins remain static, and one where what we call an "active population" is being remodeled (and which is evidenced by the presence of mobile oligomers). This can explain why different fluorescence-recovery-after-photobleaching experiment analyses alternatively reported zero recovery and small but significant recovery of Pil1-GFP fluorescence after photobleaching (17,19). Because our measurements provide a local snapshot of the complete cell, we do not know whether active eisosomes remain as such, or if they switch to an alternative state with no structural proteins exchange.

An attractive speculation is that these two eisosome populations reflect the dynamic partition within the plasma membrane of different cellular events. Consistent with this idea, work on Slm1 and Slm2 indicates that these signaling proteins, which mediate TORC2-dependent control of lipid homeostasis, colocalize with a subset of eisosomes. More-

over, this discrete localization pattern is dynamic and responds to plasma membrane stress caused by membrane stretch or sphingolipids synthesis inhibition (16). Pil1 and Lsp1 are multiphosphorylated proteins, and their phosphorylation status depends on the activities of the Pkh1/2-Ypk1/2 and Pkc1 kinases' signaling pathways (13,30,31). Pkh2 concentrates in plasma membrane foci that are restricted to a subset of eisosomes (22). *PKH2* (and also *PKH1*) overexpression leads to Pil1 and Lsp1 hyperphosphorylation and to eisosomes disassembly (14). It is proposed that hyperphosphorylation of Pil1 and Lsp1 obliterates the capacity of positively charged residues to interact with the plasma membrane. Pil1 and Lsp1 membrane binding depends in part on positively charged residues that interact with phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PI(4,5)P2), and are located within their BAR domains (21). PI(4,5)P2 depletion, like Pkh kinases overexpression, leads to eisosome disassembly strongly suggesting that protein-lipid electrostatic interactions are paramount to maintain eisosome core proteins cohesion within the plasma membrane (21). It has been previously demonstrated that eisosomes are needed for PI(4,5)P2 phosphatases Inp51 and Inp52 recruitment to the plasma membrane (32).

It has been recently demonstrated that the PI(4,5)P2 phosphatase Inp51 is recruited within a subset of eisosomes (33). Taking all these observations together, it seems evident that eisosomes are not homogeneous regarding different signaling molecules' recruitment. Thus, it is tempting to speculate that active eisosomes might be sites where either Inp51 and/or Pkh2 concentrate and therefore modify the plasma membrane composition and/or structural proteins leading to eisosome remodeling. Although there is no evidence showing that active eisosomes are the sites where signaling molecules such as Slm1/2 and Pkh2 transiently concentrate, these separate observations still argue in favor of the specialization of eisosomes as sites of specific signaling events.

This study highlights the value of combined fluorescence fluctuation analysis methods in defining the dynamics of eisosomes and their constitutive proteins. Much as single-cell experiments have begun to reveal many novel aspects of cell-to-cell variation, our single-eisosome analysis underlines the capacity of FCS methods to interrogate functional diversity within apparently homogeneous subcellular structures. Further work combining these methodologies and others related, such as super-resolution- and total-internal-reflection-fluorescence-FCS, will be crucial to uncover functional relationships between eisosomes and the different signaling pathways that dynamically locate within.

SUPPORTING MATERIAL

Supporting Materials and Methods, six figures and two tables are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(15\)00171-X](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(15)00171-X).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.O.-C. performed all the experiments described in the study with help from V.S. (strains construction) and M.M. (strains verification). A.O.-C. processed and analyzed the data with input from E.G., P.S.A., and M.A.D. P.S.A. and A.O.-C. conceived the project, guided the experiments, and wrote the article with input from E.G.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alejandro Colman-Lerner for reagents, Alessandro Rossetta for helpful advice in data processing, and Laura Estrada Leonel Malacrida, and members of the Gratton and Aguilar laboratories for scientific advice and comments on the article.

This work was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación de Uruguay (grant No. FCE-3-2011-1-5942 and Travel Fellowship to P.S.A. and A.O.-C.), the Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas, the MERCOSUR Structural Convergence Fund (Fondo para la Convergencia Estructural del MERCOSUR, FOCEM, COF 03/11), the National Institutes of Health (grants No. NIH P41-GM103540 and No. NIH P50-GM076516 to E.G. and M.A.D.), the Journal of Cell Science Traveling Fellowship (to A.O.-C.), a Wood/Whelan Fellowship from the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (to A.O.-C.), and Master and Doctoral fellowships from Sistema Nacional de Becas (to M.M. and A.O.-C., respectively).

SUPPORTING CITATIONS

References (34–37) appear in the [Supporting Material](#).

REFERENCES

- Matsumoto, K., J. Kusaka, ..., H. Hara. 2006. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* 61:1110–1117.
- Simons, K., and J. L. Sampaio. 2011. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a004697.
- Tanos, B., and E. Rodríguez-Boulán. 2008. The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene.* 27:6939–6957.
- Kusumi, A., K. G. Suzuki, ..., T. K. Fujiwara. 2011. Hierarchical meso-scale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem. Sci.* 36:604–615.
- Eggeling, C., C. Ringemann, ..., S. W. Hell. 2009. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature.* 457:1159–1162.
- Bagatolli, L. A., and O. G. Mouritsen. 2013. Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front. Plant Sci.* 4:457.
- Olivera-Couto, A., and P. S. Aguilar. 2012. Eisosomes and plasma membrane organization. *Mol. Genet. Genomics.* 287:607–620.
- Spira, F., N. S. Mueller, ..., R. Wedlich-Söldner. 2012. Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell Biol.* 14:640–648.
- Strádalová, V., W. Stahlschmidt, ..., J. Malinsky. 2009. Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J. Cell Sci.* 122:2887–2894.
- Moor, H., and K. Mühlethaler. 1963. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.* 17:609–628.
- Malinská, K., J. Malinský, ..., W. Tanner. 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell.* 14:4427–4436.
- Grossmann, G., M. Opekarová, ..., W. Tanner. 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* 26:1–8.
- Zhang, X., R. L. Lester, and R. C. Dickson. 2004. Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J. Biol. Chem.* 279:22030–22038.
- Walther, T. C., P. S. Aguilar, ..., P. Walter. 2007. Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO J.* 26:4946–4955.
- Grossmann, G., J. Malinsky, ..., W. Tanner. 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 183:1075–1088.
- Berchtold, D., M. Piccolis, ..., R. Loewith. 2012. Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat. Cell Biol.* 14:542–547.
- Walther, T. C., J. H. Brickner, ..., P. Walter. 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature.* 439:998–1003.
- Moreira, K. E., T. C. Walther, ..., P. Walter. 2009. Pil1 controls eisosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 20:809–818.
- Olivera-Couto, A., M. Graña, ..., P. S. Aguilar. 2011. The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Mol. Biol. Cell.* 22:2360–2372.
- Ziótkowska, N. E., L. Karotki, ..., T. C. Walther. 2011. Eisosome-driven plasma membrane organization is mediated by BAR domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:854–856.
- Karotki, L., J. T. Huiskonen, ..., T. C. Walther. 2011. Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *J. Cell Biol.* 195:889–902.
- Fröhlich, F., K. Moreira, ..., T. C. Walther. 2009. A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J. Cell Biol.* 185:1227–1242.
- Moreira, K. E., S. Schuck, ..., P. Walter. 2012. Seg1 controls eisosome assembly and shape. *J. Cell Biol.* 198:405–420.
- Elf, J., G. W. Li, and X. S. Xie. 2007. Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell. *Science.* 316:1191–1194.
- Slaughter, B. D., J. W. Schwartz, and R. Li. 2007. Mapping dynamic protein interactions in MAP kinase signaling using live-cell fluorescence fluctuation spectroscopy and imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:20320–20325.
- Digman, M. A., R. Dalal, ..., E. Gratton. 2008. Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophys. J.* 94:2320–2332.
- Fletcher, A. B., and B. S. Cox. 1984. Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 157:283–290.
- Digman, M. A., V. R. Cairola, ..., E. Gratton. 2008. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophys. J.* 94:L14–L16.
- Hinde, E., M. A. Digman, ..., E. Gratton. 2012. Biosensor Förster resonance energy transfer detection by the phasor approach to fluorescence lifetime imaging microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 75:271–281.
- Luo, G., A. Gruhler, ..., R. C. Dickson. 2008. The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J. Biol. Chem.* 283:10433–10444.
- Mascaraque, V., M. L. Hernáez, ..., M. Molina. 2013. Phosphoproteomic analysis of protein kinase C signaling in *Saccharomyces cerevisiae* reveals Slr2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent phosphorylation of eisosome core components. *Mol. Cell. Proteomics.* 12:557–574.
- Murphy, E. R., J. Boxberger, ..., K. Kim. 2011. Pil1, an eisosome organizer, plays an important role in the recruitment of synaptojanins and amphiphysins to facilitate receptor-mediated endocytosis in yeast. *Eur. J. Cell Biol.* 90:825–833.
- Fröhlich, F., R. Christiano, ..., T. C. Walther. 2014. A role for eisosomes in maintenance of plasma membrane phosphoinositide levels. *Mol. Biol. Cell.* 25:2797–2806.

34. Dalal, R. B., M. A. Digman, ..., E. Gratton. 2008. Determination of particle number and brightness using a laser scanning confocal microscope operating in the analog mode. *Microsc. Res. Tech.* 71:69–81.
35. Janke, C., M. M. Magiera, ..., M. Knop. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. 21:947–962.
36. Unger, T., Y. Jacobovitch, ..., Y. Peleg. 2010. Applications of the restriction free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J. Struct. Biol.* 172:34–44.
37. Digman, M. A., C. M. Brown, ..., E. Gratton. 2008. Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 94:2819–2831.

Biophysical Journal

Supporting Material

Eisosomes Are Dynamic Plasma Membrane Domains Showing Pil1-Lsp1 Heteroligomer Binding Equilibrium

Agustina Olivera-Couto,¹ Valentina Salzman,¹ Milagros Mailhos,¹ Michelle A. Digman,^{2,3} Enrico Gratton,^{2,*} and Pablo S. Aguilar^{1,*}

¹Laboratorio de Biología Celular de Membranas, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ²Laboratory for Fluorescence Dynamics, Department of Biomedical Engineering, University of California-Irvine, Irvine, California; and ³Centre for Bioactive Discovery in Health and Ageing, School of Science and Technology, University of New England, Armidale, Australia

Supporting Materials and Methods:**S. cerevisiae strains, reagents, media and growth conditions:**

Yeast strains were built from the w303 genetic background (*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*). *pym25* and *pym27* from EUROSCARF plasmid collection (1) where modified by RFcloning (2) substituting GFP open reading frame by monomeric Venus (mVenus) and monomeric Cerulean (mCerulean), respectively. mVenus and mCerulean open reading frames where taken from plasmids 27794 and 15214 (AddGene, Cambridge, MA). *pym25-mVenus* and *pym27-mCerulean* where used for C-terminal PCR based tagging of eisosomal proteins and pFA6a for PCR based gene deletion (1). Single tagged and single deletion strains where generated (Table S2) and checked by PCR and confocal microscopy. We combined different pairs of the former strains and performed matting, sporulation and tetrad dissections obtaining a set of strains with two chromosomal modifications (Table S2). Matting assays were performed in YPD plates (1% yeast extract (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), 2% bacto-peptone (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) and 2% glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10% agar (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)) at 30C overnight. Diploids were selected and incubated for sporulation over three days in SPO media (2.5 mg/L yeast extract, 150 mM potassium acetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1X complete supplement mixture (Sunrise Science Products, San Diego, CA) and 0.05% glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)). Tetrads' dissection was performed in a dissection microscope (Singer Instrument, Somerset, UK); final strains were PCR and confocal microscopy checked. Using specific antibodies against Pil1 and western blotting, we verified that Pil1-mVenus protein levels were similar to Pil1 levels of the wild type strain w303 (Figure S6).

For mVenus cytoplasmic expression and Pil1-mVenus OE, pEG202 plasmid (generously given by Alejandro Colman Lerner) was used. It expresses *lexA* open reading frame under the control of *ADHI* gene promoter. We applied gap repair cloning technic to substitute *lexA* by mVenus or Pil1-mVenus open reading frames. For gap repair transformation in w303 yeast we linearized pEG202 with EcoRI and BamHI (New England Biolabs, Ipswich, MA) restriction enzymes.

In general, yeast strains were grown in 10 ml of complete media YPD to an OD600 between 0,8-1. For microscopy experiments, yeast cells were cultured (for a minimum of 18 hours) in SC complete defined media without RivoFlavin and Folic Acid (Sunrise Science Products, San Diego, CA) and supplemented with 80 ng/mL Adenine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 30C to an optical density of 0.2-0.4. For imaging 200 uL of cell culture was incubated in Concanavalin-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) coated chambers for ten minutes (glass 1.5#) (Mat Tek Corporation, Ashland, MA). Finally, SC media was replaced for fresh one and cells were imaged.

Western blotting:

Cells were harvested by centrifugation and resuspended on 200 ul of 8 M Urea (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Equal volume of 0,5 mm diameter glass beads were added to the resuspension, and cells where then subjected to 5 minutes agitation in bead beater (Genius). Once finished, 10 uL 10% SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were added and the mixture was incubated at 65C

for 5 minutes. After that time cellular debris were pelleted by centrifugation for 10 minutes at 17 000 g, and the supernatant collected.

Total protein was measured using a commercially available BCA assay (Thermo Scientific, Waltham, MA) following the manufacturer's recommendations. Using BSA as the standard protein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a standard curve was prepared at levels 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL. Samples were diluted in water as needed. Standards and sample dilutions were run in triplicate on 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY). Buffer blanks were run in parallel and were used to correct for background. Plates were read on a multiscan microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) at 570 nm.

For all samples 20 μ g of total protein were subjected to 15% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, GE Healthcare, Wilmington, MA) that was blocked overnight at 4C with 5% non-fat dry milk in Tris Buffered Saline containing 0,05% Tween-20 (TBST, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). For immunoblotting, the membranes were incubated for 2h at room temperature with a polyclonal rabbit antiserum raised against recombinant purified Pill1 diluted 1:20000 or for loading control rabbit anti-Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted 1:20000 in TBST, 5% non-fat dry milk. The membranes were washed three times for 10 minutes with TBS-T. The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used at a dilution of 1:16000 in TBS-T, 5% non-fat dry milk for 90 minutes and the membranes were subsequently washed three times for 10 minutes with TBS-T, developed using ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Wilmington, MA) and exposed on a Hyperfilm ECL Chemiluminescence film (GE Healthcare, Wilmington, MA). Overexposure was in all cases prevented varying the exposure time. A pre-stained molecular mass marker ranging from 10 to 250 kDa were used to determine protein sizes (Thermo Scientific, Waltham, MA). ECL images were digitized using a SnapScan scanner (Agfa, Mortsel Belgium). Scanwise software was used to eliminate automatic grey scale adjustments done by the scanner to preserve linearity. Gel images were analysed using the ImageJ program (National Institutes of Health, NIH). Applying the "Rectangular Selection" tool a rectangular box was arbitrarily defined to the first lane and once defined the same box was used to measure all lanes present in the gel. The "Gel Analysis-Plot Lanes" function was used to draw a profile plot of each lane. The profile plot represents the relative density of the contents of the rectangle over each lane. Using the "Straight line" tool, a base line was drawn across each peak to enclose it and eliminate background and the "Wand" tool was applied to measure the area under the curve. Densities thus obtained for Pill1 were normalized with that obtained for G6PDH, and different mutants were analysed against WT. Since the values for Relative Density obtained are essentially arbitrary numbers, they only have meaning within the context of the set of peaks selected in a single gel image. For these reason, differences in protein expression were in all cases interpreted within a gel image.

Microscope setup:

A home-built two-photon excitation microscope based on an Olympus IX71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) was used for all experiments (except for FLIM). The microscope was equipped with an Olympus UPlanFLN 60x water objective (NA=1.2)

(Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and two photomultiplier detectors with a photon counting module H7422P-40 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). The excitation light was provided by a mode-locked 80 MHz Ti:Sapphire laser Chameleon Ultra (Coherent Inc., Santa Clara, CA) with integrated Verdi tuneable from 690 to 1040 nm (for mVenus excitation 900 nm were used). We used a short-pass dichroic mirror 700DCSPXR (Chroma Technologies, Bellows Falls, VT) to direct the excitation light into the sample, and a 520BP-30 (Chroma Technologies, Bellows Falls, VT) filter to select mVenus emission. The average laser irradiation after the microscope objective was the signal was amplified ACA-4-35N (Becker&Hickl, Berlin, Germany), a constant fraction discriminator model 6915 (Phillips Scientific, Mahwah, NJ) was used to convert the photon current in transistor–transistor logic (TTL) electronic pulses. Finally, the TTL pulses were counted using a FCS-PCI counter card version 0.2 (ISS, Champaign, IL). The scanning of the samples was performed using galvano motor-driven mirrors 6350 (Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA) with a controller series 603X servo system 60335 FM (Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA), and a PIFOC P-721 piezo-driven objective device (Physik Instrumente, Karlsruhe/Palmbach, Germany). Both galvano and piezo were driven by an 3-axis card (ISS, Champaign, IL).

Only for the FRET experiments, FLIM data was acquired with a Zeiss LSM710 META laser scanning microscope (Zeiss, Jena, Germany), coupled to a 2-photon Ti:Sapphire laser (Spectra-Physics Maitai, Newport, CA) producing 80 fs pulses at a repetition of 80 MHz, and a ISS A320 FastFLIM box (ISS, Champaign, IL) to acquire the lifetime data in the digital frequency domain. A 63X oil immersion objective 1.4 N.A. (Zeiss, Jena, Germany) was used. The 2-photon excitation laser was tuned to 850 nm for excitation of the donor and acceptor fluorophores. A SP 760 nm dichroic filter was used to separate the fluorescence signal from the laser light. The fluorescence signal was directed through a 509 LP filter, and the donor and acceptor signal split between two photomultiplier detectors H7422P-40 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan), with the following bandwidth filters in front of each: mCerulean 470/22 and mVenus 542/27, respectively. Pixel size of scanned images was 20 x 20 nm (x,y).

Mathematics and data processing:

All data was obtained and analyzed using SimFCS software (Laboratory for Fluorescence Dynamics, UCI, <http://www.lfd.uci.edu/globals/>, Irvine, CA). For specific statistical analysis like Gaussian fitting and boxplot constructions we also used MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, MA) and R (The R Foundation for Statistical Computing), respectively.

Number and Brightness analysis

Number (n) is defined as the average number of fluorescent molecules that were inside the observation volume during the pixel dwell time and molecular brightness (ϵ) as the average number of emitted photons per molecule per second when the molecule is at the centre of the PSF (Point Spread Function).

The brightness of a fluorescent molecule depends on a series of external factors including microscope laser and detectors. Also brightness depends on an intrinsic factor: the molecular oligomerization of the fluorescent particle observed. So if all the

cell external factors are constant we can use the brightness as a linear indicator of homo-oligomerization state when studying fluorescent-tagged proteins.

After sampling a pixel over time, N&B fluctuation analysis calculates these parameters from the average intensity at the pixel and the variance in the intensity distribution (3). For a given average, a large variance means that few bright molecules contributed to the average, while a small variance means that a high number of less bright molecules contributed to the average (3). Since we worked with a photon counting system it is not necessary to apply correction factors (4). The equations used to calculate B and N are:

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} = \varepsilon + 1$$

$$N = \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2} = \frac{\varepsilon n}{\varepsilon + 1}$$

where,

B is the apparent brightness

N is the apparent averaged number of molecules

$\langle k \rangle$ is the averaged intensity

σ^2 is the variance

For N&B analysis all the compared strains were imaged and processed exactly with the same method. Living yeast cells, concanavalin-A immobilized to the glass chamber, were observed by raster scan (256x256 pixel format, 36 nm pixel size) to focus the equatorial cell plane. An orbital scan of 30 pixel diameter was located in the image in order to scan cytoplasm, membrane, cell exterior, membrane and cytoplasm (Figure 1A). Circular scans were performed with 128 pixels along the circumference and a 16 μ s pixel dwell time (orbital frequency of 488 Hz). The scan was repeated 20,480 times leading to a carpet of 128 columns. Pixel size in the orbit scan (calculated from pixel size of raster scan, orbit radius and number of pixels of the orbit) was 53 x 53 nm (x,y). Constant laser power was used between different scans and strains in the same day experiment. Intensity profiles across time were inspected for all the scans and a slow negative trend was detected due to photo-bleaching. In order to correct this trend we divided the carpets in segments of 10 seconds and we added to each segment random uncorrelated counts in order to match all segment mean count values with the intensity of the segment with most counts. The resultant detrended carpets were then free of slow trends due to photo-bleaching (3). Subsequently, intensity profiles were inspected again to verify that slow trends due to photo-bleaching were eliminated. Resulting orbital scanning records corresponding to the first half (10,240 orbits) were segmented into 128 smaller segments that were independently analyzed using the ‘N and B’ toolbox of SimFCS. In figures 2, 3, S3 and S4, I and B carpets show, in 128 consecutive rows, 128 independent N and B experiments for each scanned pixel. Each group of strains was analysed in a minimum of 3 independent experiments each consisting of a minimum of 6 scanned cells per strain.

For subcellular compartments definition the circular scan intensity profiles were used (Figure 3A). Gaussian fits were defined over intensity values and then we defined the eisosome core as the fluorescence centre of mass that encompasses the mean plus/minus

one standard deviations (SD) of the total eisosome fluorescence intensity signal, which, is in average, four pixels wide (212 nm). The remaining 30% of the signal was taken as signal providing mainly from the eisosome and surrounding space, what we have called eisosome edges (the three next contiguous pixels to the eisosome core) and the cytoplasmic compartment was defined as the central ten pixels (530 nm) wide area of cytoplasmic signal. Monomeric, oligomeric (from dimers to decamers) and multimeric B value ranges were defined in relation to mVenus B value distributions. Oligomer selection includes all pixels that have B values higher than the averaged monomer B value plus three SD and lower or equal to the averaged monomer B value plus 9 monomer molecular brightness (ϵ) values. All pixels with B values higher than oligomers were consider multimers.

Auto Correlation function (ACF):

For column ACF analysis the same sets of data than N&B analysis were used. Also point scans in the cytoplasm with scan frequencies of 50.000 or 100.000 Hz were analysed. For the time correlation, the time series was broken in segments and the average correlation function was calculated from the autocorrelation function of each segment. For ACF fitting three different models were applied: free diffusion of one component, free diffusion of two components and binding-unbinding equilibrium using the equations described in (5). ACF analysis and fittings were done using SimFCS software (Laboratory for Fluorescence Dynamics, UCI, <http://www.lfd.uci.edu/globals/>, Irvine, CA) and evaluated by χ^2 value (Table S1).

PSF calibration:

Due to the possible variation in the laser alignment from day to day PSF waist was calibrated for every experiment using fluorescein 10 nM in TRIS buffer pH 8, which has a known diffusion coefficient of $400 \mu\text{m}^2/\text{s}$ at 25C. The value of w_z for two-photon experiments was assumed to five-times the radial waist.

FLIM-FRET analysis:

We performed *in vivo* Förster Resonance Energy Transfer (FRET) experiments using mVenus fluorescent tag as donor and mCerulean as acceptor. To detect the quenching of the donor's fluorescence lifetime during FRET phenomenon we used the phasor approach to fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) (6, 7). Each pixel lifetime of the scanned cells was represented in the phasor plot using SimFCS software for analysis. The experimental position of the phasor of a given pixel along the trajectory determines the amount of quenching and therefore the FRET efficiency of that location. The contributions to the lifetime values of the background autofluorescence and of the unquenched donor are evaluated using the rule of the linear combination. Cells with no fluorescent tag were analysed for the background autofluorescence lifetime calibration and cells expressing either Pil1-mVenus or Lsp1-mVenus only were analysed for calibration of unquenched donor lifetime. To identify the subcellular source/s of the FRET signal we filtered, using the simFCS intensity histogram tool, the pixels corresponding to cytoplasm, eisosomes and eisosome edge compartments. In comparison to N&B segmentation, eisosome core and eisosome edges pixel values (and nanometers) are comparable. In the case of subcellular analysis we corroborated that the lifetime of donor only control was the same in all cell locations. For calculation of FRET efficiencies we considered unquenched mCerulean lifetimes in donor-only strains and background autofluorescence lifetimes in cells with no

fluorescent tag. Black circles encompass the pixel populations of the donor-only (0% FRET efficiency) and background controls. In all cases, at least 80% of the total pixel population was included within the circles. Encircled populations of pixels from these control strains were used to determine the expected FRET trajectories within the phasor plot using the ‘assign’ and ‘FRET calculator’ tools of SimFCS. The resulting FRET trajectories (see an example in Figure 4A, curved arrow in upper-left phasor plot) indicate the different expected positions within the phasor plot that correspond to different FRET efficiencies (from 0 to 100%). This calculation was done for each experiment and allowed to determine the FRET efficiency of the selected pixels populations among the different imaged strains. FRET efficiencies reported in Table 1 correspond to the value of efficiency of the calculated trajectory that intercepts the centre of mass of pixel lifetimes distributions coming from at least six different and independently imaged cells that were integrated in the same phasor plot. In the case of homotypic FRET analysis (Pil1-mCerulean Pil1-mVenus and Lsp1-mCerulean Lsp1-mVenus), FRET trajectory calculations also included the extra assumption that a 50% of the donor lifetimes could be unquenched due to interaction between donor-tagged proteins (Pil1-mCerulean-Pil1-mCerulean and Lsp1-mCerulean-Lsp1-mCerulean). Calculations were done using the SimFCS software developed at the Laboratory for Fluorescence Dynamics (www.lfd.uci.edu). Color coded representation of phasor plots of SimFCS is calibrated in a way that the centre of mass plus/minus one SD of the pixel dispersion is comprehended within the violet-colored pixels (which include the centre of mass) and the red-colored pixels, whereas two SD are contained between the violet- and the yellow-colored pixels. Details about the mathematical equations considered for the phasor transformation and FRET efficiency calculations can be found in previously published papers (6, 7).

Supporting Tables:

Table S1. Eisosome edge ACF free diffusion or binding-unbinding equilibrium fittings

Lsp1	Binding			Free diffusion			χ^2 ratio
	k	A	χ^2	D	$G_{(0)}$	χ^2	
1	4.2	0.006	6.7115E-06	0.0078	0.059	6.8185E-06	1.02
2	2.9	0.0028	2.3197E-06	0.03	0.003	2.3919E-06	1.03
3	4	0.0047	4.1265E-06	0.05	0.0054	4.2686E-06	1.03
4	2.9	0.0036	5.1873E-06	0.034	0.0039	5.2988E-06	1.02
5	3.8	0.0026	2.7405E-06	0.082	0.004	4.3752E-06	1.60
6	3.4	0.0027	1.7313E-06	0.074	0.003	1.8116E-06	1.05
7	2.6	0.043	5.10655E-05	0.033	0.051	5.53492E-05	1.08
8	1.6	0.011	0.000028152	0.022	0.0044	3.59926E-05	1.28
9	2.8	0.0038	1.34956E-05	0.026	0.0042	1.36259E-05	1.01
10	2	0.0058	1.22081E-05	0.031	0.0069	1.22317E-05	1.00
11	4.1	0.0048	0.000013067	0.047	0.0054	1.32089E-05	1.01
Mean	3.1	0.01		0.04	0.01		1.1
SD	0.9	0.01		0.02	0.02		0.2
Pil1	Binding			Free diffusion			χ^2 ratio
	k	A	χ^2	D	$G_{(0)}$	χ^2	
1	4.1	0.034	5.5572E-06	0.067	0.038	9.38885E-06	1.69

2	2.1	0.011	8.1859E-06	0.058	0.012	8.5432E-06	1.04
3	2.9	0.0022	1.0944E-06	0.13	0.0025	1.1614E-06	1.06
4	3.1	0.037	5.32655E-05	0.11	0.039	6.70371E-05	1.26
5	2.3	0.025	9.33019E-05	0.05	0.031	9.46982E-05	1.01
6	2.4	0.052	0.356104555	0.34	0.094	0.384338149	1.08
7	2.5	0.0031	8.439E-07	0.074	0.0035	8.906E-07	1.06
8	3.6	0.0016	1.3121E-06	0.14	0.0019	1.3164E-06	1.00
9	2.7	0.0022	1.6156E-06	0.01	0.0024	1.6915E-06	1.05
10	3.5	0.0043	8.8	0.23	0.0052	9.3	1.06
Mean	2.9	0.02		0.2	0.02		1.1
SD	0.6	0.02		0.1	0.03		0.2

Yeast strains expressing Lsp1-mVenus and Pil1-mVenus (top and bottom panels) were analyzed by circular scans and carpet columns corresponding to eisosome edges showed ACF. These ACF were fitted by two different models, free diffusion (characterized by $G_{(0)}$ and D (in $\mu\text{m}^2/\text{s}$)) and binding-unbinding equilibrium (characterized by amplitude A and rate k (in s^{-1})). Each fit provides a χ^2 value. The ratio of the χ^2 values for the fit using the binding-unbinding equation and the diffusion equation are reported in the last column.

Table S2. Yeast strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Source
PSAY1240	W303 <i>MATa</i> carrying pEG202mVenus (HIS3 ADH1p-mVENUS).	This work.
PSAY1133	W303 <i>MATα</i> <i>PIL1-mVENUS-hphNT1</i> .	This work.
PSAY1019	W303 <i>MATα</i> <i>PIL1-mCERULEAN-kanMX4..</i>	This work.
PSAY1041	W303 <i>MATα</i> LSP1-mVENUS- <i>hphNT1</i> .	This work.
PSAY1040	W303 <i>MATα</i> LSP1-mCERULEAN- <i>kanMX4..</i>	This work.
PSAY1245	W303 <i>MATa</i> <i>pil1::caLeu</i> pEG202-Pil1mVenus-HIS.	This work.
PSAY1194	W303 <i>MATa</i> <i>lsp1::NAT</i> <i>PIL1-mVENUS-hphNT1</i> .	This work.
PSAY1059	W303 <i>MATα</i> <i>PIL1-mCERULEAN-kanMX4. LSP1-mVENUS-hphNT1</i> .	This work.
PSAY1127	W303 <i>MATα</i> LSP1-mCERULEAN- <i>kanMX4. PIL1-mVENUS-hphNT1</i> .	This work.
PSAY1132	W303 <i>MATdiploid</i> <i>PIL1-mCERULEAN-kanMX4./PIL1-mCERULEAN-kanMX4..</i>	This work.
PSAY1091	W303 <i>MATdiploid</i> LSP1-mCERULEAN- <i>kanMX4. /LSP1-mCERULEAN-kanMX4..</i>	This work.
PSAY1132	W303 <i>diploid</i> <i>PIL1-mCERULEAN-kanMX4. PIL1-mVENUS-hphNT1</i> .	This work.
PSAY1307	W303 <i>diploid</i> <i>lsp1::NAT/lsp1::NAT</i> <i>PIL1-mCERULEAN-kanMX4./PIL1-mVENUS-hphNT1</i> .	This work.
PSAY1091	W303 <i>diploid</i> LSP1-mCERULEAN- <i>kanMX4./LSP1-mVENUS-hphNT1</i> .	This work.

Supporting references:

1. Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel, and M. Knop. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21:947-962.
2. Unger, T., Y. Jacobovitch, A. Dantes, R. Bernheim, and Y. Peleg. 2010. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* 172:34-44.
3. Digman, M. A., R. Dalal, A. F. Horwitz, and E. Gratton. 2008. Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophys J* 94:2320-2332.
4. Dalal, R. B., M. A. Digman, A. F. Horwitz, V. Vetri, and E. Gratton. 2008. Determination of particle number and brightness using a laser scanning

- confocal microscope operating in the analog mode. *Microsc Res Tech* 71:69-81.
5. Digman, M. A., C. M. Brown, A. R. Horwitz, W. W. Mantulin, and E. Gratton. 2008. Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophys J* 94:2819-2831.
 6. Digman, M. A., V. R. Caiolfa, M. Zamai, and E. Gratton. 2008. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophys J* 94:L14-16.
 7. Hinde, E., M. A. Digman, C. Welch, K. M. Hahn, and E. Gratton. 2012. Biosensor Forster resonance energy transfer detection by the phasor approach to fluorescence lifetime imaging microscopy. *Microsc Res Tech* 75:271-281.

Supplemental Figures:

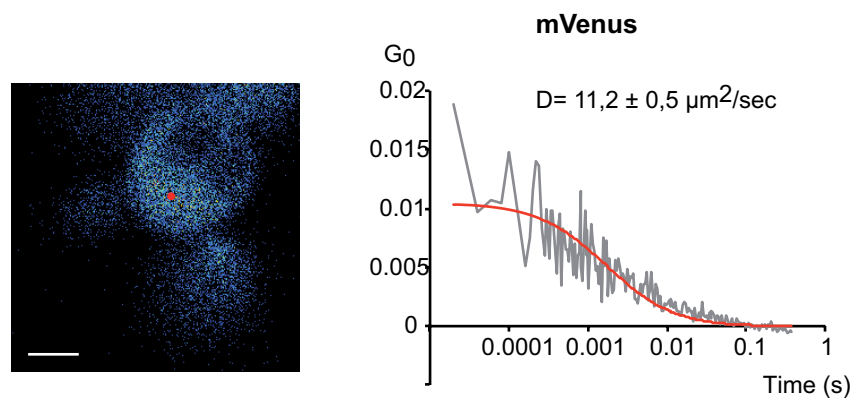


Figure S1. Autocorrelation function (ACF) analysis of cytoplasmic monomeric Venus. Representative image, ACF plot and free diffusion fitting of data coming from mVenus-containing yeast cells that were subjected to point scans. The red dot indicates the laser bin position for this particular case. Scale bar: 2 μm .

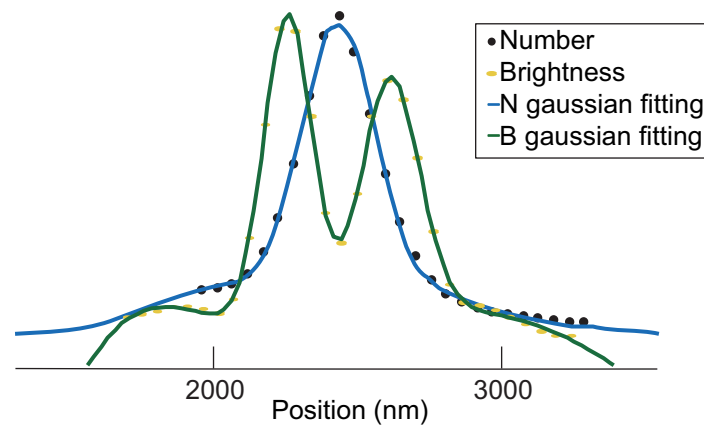
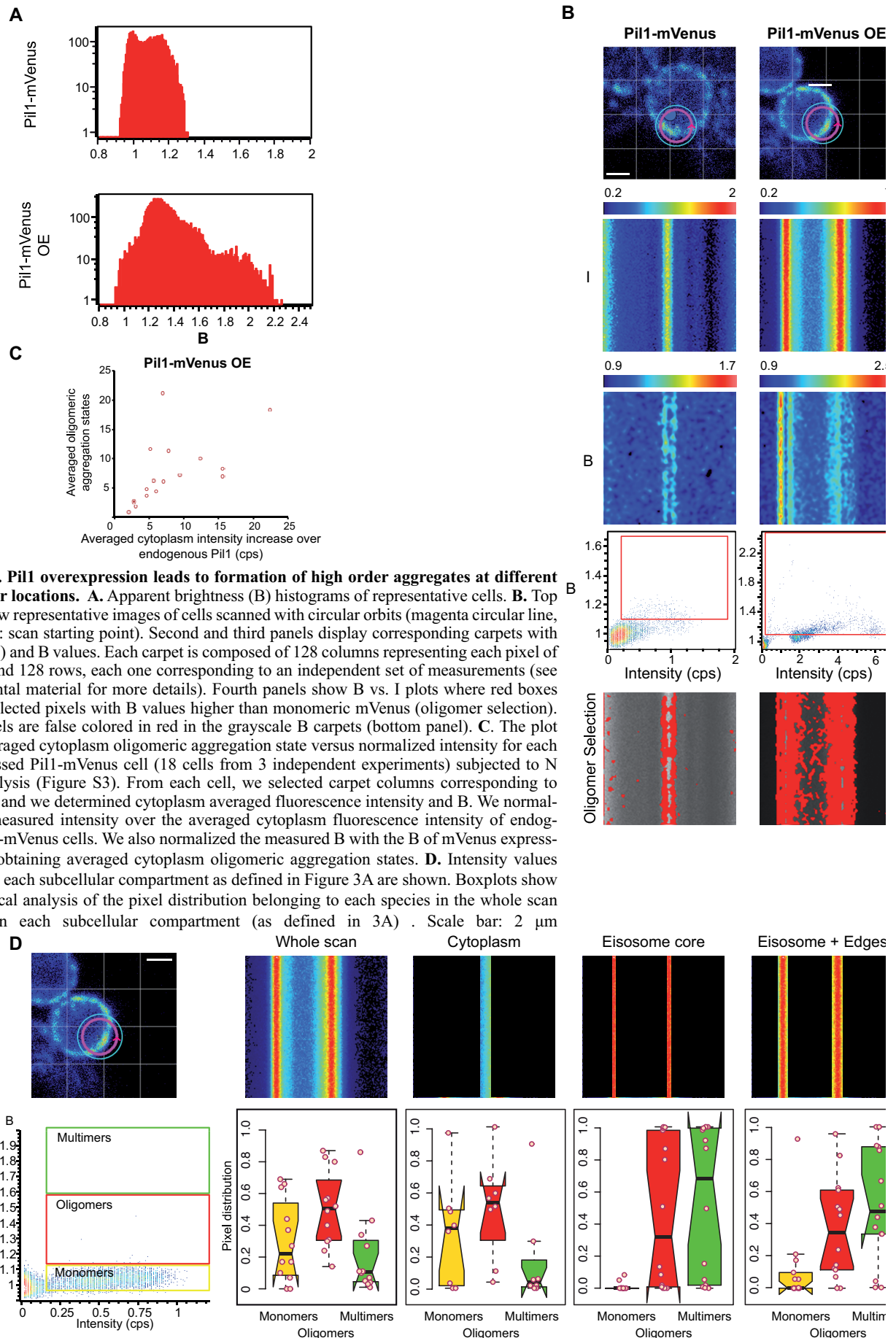


Figure S2. Eisosome edges Pil oligomers localization. For determining the distance between the eisosome core and the oligomers, a Gaussian fit for the N and B distributions as a function of the position from the eisosome centre was done. An example of the B vs. position (yellow dots) and N vs. position (black dots) plots are shown with their respective Gaussian fits (blue and green lines).



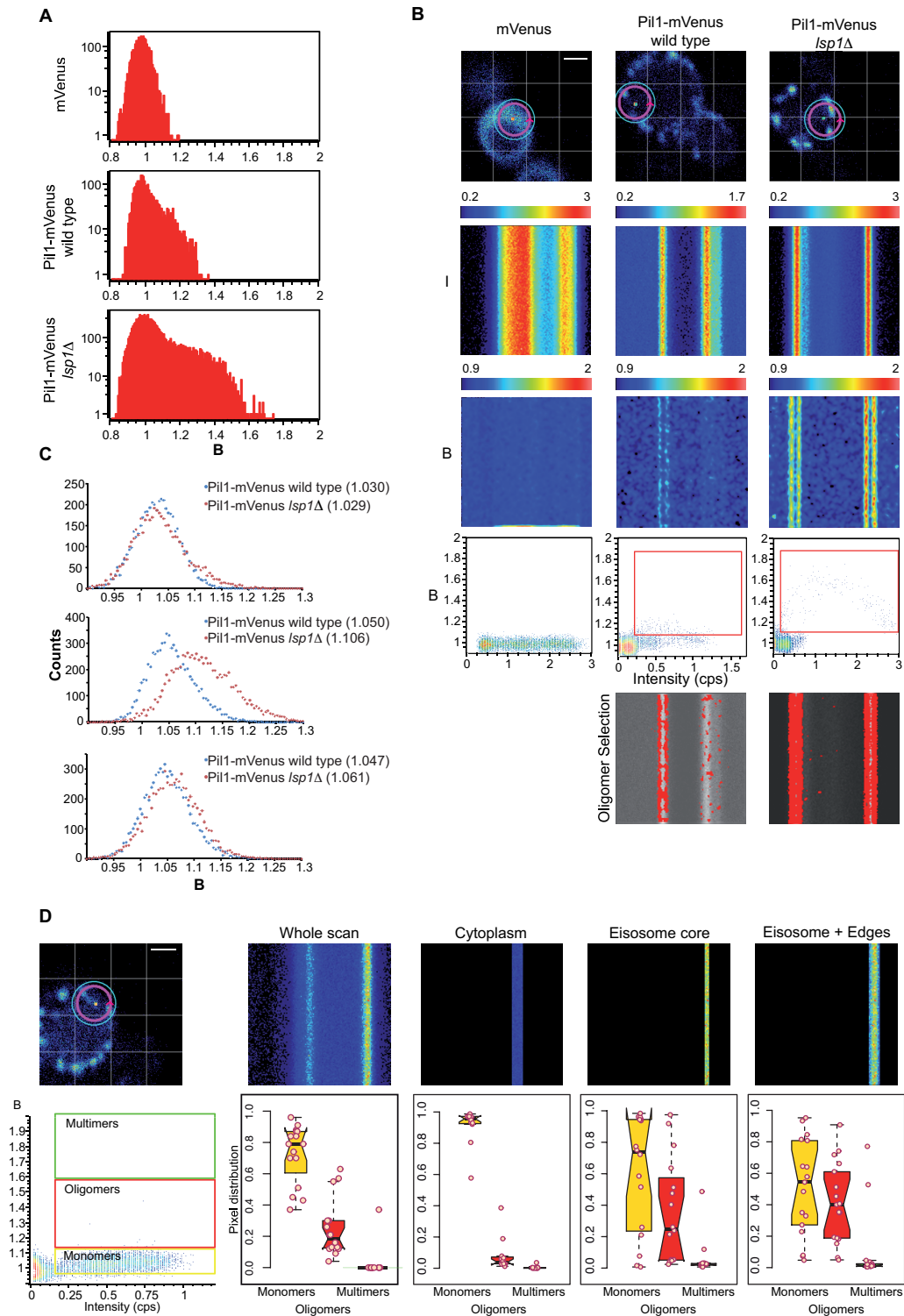


Figure S4: In the absence of *Lsp1*, there is an increase in Pil1 oligomers. Yeast *lsp1*Δ cells carrying Pil1-mVenus were subjected to circular scans and N&B analysis. **A.** Apparent brightness (B) histograms of representative wild type mVenus, wild type Pil1-mVenus and *lsp1*Δ Pil1-mVenus cells. **B.** Top panels show representative images of cells scanned with circular orbits (magenta circular line, arrow-head: scan starting point). Second and third panels display corresponding intensity (I) and B carpets. Each carpet is composed of 128 columns representing each pixel of the orbit and 128 rows, each one corresponding to an independent set of measurements (see Supplemental material for more details). Fourth panels show B vs. I plots where red boxes indicate selected pixels with B values higher than monomeric mVenus. These pixels are false colored in red in the grayscale B carpets (bottom panel). **C.** Pil1-mVenus cytoplasmic B values of wild type and *lsp1*Δ cells. Within each independent experiment the histograms of Pil1-mVenus cytoplasmic B values of individual cells (at least 6 cells/experiment) were accumulated generating one integrated histogram per independent experiment (3 panels). For each integrated histogram a Gaussian fit was performed to extract the positions of the mean (values between parentheses). **D.** Intensity values carpets for each subcellular compartment as defined in Figure 3A are shown. Boxplots show the statistical analysis of the pixel distribution belonging to each species in the whole scan and within each subcellular compartment (as defined in 3A) of Pil1-mVenus *lsp1*Δ cells. Data from three independent experiments with at least six cells per experiment were analyzed. Scale bar: 2 μm.

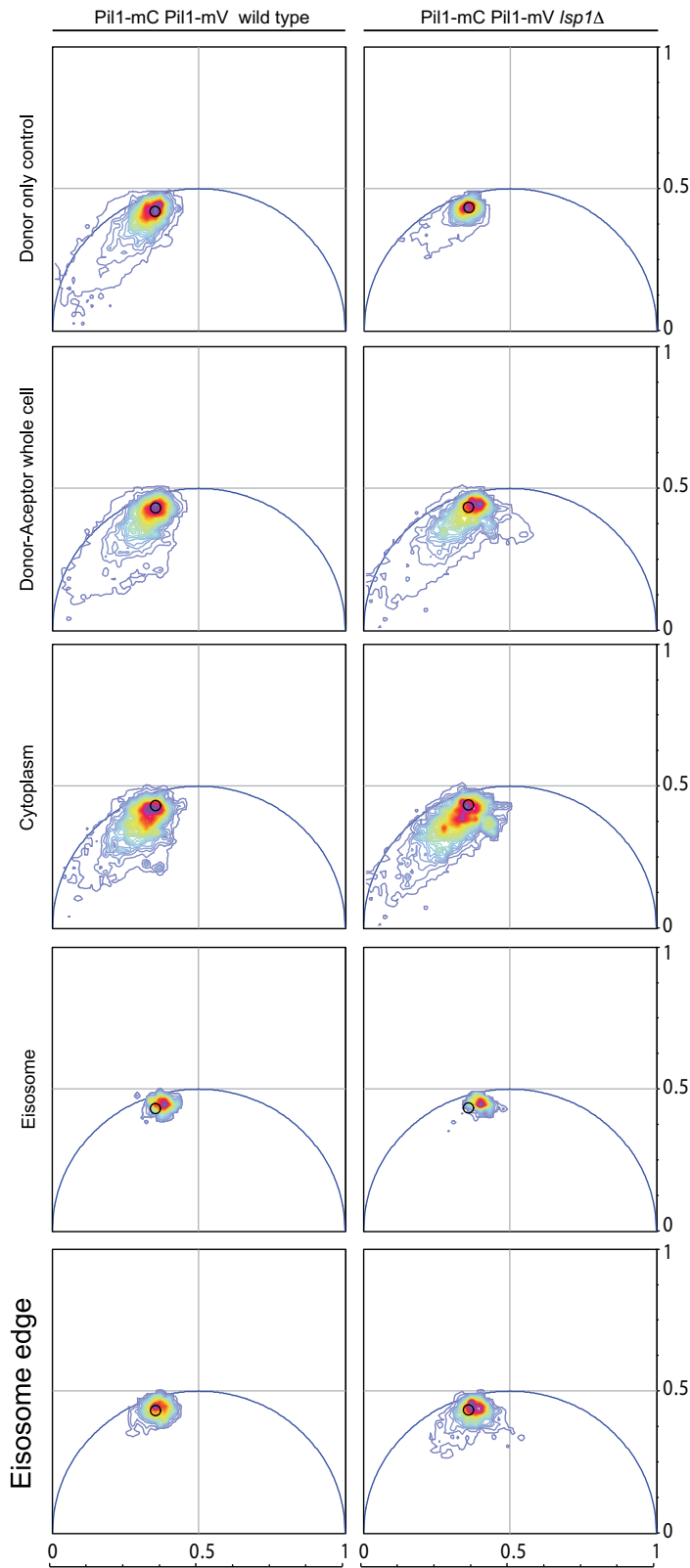


Figure S5. *Isp1* deletion allows cytoplasmic Pil1 homotypic interaction. Pil1-mCerulean Pil1-mVenus wild type (left panel) and Pil1-mCerulean Pil1-mVenus *Isp1Δ* (right panel) cells were imaged with a 2-photon microscope equipped with a FLIM box. Yeast strains expressing the fluorescent donor Pil1-mCerulean only were used as negative controls (upper panels). Black circle is concentric to donor-only pixel distribution center of mass and encompass the 80% of pixels. Phasor plots of pixels lifetimes corresponding to the whole cell and different subcellular compartments as defined in Figure 4B are shown. Phasor plots with pixel distributions lifetimes were built from the integration of 6 or more cells in each plot. The black circle indicates the position of the centre of mass of the donor only control pixel distribution. From violet until red colour one standard deviation of the pixel dispersion is comprehended, and two standard deviations are contained until yellow.

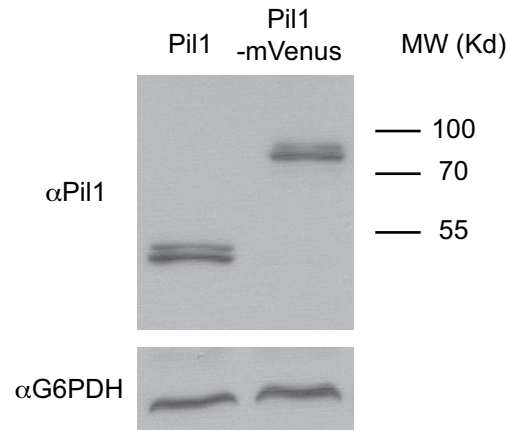


Figure S6. Pil1-mVenus expression levels control. Wild type and Pil1-mVenus cells were grown, harvested and total protein extracts were subjected to Western blotting using a-Pil1 polyclonal antiserum (α -Pil1). For a loading control, an a-Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase antibody (α -G6PDH) was used.

3.3. Dinámica molecular, las cantidades totales, el grado de oligomerización y la concentración de las proteínas Pil1p y Lsp1p solubles en el citoplasma.

Para poder entender en forma más detallada el proceso de ensamblado de Pil1p y Lsp1p en la membrana plasmática eisosomal es necesario entender las bases biofísicas que subyacen la formación de estos dominios de membrana, como ser el patrón de interacciones directas proteína-proteína, las cantidades proteicas totales, el grado de oligomerización así como la dinámica molecular en las distintas localizaciones subcelulares. Para esto es necesario trabajar con el sistema celular intacto de forma de tener resolución tanto temporal como espacial. Par lograr esto se aplicaron metodologías de microscopia de fluorescencia *in vivo* donde se estudia tanto la fluctuación de la señal fluorescente en el tiempo y en el espacio, como la vida media de la señal fluorescente. De esta forma se pueden determinar los distintos parámetros biofísicos anteriormente mencionados. En particular se utilizaron las metodologías de FCS (“fluorescence correlation spectroscopy”, en inglés), NyB (“Number and Brightness”, en inglés) y FLIM-FRET (“Fluorescence Lifetime Imaging and Forster Resonance Energy Transfer”, en inglés). Para mayor detalle de las bases teóricas de dichas metodologías referirse a la sección materiales y métodos de (Olivera-Couto et al, 2015).

Para esto primero fue necesario obtener una serie de cepas modificadas genéticamente por lo que se generaron plásmidos partiendo de los vectores pym25-HYGRO y pym25-KAN (Janke et al, 2004) y utilizando como metodología de clonado RFCloning. Los plásmidos que se construyeron permiten realizar fusiones C terminales, a las proteínas fluorescentes monoméricas mVenus, mCerulean y mCherry, directamente en el ADN cromosomal de la proteína que se desea marcar. Con estos vectores y 42 oligos, se realizaron y corroboraron por PCR 28 cepas de levaduras, 14 cepas de sexo a y 14 cepas de sexo α , las cuales cada una expresa una de las 14 proteínas eisomales principales estudiadas en (Olivera-Couto et al, 2011) (Pil1p, Lsp1p, Ygr130p, Eis1p, Seg1p, Mdg1p, Pst2p, Rfs1p, Ycp4p, Pkh2p, Slm1p, Slm2p, Nce102p y Sur7p) fusionadas tanto a mCerulean como mVenus

según el sexo (y para el caso de Pil1p y Lsp1p también se construyeron cepas con los tags GFP y mCherry). Por otro lado se generaron cepas delecionadas para los genes Pil1p y Lsp1p, tanto de sexo α como de sexo a. Posteriormente, mediante apareo de cepas α y a, selección de diploides, esporulación, disección de tétradas y selección de haploides, se generaron un total de 200 cepas diploides y haploides que expresan dos modificaciones genéticas a la vez (dos fusiones a proteínas fluorescentes o una fusión y una deleción). También se generaron cepas control que solamente expresan las proteínas fluorescentes utilizadas solubles en el citoplasma (sin estar fusionadas a ninguna proteína eisosomal). Cabe destacar que originalmente, para el proyecto de doctorado estaba planificado trabajar con dos de los componentes eisosomales (Pil1p y Lsp1p), pero finalmente se decidió realizar el clonado de 14 componentes, con la idea de contar con las cepas necesarias, para poder en un futuro ampliar los 4 objetivos específicos a doce proteínas más. El conjunto de estas cepas será de gran utilidad en el corto y mediano plazo para realizar experimentos basados en FLIM-FRET (Digman et al, 2008) entre cada par de componentes eisosomales de forma de elucidar el mapa de interacciones proteicas directas dentro y fuera de los eisosomas.

Con el objetivo de obtener cepas de levaduras donde ya sea la proteína fluorescente mVenus o la proteína de fusión Pil1p-mVenus tuvieran niveles de expresión artificiales, variables entre las distintas células de la población y que los mismos fueran superiores a los endógenos, se utilizó el vector de levaduras pEG202 el cual tiene el promotor transcripcional fuerte *ADH1*. Mediante reacciones de PCR se aislaron los marcos abiertos de lectura para Pil1p-mVenus o mVenus que ya estaban aislados en otros plásmidos y en esta reacción se agregaron colas 3' y 5' que presentaban homología de secuencia con la región del plásmido pEG202 donde se deseaban insertar dichos marcos abiertos de lectura. Dichos productos de PCR fueron purificados y verificados mediante electroforesis y luego se procedió a el clonado en pEG202 mediante la metodología de reparación del gap por recombinación homología ("GAP repair" en inglés) donde se transformaron levaduras de la cepa w303 con los productos de PCR purificados y el plásmido linealizado, de forma que dentro de

la levadura ocurra el proceso de recombinación homóloga por el cual el producto de PCR queda insertado en el plásmido.

Para poder determinar la dinámica molecular eisosomal in vivo, se realizó microscopía de fluorescencia de dos fotones, mediante la utilización de escaneos puntuales y circulares de células vivas. Los cultivos analizados habían sido crecidos durante más de 12 horas, en medio sintético completo, partiendo de una placa fresca y llegando a una densidad óptica, a 600 nm, de 0.3. Las células se inmovilizaron a una superficie mediante el uso de Concanavalina A. En cada día también se analizó de la misma forma que Pil1p-mVenus y Lsp1p-mVenus, una cepa que expresa solamente la proteína Venus monomérica soluble en el citoplasma.

Para poder determinar la dinámica molecular de las proteínas solubles en el citoplasma, se realizaron escaneos puntuales en una localización del citoplasma con un tiempo de escaneo de 16 μ S y repitiendo el escaneo durante 5 minutos, Figura 1a (Olivera-Couto et al, 2015). Estas series temporales de datos fueron utilizadas para calcular la autocorrelación de la señal fluorescente y, tomando como hipótesis nula la difusión simple, ajustar las curvas con ecuaciones de autocorrelación que toman como modelo de dinámica molecular ley de Fick para la difusión libre (ver detalles de los fundamentos de la metodología en Materiales y Métodos Suplementarios (Olivera-Couto et al, 2015)). En la Figura S1 (Olivera-Couto et al, 2015) se puede apreciar como la curva de correlación de mVenus ajusta perfectamente al modelo propuesto y tiene una constante de difusión libre de $11,2 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$, típico valor para proteínas como GFP y YFP en el citoplasma de la levadura del pan (Slaughter et al, 2007). En el caso de las proteínas Pil1p y Lsp1p, los datos obtenidos también ajustaron muy bien al modelo propuesto con constantes de difusión de $5 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ y $8 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ respectivamente. Dichas constantes corresponden a valores típicos de proteínas libres en el citoplasma de bajo orden de agregación (monómeros - tetrameros) (Figura 1b (Olivera-Couto et al, 2015)).

Para poder explorar la posibilidad de que existan dinámicas moleculares más lentas en el citoplasma, se realizaron escaneos que consistieron en 128 puntos, con un radio de 30 puntos y un tamaño de pixel de 60 nm. Cada pixel tuvo un tiempo de escaneo de 16 μ S, por lo que cada escaneo circular tuvo un tiempo total de 2048 μ S. Para cada célula se realizaron 85000 escaneos consecutivos en la misma posición de forma de tener para cada pixel 85000 valores consecutivos. En este caso no fue posible determinar correlación alguna, por lo que no se pudieron determinar la existencia de especies móviles de Pil1p y Lsp1p en esta escala temporal (Figura 1b (Olivera-Couto et al, 2015)).

Posteriormente, se aplicó el análisis de los datos denominado “NyB (Digman et al, 2008) que permite mediante el análisis estadístico de las fluctuaciones de la intensidad, determinar la concentración y el estado oligomérico promedio de la proteínas estudiadas en cada pixel (ver detalles de los fundamentos de la metodología en Materiales y Métodos Suplementarios (Olivera-Couto et al, 2015)). Fue necesario aplicar correcciones de los datos que permitan eliminar la fluctuación de la fluorescencia debida al foto-quemado temporal. Tanto Pil1p como Lsp1p se presentan en el citoplasma en estados de bajo grado de agregación que pueden corresponder al estado monomérico y/o dimérico de las proteínas. La concentración de las mismas es del orden de los 400-800 nM existiendo para ambas un gradiente de concentración conforme nos acercamos a la membrana plasmática (Figura 2y3b (Olivera-Couto et al, 2015)). Para determinar como la concentración proteica afecta los parámetros determinados, se analizaron en forma comparativa cepas que expresan Pil1p en sus niveles naturales con cepas que presentan distintos niveles de sobreexpresión. De esta forma se pudo determinar que el estado oligomérico de Pil1p en el citoplasma aumenta conforme aumenta la concentración proteica (Figura S3 (Olivera-Couto et al, 2015)).

3.4. Cinética de ensamblado de Pil1p en eisosomas.

Para este objetivo se utilizaron datos de escaneos circulares (iguales a los de la sección anterior) dónde el círculo atraviesa la membrana plasmática en la

posición de un nanodominio eisosomal. Se aplicaron dos tipos de análisis, NyB (Digman et al, 2008) así como función de autocorrelación (Digman & Gratton, 2009). Con el análisis de NyB se pudo determinar la presencia de oligómeros de Pil1p y de Lsp1p en la interface eisosoma-citoplasma (Figura 2,3byS2 (Olivera-Couto et al, 2015)). Estos oligómeros presentan una dinámica molecular definida en relación al complejo eisosomal en la membrana plasmática. Aplicando el análisis de autocorrelación para estos mismos datos y ajustando los datos de autocorrelación a un modelo de difusión libre se pudo determinar que claramente el ajuste no era bueno (Figura 1b (Olivera-Couto et al, 2015)). Se probó como hipótesis alternativa un ajuste de la función de autocorrelación con un modelo de asociación disociación y dichos ajustes resultaron significativamente mejores que los de difusión libre (Tabla S1 (Olivera-Couto et al, 2015)). Las constantes cinéticas de primer orden ajustadas fueron de $2.9 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ (Pil1p-mVenus) y de $3.1 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ (Lsp1p-mVenus).

3.5. Papel que desempeña Lsp1p en el ensamblado de Pil1p en eisosomas.

Los resultados obtenidos indican que Pil1p y Lsp1p coexisten en el citoplasma de las células madre que comparten D_{app} similar (Figura 1b (Olivera-Couto et al, 2015)). La inmunoprecipitación de extractos celulares, seguido por análisis de espectrometría de masas muestra que ambas proteínas físicamente interactúan en una relación equimolar (Walther et al, 2006). A pesar de todas estas evidencias, todavía no se sabe si ambas interactúan directamente en las células vivas. Además, en ausencia de Lsp1p, no existe un compromiso severo en la formación de eisosomas: hay una ligera disminución en el número de eisosomas por célula (0,7 veces) y un aumento moderado en la concentración de Pil1p-GFP citoplasmático y asociado a eisosomas (1,8 veces y 1.7- veces, respectivamente), lo que indica que Pil1p por sí mismo es capaz de formar eisosomas. Este resultado es compatible entonces con la posibilidad de que en células de tipo salvaje Pil1p y Lsp1p se asocien independientemente y coincidan en los dominios eisomales interactuando de manera indirecta a través de otras proteínas como Seg1p, por ejemplo (Frohlich et al, 2009;

Moreira et al, 2009; Walther et al, 2006). Para aclarar este punto se determinó cómo la ausencia de Lsp1p afecta el estado de agregación de Pil1p. Sin importar el fenotipo leve de organización eisosomal de células donde el gen codificante de la proteína Lsp1p fue deletado, el análisis “NyB” de Pil1p-mVenus reveló un fenotipo más específico (Figura S4 (Olivera-Couto et al, 2015)). En comparación con las células de tipo salvaje, las células *lsp1D* mostraron un aumento general de los valores de estado oligomérico de Pil1p-mVenus. Este aumento es evidente en los bordes eisosomales aunque también se detecta en el citoplasma (Figura S4 (Olivera-Couto et al, 2015)). Estos resultados, indican que la falta de Lsp1p es compensada con un aumento en el contenido celular de Pil1p y con valores de brillo más altos, sugiriendo que la agregación homotípica de Pil1p está reemplazando los posibles heterodímeros Pil1p-Lsp1p que normalmente existirían en las células de tipo salvaje.

Para poder determinar si realmente en células salvajes existen complejos Pil1p-Lsp1p se llevaron adelante experimentos de FLIM-FRET mediante la construcción de gráficos de tipo “Phasor Plot” (ver detalles de los fundamentos de la metodología en sección Materiales u Métodos suplementarios (Olivera-Couto et al, 2015)), entre Pil1p y Lsp1p utilizando mVenus como etiqueta donante y mCerulean como etiqueta aceptora (en ambos sentidos). Como se puede observar en la Figura 4 y la Tabla 1 (Olivera-Couto et al, 2015), Pil1p y Lsp1p presentan FRET positivo en todos los compartimientos subcelulares, lo cual permite establecer que estas dos proteínas interactúan en forma directa tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática. Por el contrario no se pudo detectar interacción homotípica entre moléculas de Pil1p ni entre moléculas de Lsp1p en el citoplasma, lo cual significa que los complejos detectados corresponden a heterocomplejos Pil1p-Lsp1p y no a homocomplejos. Se favoreció la hipótesis de que dichos complejos son de naturaleza dimérica debido a los valores de brillo y D_{app} obtenidos para ambas proteínas. Solamente en los bordes eisosomales y en el core eisosomal se pudieron detectar interacciones directas de tipo homotípicas, lo cual estaría explicado por la ocurrencia de agregados de mayor orden. En concordancia con los resultados de “NyB”, en células donde el gen codificante de Lsp1p fue

eliminado, se puede detectar FRET positivo homotípico entre Pil1p en el citoplasma Figura S5 (Olivera-Couto et al, 2015).

Resumiendo los resultados obtenidos por microscopia de fluctuación de fluorescencia resuelta en el tiempo se puede afirmar que Pil1p y Lsp1p existen en el citoplasma mayormente como proteínas de bajo grado de agregación con una dinámica molecular de tipo difusión simple. Las mismas interaccionan en forma directa en el citoplasma por lo que se puede inferir que existen como heterodímeros Pil1p-Lsp1p. En la interface eisosoma citoplasma se puede detectar una dinámica molecular lenta de tipo equilibrio de asociación disociación entre agregados moleculares de mayor tamaño, sin embargo este tipo de dinámica solo es detectada en el 50% de los eisosomas analizados. Dichos resultados serán analizados en mayor detalle en la sección siguiente.

4. Discusión

Mediante este Proyecto de Tesis se pretendió realizar un aporte al entendimiento de procesos celulares centrales tales como la formación de nanodominios de membrana plasmática. Como se ha mencionado, poco se entiende de las bases moleculares que sustentan la formación, organización y mantenimiento de dominios de membrana. La función molecular y celular de muchas proteínas canónicas de dominios de membrana también son desconocidas. Con los resultados obtenidos se han logrado entender varios aspectos de la formación y organización de los eisosomas, así como han surgido nuevas e interesantes hipótesis.

4.1 Función molecular de Pil1p y Lsp1p en relación a la estructura eisosomal:

Por un lado se han reportado, mediante estudios *in silico*, la presencia de una serie de dominios proteicos en las diferentes proteínas eisosomales Tabla 2yFigura 1 (Olivera-Couto et al, 2011). Los dominios identificados están implicados en interacciones de tipo proteína-proteína y proteína-lípido, por lo que dichos resultados permiten conocer, en parte, como las proteínas

eisosomales se integran a los mismos. Los resultados experimentales obtenidos son compatibles con un modelo que propone que Pil1p y Lsp1p polimerizan sobre la bicapa lipídica al mismo tiempo que la deforman Figura S2,3 y 4 (Olivera-Couto et al, 2011). Dicho resultado explica la ocurrencia de invaginaciones en forma de tubo que colocalizan con los dominios eisosomales (Stradalova et al, 2009) y también sugiere una nueva hipótesis acerca de los nanodominios eisosomales: la generación de dominios eisosomales es llevada a cabo mediante la formación de ensamblajes de Pil1p y Lsp1p y la subsecuente deformación de la membrana. La segregación de lípidos inducida por variaciones en la curvatura de membrana, se ha descrito teóricamente y demostrado experimentalmente (Markin, 1981; Roux et al, 2005).

Basándose en el hallazgo de que Pil1p y Lsp1p efectivamente tienen un dominio BAR capaz de deformar las membranas biológicas, se encontraron mutantes puntuales en uno, dos y cuatro aminoácidos (mut1, mut2 y mut3 respectivamente) que tienen dicha capacidad disminuida y hasta eliminada. Las levaduras que solamente expresan dichas variantes proteicas (ya que el gen salvaje codificante para Pil1p fue eliminado), presentan los componentes eisosomales que se estudiaron deslocalizados, por lo que se propone que la capacidad de Pil1p de unirse y deformar la curvatura de la membrana plasmática es necesaria para la biogénesis de los nanodominios, Figura S 5 y 6 (Olivera-Couto et al, 2011). Un resultado interesante, pero algo complicado de interpretar, fue que dichas variantes presentaran unos pocos eisosomas de tamaño 6 veces mayor los eisosomas salvajes Figura 7 (Olivera-Couto et al, 2011). Las mutaciones realizadas en mut1, mut2 y mut3 son en residuos aminoacídicos positivos de la superficie cóncava del dímero del dominio BAR, los cuales se espera sean necesarios tanto para la unión como para la deformación de la membrana (Figura 4 (Olivera-Couto et al, 2011)). Por esto es que se esperaba que las mutantes presentaran una afinidad por la membrana reducida. Efectivamente se observó que la fracción de proteína soluble en el citoplasma aumentó en las variantes mutantes así como se observó un número reducido de eisosomas. ¿Porqué las mutantes Pil1p de baja afinidad a membranas no forman un número normal de eisosomas? La respuesta se desconoce pero estos resultados permiten sugerir un modelo en el que,

durante la formación de eisosomas hipotéticos dímeros Pil1p-Lsp1p citoplasmáticos colisionan en forma estocástica con la bicapa lipídica y una vez unidos a la misma sufren un cambio conformacional que los hace más afines a los dímeros Pil1p-Lsp1p citoplasmáticos actuando entonces como sitios de nucleación. Esta idea podría tener un fundamento en los cambios conformacionales que homodímeros de proteínas con dominios BAR experimentan al unirse de manera progresiva a una bicapa lipídica (Arkhipov et al, 2008; Peter et al, 2004; Yu & Schulten, 2013). Los eisosomas lucen homogéneamente distribuidos sobre la membrana celular y el análisis de correlación de pares indica que la posición de cada uno de los mismos es producto del azar y no de un orden predeterminado (Moreira 2009). Según este modelo Pil1p y Lsp1p (y otras proteínas como Seg1p) constituirían así un sistema autosuficiente de auto-ensamblaje in vivo. Al aumentar la afinidad de los dímeros citoplasmáticos por aquellos unidos a membranas se favorece el crecimiento discreto y no continuo de eisosomas. La caída de niveles de la proteína Pil1p (cuyo gen está regulado de manera sincrónica con el ciclo celular) al entrar en fase G2/M sería suficiente para limitar el crecimiento de los eisosomas definiendo así su tamaño más o menos uniforme. En el caso de las mutantes mut2, mut3, una menor afinidad por membrana de los dímeros Pil1p-Lsp1p haría que la formación de sitios de nucleación efectivos sea menor limitando entonces la oferta de eisosomas en crecimiento, dejando un exceso de Pil1p-Lsp1p en el citoplasma que continúa alimentando el crecimiento de pocos eisosomas más allá de un ciclo celular como sucede en células salvajes. En esta línea de pensamiento es que el conjunto de datos provenientes del análisis de la autocorrelación de la señal fluorescente, del número y brillo así como del estudio del fenómeno de FRET han sido claves. El papel molecular de Seg1 en el ensamblado de eisosomas es aún desconocido pero esta proteína es necesaria, al igual que Pil1p, para la formación normal de los dominios eisosomales y los niveles de expresión de la misma afectan la forma y el largo del surco eisosomal (Moreira et al, 2012).

4.2 La subunidad estructural básica de los eisosomas

Enfocándose en la dinámica molecular de Pil1p y Lsp1p en las células madres, dónde los eisosomas observados por microscopía de fluorescencia clásica ya están formados y son homogéneos e invariantes, se pudieron determinar las distintas propiedades dinámicas de Pil1p y Lsp1p en los distintos compartimientos subcelulares. En particular, tomando todos los datos obtenidos en conjunto se puede proponer fuertemente que la unidad estructural mínima de dichas proteínas, más representada dentro de las células vivas, es la de heterodímeros solubles y de libre difusión. Dicha proposición se base en los siguientes resultados:

- tanto Pil1p-mVenus como Lsp1p-mVenus se detectan en el citoplasma como proteínas de baja agregación molecular con curvas de autocorrelación típicas de proteínas de difusión libre y en particular con coeficientes de difusión libre aparentes, D_{app} , de $5 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ y $8 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ respectivamente, los cuales comparados con el D_{app} de mVenus ($11 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$) son perfectamente compatibles con proteínas dimericas, Figura S1yS1 (Olivera-Couto et al, 2015).
- Los experimentos de FLIM-FRET indican claramente que, en el citoplasma, hay una interacción directa entre Pil1p y Lsp1p y no así entre Pil1p y Pil1p o Lsp1p y Lsp1p, Figura 4 (Olivera-Couto et al, 2015).
- Los resultados del análisis del brillo de Pil1p-mVenus en el citoplasma indica que tiene la misma distribución de valores de brillo que las células que solamente expresan mVenus, Figura S2,3 (Olivera-Couto et al, 2015).
- el rango de concentraciones de Pil1p y Lsp1p en el citoplasma es entre 400 y 800 nM, valores determinados a partir del ajuste de las curvas de autocorrelación a los modelos de difusión libre.

Así, tomando estos 4 resultados en conjunto, la postulación de que heterodímeros Pil1p-Lsp1p en concentraciones nanomolares serían las unidades mínimas principales de los eisosomas, es la propuesta mas parsimoniosa. Es importante aclarar dos aspectos. Primero aclarar que el hecho que Pil1p-mVenus y Lsp1p-mVenus, presenten brillos equivalentes a mVenus puede explicarse solamente de dos formas, las proteínas son

realmente monoméricas o las proteínas están asociadas con otras proteínas que no presentan marcas fluorescentes. En este caso, si se compatibiliza dicho resultado con el hecho de un fenómeno de FRET positivo entre Pil1p y Lsp1p, la existencia de heterodímeros Pil1p-Lsp1p pasa a ser la opción más probable. En segundo lugar, el hecho de que dentro del core eisosomal se halla podido detectar FRET positivo entre Pil1p y Pil1p y entre Lsp1p y Lsp1p, permite afirmar que el FRET negativo entre Pil1p y Pil1p y entre Lsp1p y Lsp1p en el citoplasma, puede entenderse como la ausencia de homodímeros. Una posibilidad es que homodímeros existan pero sean muy escasos no pudiéndose detectar con los experimentos realizados. Con los resultados presentados en esta tesis no se puede realmente descartar la existencia de homodímeros pero si se puede afirmar que los mismos de existir serían realmente muy escasos en relación a los heterodímeros. De esta misma forma no se puede descartar que quizás exista una fracción de Pil1p y Lsp1p en el citoplasma en formato monomérico, aunque conociendo la naturaleza de los dominios BAR esta posibilidad no sería la más esperada. En este punto es importante discutir las diferencias en los errores asociados a D_{app} entre mVenus ($0.5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$) respecto de Pil1p-mVenus y Lsp1p-mVenus ($2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$). Éstos dos últimos tienen errores asociados 4 veces mayores, lo que puede estar reflejando justamente el hecho de que no exista únicamente una especie heterodimérica, sino que ésta sea la más abundante y que simultáneamente existan otras especies menos abundantes como ser homodímeros y monómeros.

4.3 Concentración y agregación proteica

En relación a cómo la concentración proteica puede afectar el estado de oligomerización de la proteínas es importante discutir los resultados de sobreexpresión proteica donde se analizó una población de células heterogénea en cuanto al nivel de expresión de Pil1p-mVenus. Si dichas células sobreexpresadas son relativizadas a los niveles de expresión naturales se puede determinar que conforme el factor de expresión proteica aumenta (o sea cuanto más proteína promedio hay en el citoplasma de células

sobrexpresadas en relación a células salvajes) el estado oligomérico promedio de las mismas también aumenta, lo que refleja que el proceso de oligomerización puede ir más allá del estadio dimérico y que dicho proceso está regulado al menos en parte por la concentración proteica, Figura S3 (Olivera-Couto et al, 2015). Este resultado lleva naturalmente a la pregunta de ¿qué sucede entonces en las células salvajes dentro del nanodominio eisosomal?, ¿cuál es el estado oligomérico así como la dinámica molecular asociada?

4.4 Dinámica proteica eisosomal:

En cuanto a la determinación de la dinámica proteica del nanodominio eisosomal y cómo estos heterodímeros Pil1p-Lsp1p interaccionan con el core proteico nuevamente es importante integrar varios resultados:

- en la interface eisosoma-citoplasma se puede detectar, al menos en la mitad de los eisosomas analizados, una dinámica molecular lenta que ajusta mejor a un modelo de asociación disociación que a un modelo de difusión libre Figura 1 (Olivera-Couto et al, 2015).
- el ajuste de dichas curvas de autocorrelación permite inferir una constante cinética de pseudo primer orden de $2.9 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ (Pil1p-mVenus) y de $3.1 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ (Lsp1p-mVenus), Figura 1 (Olivera-Couto et al, 2015).
- el análisis de brillo y número para dicha interface eisosomal permite detectar la existencia de proteína Pil1p-mVenus y Lsp1p-mVenus en mayor estado de agregación que en el citoplasma, correspondiendo los mismos a oligómeros formados por 4-10 subunidades proteicas Figura S2 y 3 (Olivera-Couto et al, 2015).
- el ajuste de funciones gaussianas a la distribución de brillos e intensidades permite definir que dichos oligómeros son detectados mayoritariamente a una distancia de $275 \pm 70 \text{ nm}$ respecto al core eisosomal (Figura S2 (Olivera-Couto et al, 2015)), valor que se encuentra dentro de las dimensiones del surco eisosomal (200-400 nm de largo y 50 nm de profundidad) y dentro del ancho de la función que

describe el volumen de observación abierto (el diámetro axial, $w_{x,y}$, de la “point spread function” fue calibrado en 300 nm).

- sorprendentemente en los escaneos circulares que atraviesan la membrana plasmática tanto la dinámica molecular lenta como los oligómeros puede ser detectada ya sea hacia ambos lados del core eisosomal.

Tomando todos estos resultados en conjunto la propuesta más parsimoniosa es que existen al menos dos subpoblaciones eisosomales igualmente representadas en las poblaciones celulares analizadas. Aquellos eisosomas donde la dinámica proteica no puede ser detectada en la escala temporal (0.0001 a 10 s) y aquellos donde los bordes eisosomales son dinámicos o “inestables”. Estos resultados van en concordancia con los resultados de FRAP de la Figura 8 (Olivera-Couto et al, 2011). Dichos resultados fueron presentados como una sola grafica donde los errores asociados a cada punto son muy grandes, dicha variabilidad puede venir de que algunos eisosomas medidos presentaban mayor velocidad de recuperación de la fluorescencia mientras que otros lo hacían más lentamente, reflejando que algunos eisosomas son más dinámicos que otros y por lo tanto intercambian mas subunidades proteicas con la fracción citoplasmática. Varios aspectos deben ser discutidos en acerca de ésta postulación. Primero es importante destacar que composicionalmente ya se conocía que los eisosomas son heterogéneos dentro de una misma célula durante el transcurso de la vida de la célula madre. Por un lado distintos componentes eisosomales cruciales en procesos de señalización celular pueden estar presentes o ausentes en distintos eisosomas en distintos momentos, y aún no se entiende completamente en respuesta a que eventos o generando que consecuencias para la célula, (Berchtold et al, 2012; Frohlich et al, 2009). Como ya se mencionó en la introducción las quinasas Pkh1p y Pkh2p pueden fosforilar a Pil1p y Lsp1p en variados sitios y experimentos dónde se perturba el estado de fosforilación de Pil1p y Lsp1p muestran que el grado de ensamblaje de dichas proteínas en los eisosomas se ve afectado (Walther et al, 2007). Una hipótesis interesante de contrastar sería la de que el estado dinámico de los eisosomas refleja justamente el estado

composicional de los eisosomas y el estado de fosforilación de Pil1p y Lsp1p. Sería muy interesante realizar experimentos donde se puedan observar las quinasas Pkh1p y Pkh2p, o las proteínas BAR Slm1p y Slm2p simultáneamente al estudio del estado dinámico de los eisosomas, así como poder modificar la presencia o ausencia de dichas proteínas en los eisosomas y ver si esto afecta o no el estado dinámico de los mismos.

En segundo lugar es natural preguntar en qué compartimiento subcelular dichos oligómeros se están moviendo o en otras palabras preguntar si los oligómeros en equilibrio están asociados a la membrana plasmática adyacente al dominio eisosomal o están mezclados con la fracción proteica soluble en el citoplasma. Dicha pregunta es difícil de ser respondida con los resultados de la presente tesis ya que el límite de resolución espacial de los experimentos realizados no permite distinguir entre ambas situaciones. Futuros experimentos ya sea de microscopía de súper resolución dinámica o de TIRF podrían ser cruciales para responder esta pregunta. Algunos resultados preliminares de TIRF fueron obtenidos apuntando a que hay una fuerte dinámica molecular sobre la bicapa lipídica en las inmediaciones de los dominios eisomales pero estos experimentos requieren mayor grado de análisis y por lo tanto no serán presentados en el contexto de esta tesis.

En tercer lugar, es importante discutir ¿qué podría significar el hecho de que los oligómeros sean detectados, en los escaneos circulares, a ambos lados del core eisosomal? En los experimentos de escaneos circulares realizados la órbita recorrida por el láser atraviesa la membrana plasmática dos veces: una vez entrando hacia la célula y una vez saliendo. Intuitivamente, teniendo en cuenta la geometría celular y la naturaleza del escaneo, se esperaba que la dinámica molecular de Pil1p y Lsp1p fuera detectada en los pixeles que se encuentran del core eisosomal hacia el interior de la célula. Sin embargo dicha dinámica molecular fue detectada también en los pixeles que se encuentran hacia el exterior celular. Una posible explicación a dichos resultados es que la geometría celular de tipo ovoide combinada con el escaneo de tipo circular y el tamaño del volumen de observación abierto llevan a que conforme el laser se aleja del límite celular, en los siguientes pixeles aún pueden detectarse

dinámicas moleculares que corresponden a la membrana plasmática y su interface de planos celulares próximos en el eje z.

4.5 Modelo de trabajo y futuras direcciones:

Tomando todos los resultados juntos, se puede proponer entonces que los nanodominios eisosomales son sostenidos por un andamiaje proteico basado en proteínas de tipo BAR las cuales interaccionan de manera directa con los lípidos de la bicapa lipídica formando en consecuencia el surco eisosomal y siendo dicha interacción fundamental para la organización de los otros componentes eisosomales. Dicha interacción es de tipo electrostática donde los residuos aminoacídicos con carga eléctrica positiva que están expuestos a la superficie cóncava del dímero interaccionan con la carga negativa de las cabezas polares de los fosfolípidos de la bicapa lipídica.

Además se puede proponer que las proteínas que forman el core eisosomal están unidas a la membrana de forma altamente estable y estática mientras que los bordes eisosomales son heterogéneos siendo en un 50% de los casos estudiados dinámicos y en otro 50% estáticos. Las unidades proteicas que se encuentran en equilibrio en el caso de los eisosomas dinámicos son oligoméricas y la dinámica molecular es lenta con curvas de autocorrelación que ajustan bien a un modelo de asociación-disociación.

Para el caso de las proteínas solubles en el citoplasma se puede postular que las mismas se encuentran mayoritariamente en estado de heterodímeros Pil1p-Lsp1p y que este estado depende al menos en parte de la concentración proteica, la cual en células normales es del orden nanomolar. La afinidad de dichos heterodímeros por la bicapa lipídica depende del grado de fosforilación de las mismas: a mayor grado de fosforilación la carga positiva de la superficie cóncava del heterodímero queda neutralizada disminuyendo así la afinidad por la bicapa lipídica. En dicho modelo Seg1 sería una proteína moduladora de la forma y el tamaño eisosomal limitando el grado de polimerización que los dímeros Pil1p-Lsp1p pueden alcanzar.

Todos los resultados biofísicos y bioquímicos presentados en esta tesis han comenzado a establecer las características cuantitativas de este sistema proteico de formación de nanodominios de membrana plasmática, sin embargo quedan aún muchas preguntas por responder así como ha surgido muchas nuevas e interesantes preguntas. Algunas de éstas son:

- ¿Son los heterodímeros Pil1p-Lsp1p los que durante la mitosis celular se ensamblan directamente en la membrana plasmática o a Seg1p?
- Luego de la formación inicial del sitio de nucleación eisosomal, las subunidades libres de Pilp-Lsp1p (ya sea dímeros u oligómeros) ¿Se unen directamente al sitio de nucleación (reacción única en 3 dimensiones) o primero se unen a la membrana plasmática y posteriormente a los sitios de nucleación (doble reacción, 1 en 3D y otra en 2D)?
- Evidencias de microscopía de fluorescencia sugieren que Seg1 precede a Pil1p-Lsp1p durante la formación de eisosomas formando sitios discretos en gemas pequeñas (Moreira et al, 2012), ¿Seg1p interactúa con Pil1p-Lsp1p? En tal caso, en que compartimento subcelular lo hacen? Si Seg1p no interactúa con Pil1p-Lsp1p, cual es su papel molecular? ¿Se une Seg1p a membranas y las deforma?
- ¿En qué fracción subcelular están localizados los oligómeros de los bordes eisosomales dinámicos?
- ¿Son los eisosomas dinámicos composicionalmente distintos a los estáticos?
- ¿La existencia de eisosomas dinámicos es importante para procesos de señalización subcelular?
- ¿Frente a situaciones de estrés térmico, osmótico o metabólico la proporción de eisosomas dinámicos en la población celular se ve afectada?

Buscar las respuestas a todas estas preguntas permitirá ir completando el modelo biofísico in vivo de formación de nano dominios eisosomales. Las mismas pueden ser respondidas aplicando metodologías similares a las aplicadas en esta tesis, ya sea tanto de FCS, FLIM-FCS como microscopía de súper-resolución resuelta en el tiempo. Muchas de las cepas modificadas y marcadas fluorescentemente en este trabajo de tesis, pueden ser utilizadas para responder varias de estas preguntas. Aplicando metodologías

cuantitativas de observación microscópica de células vivas resuelta en el tiempo y en el espacio se puede de esta forma comenzar a entender mejor los mecanismos de formación de nanodominios de membrana plasmática y relacionar los mismos a procesos fundamentales para la vida de la célula como ser la comunicación celular con el entorno y la ejecución de respuestas que permiten mantener la homeóstasis celular y responder ante situaciones de estrés.

Anexo 1: Materiales y Métodos

Búsquedas bioinformáticas de homología remota.

Para cada una de las 14 proteínas eisosomales analizadas se realizaron búsquedas de homología lejana iniciales comparando las mismas con la base de datos no redundante del NCBI utilizando el algoritmo iterativo PsiBlast con parámetros por defecto y utilizando el sitio web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (Altschul et al, 1997). Las secuencias de las proteínas eisosomales fueron descargadas de la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>). Luego de la cuarta iteración de búsqueda de PsiBlast los resultados con E-values menores a 10^{-3} fueron seleccionados y alineados con el algoritmo 'hhalgn' del paquete HHsearch. Los alineamientos múltiples resultantes (MSA, del inglés "multiple sequence alignments") fueron utilizados para interrogar las bases de datos PDB, Pfam and SCOP (Andreeva et al, 2008; Berman et al, 2007; Finn et al), utilizando los algoritmos del paquete HHsearch (Soding, 2005) y COMPASS (Sadreyev et al, 2003) mediante el uso de los sitios web <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/> y <http://prodata.swmed.edu/compass/compass.php> (con parámetros por defecto). Para el caso del HHsearch, las bases de datos CDD (Marchler-Bauer et al, 2007) y SUPFAM (Pandit et al., 2002) fueron también interrogadas. Las secuencias que no arrojaron resultados significativos fueron fragmentadas en posibles dominios en base a la literatura, reanalizadas eventualmente con parámetros modificados para las búsquedas iniciales de PsiBlast y utilizadas para nuevamente construir MSAs y realizar las búsquedas de homología lejana de HHsearch y COMPASS.

Modelos de estructura tridimensional de dominios detectados por homología lejana

Modelos por homología para los monómeros de Pil1p fueron construidos utilizando 5 dominios BAR/N-BAR con estructura conocida (1URU, 2RAJ, 2Q13, 2FIC and 1I49). Primero las estructuras conocidas fueron superimpuestas utilizando el algoritmo STAMP del programa VMD (Russell & Barton, 1992) exportándose el alineamiento múltiple de secuencias resultante de la superimposición de estructuras en formato fasta. Luego, la secuencia de

Pil1p o Lsp1p fue alineada al MSA obtenido utilizando el programa T-coffee (Notredame et al, 2000). El MSA obtenido fue utilizado para construir el modelo estructural por homología utilizando Modeller (versión 9v3) (Eswar et al, 2008). El mejor modelo (de 50 corridas) fue determinado con el método de análisis DOPE incluido en la suite del Modeller.

Reconstrucciones filogenéticas

Para las reconstrucciones filogenéticas, las secuencias de las proteínas eisosomales obtenidas de la base de datos SGD fueron comparadas mediante BLAST (Altschul et al, 1990) NCBI con las bases de datos genómicas de distintos hongos. Las secuencias encontradas fueron descargadas en formato FASTA, alineadas and editadas utilizando T-coffee (Notredame et al, 2000). Los árboles filogenéticos fueron inferidos utilizando phym1 (Guindon & Gascuel, 2003) con JTT +G+F como modelo de evolución proteica (Jones et al, 1992). Este modelo de evolución fue seleccionado utilizando la herramienta Prottest (Abascal et al, 2005).

Plásmidos y cepas de levaduras

Las cepas de levaduras construidas en esta tesis fueron alcanzadas por modificación genética por recombinación homologa en la cepa w303 con los siguientes marcadores genéticos *leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*. A no ser que se indique lo contrario, las cepas de levaduras fueron crecidas en medio completo YPD (extracto de levadura 1% (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), bacto-peptona 2% (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) y glucosa 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En el caso de las placas de Petri se adicionó este mismo medio con 10% de agar (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Para los cultivos líquidos se crecieron los mismos hasta una densidad óptica medida a 600nm entre 0,4-0,8.

Variantes del plásmido pRS306-PIL1-GFP mut1, mut2 y mut3 (Walther et al, 2007) fueron construidas por mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo del fabricante (QuikChenge, Stratagene) (ver Tabla 2). Los dominios BAR y BAR-PH de Slm1p y Slm2p fueron aislados e insertados en el plásmido pEW331

mediante el uso de enzimas de restricción (XbaI y Sall) y ligasa (Fermentis) siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes (ver Tabla 2). Las extensiones de cada dominio, referenciadas al número de aminoácido de la secuencia proteica de la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org>), son: SIm1p BAR 155-484, SIm1p BAR-PH 155-588, SIm2p BAR 145-461, SIm2p BAR-PH 145-570. Todos los plásmidos fueron corroborados mediante secuenciación. Por otro lado los plásmidos pym25 and pym27 de la colección de plásmidos de EUROSCARF (Janke et al, 2004) fueron modificados por el método de clonado “RFcloning” (Unger et al, 2010) de forma de sustituir el marco abierto de lectura codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) por el marco abierto de lectura codificante ya sea de la proteína fluorescente monomérica Venus (mVenus) y la proteína fluorescente monomérica Cerulean (mCerulean), respectivamente. Los marcos abiertos de lectura de mVenus y mCerulean fueron tomados de los plásmidos 27794 and 15214 de la colección de plásmidos de AddGene (AddGene, Cambridge, MA) (ver Tabla 2). Los resultantes pym25-mVenus y pym27-mCerulean fueron utilizados para el etiquetado C terminal basado en PCR de las proteínas eisosomales y el plásmido pFA6a para la delección por PCR de los genes codificantes eisosomales siguiendo el protocolo de (Janke et al, 2004). Para el caso de la expresión de mVenus soluble en el citoplasma y de Pil1p-mVenus sobreexpresado, fue utilizado el plásmido pEG202 (generosamente cedido por Alejandro Colman Lerner (Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA, Argentina)). El mismo contiene el marco abierto de lectura de lexA bajo el control del promotor fuerte *ADH1*. En este caso se aplicó la técnica de reparación del gap por recombinación homóloga (GP, “gap repair” en inglés) para poder sustituir el marco de lexA por el de mVenus o el de Pil1p-mVenus. Para las transformaciones de GP en la cepa w303, la misma fue transformada con los productos de PCR de los insertos (producidos por PCR con colas homólogas al sitio de inserción dentro de pEG202) y el plásmido pEG202 previamente linealizado mediante digestión enzimática con EcoRI y BamHI (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Tabla 2). Cepas con un marcador fluorescente o un gen deletado fueron obtenidas y corroboradas por PCR y microscopía confocal. Para el caso de cepas con dos etiquetas o con un gen deletado y una etiqueta, se combinaron diferentes pares de cepas de sexos

opuestos y se llevaron adelante ensayos de apareamiento, esporulación y disección de tétradas. Los ensayos de apareamiento fueron realizados en placas de YPD mezclando cantidades iguales de cultivos en fase de crecimiento exponencial de las cepas a combinar e incubados a 30 °C de un día para el otro. Las células diploides resultantes fueron seleccionadas en placas selectivas según los marcadores de las cepas combinadas replicando la placa de apareamiento con terciopelos estériles. Posteriormente se incubaron los diploides seleccionado en medio de durante tres días o hasta que se pudieran observar tétradas mediante microscopía óptica de luz transmitida. El medio de esporulación fue formulado con extracto de levadura 2.5 mg/L, acetato de potasio 150 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mezcla completa de aminoácidos 1X (Sunrise Science Products, San Diego, CA) y glucosa 0.05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las esporas obtenidas fueron resuspendidas en buffer (Tris 10 mM pH 7 Sorbitol 1 M) y tratadas con enzima zimoliasa (0.25 mg/ml, 10T), inoculadas en placa de YPD, disectadas en un microscopio de disección de tétradas (Singer Instrument, Somerset, UK), incubadas a 30 °C por 48 horas, repicadas en placas selectivas para los marcadores esperados y las cepas haploides obtenidas con los marcadores esperados fueron testeadas por PCR y microscopía confocal. Utilizando anticuerpos de conejo policlonales purificados anti Pil1p (cedido gentilmente por Tobias Walther, Harvard, USA) y western blotting se verificaron que los niveles de expresión de las proteínas Pil1p-mVenus fueran similares a los niveles de Pil1p de la cepa silvestre w303 (ver detalles metodológicos más adelante). La lista de oligonucleótidos utilizados se detalla en la tabla 2. Ver tablas de cepas en los respectivos materiales y métodos de los trabajos publicados.

Plásmidos, transfecciones e inmunofluorescencias de las líneas celulares COS-7 y MDCK.

Las secuencias codificantes de Pil1, Pil1p-Mut3 and Lsp1p fueron subclonadas en el plásmido pcDNA3.1+ (Invitrogen, California, USA). Los dominios BAR y BAR-PH de SIm1 y SIm2 fueron aislados e insertados en el plásmido pEGFP-C3 (Clontech) mediante el uso de las enzimas de restricción (XhoI y Sall), siguiendo los mismos procedimientos que con el plásmido pEW331.

Las células MDCK fueron gentilmente cedidas por Arlinet Kierbel (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM, Argentina). Las células COS-7 fueron gentilmente cedidas por Carlos Robello (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay). Las células fueron respectivamente mantenidas en los medios “modified Eagle’s medium” (MEM) y “Dulbecco’s modified Eagle’s médium” (DMEM) de PAA, ambos suplementados con un 10% de suero fetal bovino.

En el caso de las células MDCK, las mismas fueron cultivadas en transwells (Corning, New York, USA) y transfectadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, California, USA) siguiendo los protocolos sugeridos por el proveedor. Para las inmunotinciones, luego de 24 horas de la transfección, las células fueron fijadas con formaldehído 4% durante 20 minutos, permeabilizadas con TritonX-100 0.1% por 15 minutos e inmuno-teñidas con un anticuerpo de conejo policlonal purificado anti-Pil1p. Anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 y 633 (Invitrogen, California, USA) fueron utilizados para el marcado fluorescente. Las membranas fueron cortadas y fueron montadas utilizando ProLong gold antifade (Invitrogen, California, USA) sobre un cubreobjetos y observados luego de 24 horas con un microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP5. En el caso de las células Cos7, las mismas fueron cultivadas en vidrios para microscopía confocal y transfectadas, teñidas y observadas de la misma forma que las células MDCK. La lista de oligonucleótidos utilizados se detalla en la tabla 2. Ver tablas de cepas en los respectivos materiales y métodos de los trabajos publicados.

Western blot:

Un cultivo de 50 mL en fase de crecimiento exponencial fue centrifugado a 3000 g y el pellet se resuspendió en 200 ul de buffer urea 8 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y HEPES 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Un volumen igual de perlas de vidrio de diámetro de 0,5 mm se añadieron a la resuspensión celular y se agitaron durante 5 minutos en vortex (Genius). Una vez terminada la agitación, se añadieron 10 uL de SDS 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos. Después de ese tiempo los derbis celulares se sedimentaron por centrifugación durante 10 minutos a 17000 g, y el sobrenadante fue recogido. La concentración de proteínas totales

se midió usando un ensayo de BCA comercial (Thermo Scientific, Waltham, MA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se empleó BSA como proteína estándar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), realizándose una curva estándar preparada con las concentraciones 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 mg/mL. Las muestras se diluyeron en agua según fuera necesario. Las diluciones de las muestras se realizaron por triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning Inc., Corning, NY). Pocillos con buffer se llevaron a cabo en paralelo y se utilizaron para corregir la absorbancia de fondo. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas Multiscan (Thermo Scientific, Waltham, MA) a 570 nm. Para todas las muestras 20 g de proteína total se separaron por electroforesis desnaturalizante reductora SDS-PAGE. Para esto se prepararon geles de acrilamida: un gel de acrilamida separador de 5 mL conteniendo acrilamida al 10% y un gel de acrilamida concentrador de 1 mL conteniendo acrilamida al 5%, ambos formulados con Tris (0.3 M pH 8.8), SDS (0.010%), PSA (0.010%) y 2 μ L de TEMED cada 5 mL de gel. Se utilizó para ambos una solución stock de acrilamida al 30% (29% de acrilamida y 1% de bis-acrilamida) previamente filtrada con papel Watman 3 mm. Las muestras se mezclaron previamente con tampón de muestra 3x (conteniendo cada 10mL de tampón 10x 1,5 mL de Tris-HCl (1M pH 6.8); 0,6g de SDS; 3,3 mL de Glicerol, 1,5 mL de 2 β -mercaptoetanol y 0,006g de Bromophenol blue). La electrophoresis fue realizada en tampón de corrida 1x (conteniendo cada 300 mL 0.9 g de Tris, 4,32 g de Glicina, 0,3 g de SDS). Finalizada la corrida a 150 v (30 mA aproximadamente) se transfirieron los geles a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF, GE Healthcare, Wilmington, MA) durante una hora por aplicación de un campo eléctrico de 80 V (300 mA aproximadamente) a 4 grados Celsius en tampón de transferencia (conteniendo cada 1,5 L 4,55 g de Tris (25 mM); 21,6 g de Glicina (192 mM) y 150 mL de Metanol) la cual posteriormente fue bloqueada durante toda la noche a 4 °C con leche en polvo no grasa 5% en buffer salino Tris conteniendo 0,05% de Tween-20 (TBST, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para la inmunotransferencia, las membranas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con en anticuerpo policlonal de conejo purificado antiPil1p en una dilución 1:20.000 o para el control de carga con anticuerpo de conejo anti-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluido 1: 20.000 en TBST con 5% de leche en polvo no

grasa. Las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBS-T. La peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se utilizó a una dilución de 1: 16.000 en TBS-T con leche en polvo 5% no grasa durante 90 minutos y las membranas se lavaron posteriormente tres veces durante 10 minutos con TBS-T. Para el desarrollo de la quimioluminiscencia se utilizó el reactivo ECL Western Blotting (GE Healthcare, Wilmington, MA) según las especificaciones del fabricante y posteriormente las membranas se expusieron a una película Hyperfilm ECL para quimioluminiscencia (GE Healthcare, Wilmington, MA). La sobreexposición era en todos los casos impedida variando el tiempo de exposición. Un marcador de masa molecular pre-teñido con bandas de 10 a 250 kDa se utilizó para determinar los tamaños de las proteínas detectadas (Thermo Scientific, Waltham, MA). Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas mediante un escáner SnapScan (Agfa, Mortsel Bélgica). Utilizando el software ScanWise se eliminaron los ajustes automáticos de escala de grises realizados por el escáner de forma de preservar la linealidad de la información. Las imágenes linealizadas fueron analizadas utilizando la función para análisis de bandas del programa ImageJ (www.rsb.info.nih.gov/ij/).

Expresión de proteínas recombinantes y purificación de las mismas.

La secuencia codificante completa de Lsp1p, Pil1p, Pil1p mut1, Pil1p mut2 y Pil1p mut3 se subclonaron en el vector pGEX4T2 (GE Healthcare) y se expresaron en la cepa BL21D3pLys. Para la expresión de las proteínas se cultivaron las células, hasta una DO de 0,8, en dos litros de medio LB (complementado con Carbamicilina 100 ug/ml) a 37 °C y 220 rpm. A continuación se añadió 1 mM de IPTG y las células se incubaron 4 horas a 25 °C y 220 rpm. Para la lisis celular, las células se resuspendieron en 30 mL de un buffer que contiene PBS 1X (bio Merieux), NaCl 0,5 M, MgAc 2 mM, DTT 1 mM, adicionado con lisozima 400 µg/ml y una pastilla de inhibidor de la proteasa Complete (de Roche). A continuación, las células se rompieron mediante sonicación (dobles escalones de 20 segundos con intensidad incremental de a 5% desde 15% hasta 35 %) y la fracción soluble de proteínas se obtuvo por ultracentrifugación (17500g, 45 min, 4 ° C) y filtración (filtro 0,45 µm). De aquí en adelante todas las soluciones utilizadas fueron autoclavadas y

filtradas con un filtro de 0,22 μm . Para la purificación de proteínas, se utilizaron dos columnas conectadas en serie, cada una de 1 mL, de HP GST Trap (de GE Healthcare). Para preparar las columnas las mismas fueron lavadas con 5 volúmenes de agua, 5 volúmenes de PBS (pH 7.4 130 mM de NaCl), 5 volúmenes de tampón 50 mM Tris-HCl pH 8 con glutatión reducido 10 mM y 5 volúmenes de PBS (pH 7.4 130 mM de NaCl). Posteriormente la fracción soluble se inyectó (trabajando a 4 grados Celsius con un flujo de 1mL/minuto), se lavó con PBS (pH 7.4 130 mM de NaCl) y finalmente la digestión de la columna se realizó con 2 mL de trombina 5 U/mg incubada durante toda la noche a 4 grados Celsius. La proteína Lsp1p se recuperó al día siguiente y fue utilizada para una segunda etapa de purificación que se realizó usando una columna de intercambio iónico Resource Q (de GE Healthcare). La muestra se inyectó en la columna, la misma se lavó con PBS (pH 7.4 130 mM de NaCl) y la elución de las proteínas se realizó utilizando PBS (pH 7.4 130 mM de NaCl) adicionado en gradiente con una solución 1 M de NaCl (en un gradiente de 1-100% con velocidad 1 mL/minuto). Se obtuvo la proteína en la fracción del gradiente correspondiente a 45% de NaCl y se almacenó a 4°C. Para la realización del gradiente se trabajó con un equipo Akta, recolectando las distintas fracciones de eluido en placas (0.5 mL por fracción). La fracción se analizó por una electroforesis SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie G-250 y la banda con el peso molecular esperada, fue identificado como Lsp1p por espectrometría de masas. Para el análisis de la solubilidad de proteínas se aplicó la dispersión de luz dinámica con un equipo Malvern (a 10 grados Celsius, a una velocidad de 257,8 kcounts/segundo, durante 60 segundos y con un atenuador de 9).

Preparación de liposomas, ensayos de sedimentación y tubulación in vitro.

Para la producción de liposomas, los lípidos se combinaron formando mezclas compuestas de (95/5 porcentaje molar) de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina/Fosfatidilinositolbifosfato (DPPC/PI(4,5)P2) o extracto de cerebro(BE)/Fosfatidilinositolbifosfato(PIP2) (todos de Avanti Polar Lipids). Para realizar las mezclas por un lado 10 mg de DPPC, por otro 1 mg de PIP2 y por otro 10 mg de BE fueron disueltos respectivamente en 1 mL de una mezcla

cloroformo/metanol (CM) (en proporción 2/1 volumen). A 0,17 mL de la solución de PIP2 en CM se le agregaron 0.5 μ L de HCl 37%, se secaron bajo una corriente de argón en viales de vidrio, se disecaron con vacío durante 1 hora y se re-suspendieron en 500 μ M de CM. Para realizar las mezclas se utilizaron las 3 soluciones de los lípidos en CM utilizando jeringas Hamilton. Cada una de las mezclas se secó bajo una corriente de argón en viales de vidrio y se disecó con vacío durante 1 hora. Los lípidos se hidrataron a continuación con tampón (PBS 1x , DTT 2 mM), se agitaron en vortex suave y se sometieron a 10 ciclos de congelación/descongelación. Inmediatamente se extruyeron con un filtro de 100 nm realizando 11 pasajes por el extrusor previamente lavado con tampón PBS 1x , DTT 2 mM. El diámetro de los liposomas fue corroborado por dispersión de luz dinámica con un equipo Malvern (a 4 grados Celsius, a una velocidad de 269 kcounts/segundo, durante 60 segundos y con un atenuador de 8).

Para los ensayos de tabulación in vitro, 25 μ L de liposomas (1,5 mM) se incubaron con 25 μ L ya sea de Lsp1p, Pil1p o BSA (tanto en una concentración final de 4,5 μ M o 25 μ M) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las mezclas fueron cargadas en grillas de film 10nm Formvar y 1nm Carbon, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, se secaron con papel absorbente, se tiñeron utilizando una solución de Uranilo filtrada con un filtro 0.22 μ m con una concentración del 2% durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se secaron al aire ambiental y se observaron en un microscopio electrónico JEOL (Peabody, MA) JEM 1010 que opera a 80 kV.

Para los ensayos de sedimentación, se centrifugaron 250 μ L de las proteínas recombinantes previamente purificadas Pil1p, Pil1p mut1, Pil1p mut2, Pil1p mut3 y Lsp1p a 100000 g durante 15 minutos a 4 grados Celsius y se recuperaron los sobrenadantes. Se cuantificó la concentración de proteínas mediante absorbancia a 280 nm. Se incubaron las proteínas centrifugadas con liposomas en una relación xxxx y se centrifugaron a 100000 g durante 15 minutos a 4 grados Celsius. Se separaron el sobrenadante y el pellet y se analizaron mediante Western blot. Todos los ensayos se realizaron por

triplicado en tres experimentos independientes.

Microscopía de fluorescencia confocal convencional

Para la microscopía de fluorescencia confocal, las células de levadura se cultivaron hasta la fase exponencial de crecimiento en medio sintético completo (Sunrise Science Products, San Diego, CA) suplementado con 80 ng/mL de Adenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 30 °C. Las células fueron montadas en los mismos medios sobre cubreobjetos o platos de microtitulación con fondo de cristal (vidrio 1.5#) (Mat Tek Corporation, Ashland, MA previamente recubiertas con concanavalina A (Sigma-Aldrich). Las mismas fueron observadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5 a 30 °C. Para las cuantificaciones de niveles de fluorescencia, todas las imágenes que se compararon fueron tomadas usando los mismos ajustes del microscopio. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ (www.rsb.info.nih.gov/ij/). Tres experimentos independientes se realizaron para cada medición y se analizaron 50 células por experimento. Para la corrección de ruido de fondo, regiones situadas fuera de las células y con la misma área que la selección de interés, se midieron. Entonces, este valor se restó al valor de fluorescencia de la selección de interés. Para la caracterización cuantitativa de los niveles de fluorescencia de las cepas que expresan la versión de Pil1p mut2, las imágenes fueron tomadas en la sección media de las células y se cuantificó la fluorescencia total, la fluorescencia de los focos fluorescentes correspondientes a los eisosomes, el número de eisomas por célula y fluorescencia en toda la membrana plasmática y la fluorescencia citoplasmática. Sólo se analizaron las células madre con pequeñas y medianas células hijas. Para el análisis de los focos fluorescentes correspondientes a los eisomas se aplicó un procedimiento de segmentación con la función de umbral manual del software ImageJ (con los mismos parámetros para todas las imágenes de cada cepa analizada). Para la cuantificación de la fluorescencia total asociada a la membrana plasmática de cada célula, se calculó la suma de todos los focos fluorescentes. Entonces la fluorescencia citoplasmática se calculó como la sustracción de la fluorescencia de la membrana plasmática respecto de la fluorescencia total. Para demostrar las diferencias significativas entre el tipo silvestre y los tipos mutantes, los resultados del análisis

cuantitativo de la fluorescencia se compararon mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Mann y Whitney, 1947). Para el estudio de la formación de los Eisosomas a través de microscopía confocal resuelta en el tiempo sólo se analizaron las células hijas. Se aplicó un proceso de deconvolución de la señal fluorescente (Huygens versión Essential 3.5) y una corrección manual del foto quemado originado por la acción de la luz laser sobre la muestra a lo largo de las medidas. Para esto se calculó el factor de corrección utilizando células madre como referencia porque los eisosomas en éstas no presentan un crecimiento detectable en un periodo de tiempo de 20 minutos. De esta manera, se midieron las células madre a través del tiempo y, a continuación todos los valores de fluorescencia se dividieron por el valor del tiempo cero. Se obtuvo un factor para cada tiempo y éste se aplicó a los valores obtenidos en el estudio de los eisosomas en células hijas en crecimiento. Para el análisis estadístico de los datos ya normalizados se utilizó el paquete segmented (<http://cran.r-project.org>) desarrollado para el software R (<http://www.R-project.org>). En primer lugar, para cada conjunto de datos de crecimiento del eisosoma en función del tiempo, se aplicó la prueba de Davies (Davies, 1987) del paquete mencionado para detectar cambios en la pendiente. En todos los casos se detectó este cambio con un valor de p de 0,05. A continuación, se aplicó una regresión lineal segmentada con el cambio en la pendiente en los valores de la función previamente estimados con la prueba de Davies.

Microscopía de 2 fotones, de fluctuación de la señal fluorescente y de vida media del fluoróforo:

Un microscopio construido manualmente con excitación de 2 fotones basado en un cuerpo Olympus IX71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) fue utilizado para todos los experimentos (excepto por los experimentos de FLIM-FRET). El microscopio se equipó con un objetivo 60x Olympus UPlanFLN (NA=1.2) de inmersión en agua (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) y dos detectores fotomultiplicadores con modulo contador de fotones H7422P-40 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). La luz de excitación era proveída por un laser 80 MHz Ti:Sapphire Chameleon Ultra (Coherent Inc., Santa Clara, CA) con un Verdi integrado que va desde 690 a 1040 nm (utilizado para excitar mVenus a

900 nm). Se utilizó un espejo dicróico de paso corto 700DCSPXR (Chroma Technologies, Bellows Falls, VT) para dirigir la luz de excitación a la muestra y un filtro 520BP-30 (Chroma Technologies, Bellows Falls, VT) para seleccionar la luz emitida por mVenus. La irradiación láser media después del objetivo del microscopio fue amplificada con un ACA-4-35N (Becker & Hickl, Berlín, Alemania), y un discriminador de fracción constante 6915 (Phillips Científica, Mahwah, NJ) se usó para convertir la corriente de fotones a pulsos electrónicos TTL (del inglés “transistor–transistor logic”). Por último, los pulsos TTL se contaron usando una tarjeta contadora versión FCS-PCI 0.2 (ISS, Champaign, IL). El barrido de las muestras se realizó mediante galvano-espejos accionados por un motor 6350 (Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA) con un sistema de controladores servo serie 603X 60335 FM (Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA), y un PIFOCP-721 dispositivo piezo-conducido (Physik Instrumente, Karlsruhe / Palmbach, Alemania) todos impulsados por una tarjeta de 3 ejes (ISS, Champaign, IL). Solo para los experimentos de FLIM-FRET, los datos de FLIM fueron adquiridos con un microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM710 META (Zeiss, Jena, Germany), acondicionado con un láser de 2 fotones Ti:Sapphire (Spectra-Physics Maitai, Newport, CA) el cual produce pulsos de 80 fs con una repetición de 80 MHz y con una caja FLIM ISS A320 FastFLIM (ISS, Champaign, IL) para adquirir los datos de vida media en el dominio digital de la frecuencia. Se utilizó un objetivo 63X de inmersión en aceite con apertura numérica 1.4 (Zeiss, Jena, Germany). El láser de 2 fotones fue utilizado para la excitación en 850 nm. Un filtro dicróico SP760nm fue utilizado para separar la señal fluorescente de emisión de la luz del láser. La señal fluorescente fue dirigida por un filtro 509LP, y las señales del fluoróforo dador y aceptor fueron separadas en dos detectores fotomultiplicadores contadores de fotones H7422P-40 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) utilizando los siguientes filtros de banda mCerulean 470/22 y mVenus 542/27. Todos los datos obtenidos fueron adquiridos, procesados y analizados utilizando el software SimFCS (Laboratory for Fluorescence Dynamics, UCI, <http://www.lfd.uci.edu/globals/>, Irvine, CA). Para algunos análisis estadísticos también se utilizó MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, MA) y R (The R Foundation for Statistical Computing).

Tabla 2. Oligonucleótidos y plásmidos

Código en la colección del laboratorio	Nombre del Oligonucleótido	Secuencia del Oligonucleótido	Plásmidos obtenido
173	R145E_Pil1_F	CGAAGGTTCTGTTCAACCATCTAGAGACGAGAAGG	pRS306-PIL1-GFP-R145E
174	R145E_Pil1_R	ACAAGATCACCGACAAAATCGCCTA TAGGCGATTTTGTTCGGTGATCTTGTCCCTTCTCGTC	
177	K148E_Pil1_F	CTGTTCAACCATCTAGAGACCGTAAGGACGAAATC	pRS306-PIL1-GFP-K148E
178	K148E_Pil1_R	ACCGACAAAATCGCCTACTTCAAAT ATTTCAAGTAGGCGATTTTGTTCGGTGATTTTCGTCCCT	
181	K159E_Pil1_F	TACGGTCTCTAGATGGTTGAACAG	pRS306-PIL1-GFP-K159E
182	K159E_Pil1_R	ATCACCGACAAAATCGCCTACTTCAAATACGAAGA TCCTCAATCACCTAAGATTGAGGTC	
185	K165E_Pil1_F	GACCTCAATCTTAGGTGATTGAGGATCTTCGTATTT	pRS306-PIL1-GFP-K165E
186	K165E_Pil1_R	CAAGTAGGCGATTTTGTTCGGTGAT ACTTCAAATACAAAGATCCTCAATCACCTGAAATTG	
179	R148E_Pil145_E_F	AGGTCTTGGAACAAGAATTGGTGC	pRS306-PIL1-GFP-R145E-K148E
180	R148E_Pil145_E_R	GCACCAATTCTTGTTCGAAGACCTCAATTTTCAGGT GATTGAGGATCTTTGTATTTCAAAGT	
175	R145E_Pil148_E_F	CTGTTCAACCATCTAGAGACGAGAAGGACGAAATC	pRS306-PIL1-GFP-R145E-K148E
176	R145E_Pil148_E_R	ACCGACAAAATCGCCTACTTCAAAT ATTTCAAGTAGGCGATTTTGTTCGGTGATTTTCGTCCCT	
183	R159E_Pil165_E_F	TCTCGTCTCTAGATGGTTGAACAG	pRS306-PIL1-GFP-K165E-K159E
184	R159E_Pil165_E_R	CGAAGGTTCTGTTCAACCATCTAGAGACGAGAAGG ACGAAATCACCGACAAAATCGCCTA	
187	R165E_Pil159_E_F	TAGGCGATTTTGTTCGGTGATTTTCGTCCCTTCTCGTC	pRS306-PIL1-GFP-R145E-K148E-K165E-
188	R165E_Pil159_E_R	TCTAGATGGTTGAACAGAACCTTCG ATCACCGACAAAATCGCCTACTTCAAATACGAAGA	
231	XbaI XhoI-BD-SLM1-fw	TCCTCAATCACCTGAAATTGAGGTC	pEW331-Slm1-BD, pEW331-Slm1-BDPH, pEW331-Slm2-BD, pEW331-Slm2-BDPH, pEGFP-C3 -Slm1-BD, pEGFP-C3 -Slm1-BDPH, pEGFP-C3 -Slm2-BD, pEGFP-C3 -Slm2-BDPH
232	Sall-BD-SLM1-rv	TTATCTAGACTCGAGGCTAGGTCTTCCTTACAACG TCAAAG	
233	Sall-BPHD-SLM1-rv	ATTTGTCGACTAGGATTTTAGAAAATTTGATCTTCT TTCTAAAACCCCTG	
234	BDSL1fw	ATTTGTCGACTACTTGTCTTGTATATTCGAAGTAGA TGTTAAGATC	
235	XbaI SacI-BD-SLM2-fw	AGGCCATGAAGCAATTC	
236	PstI-BD-SLM2-rv	TTATCTAGAGAGCTCAACCAAAACGATCCTAGGTC CCCTC	
237	PstI-BPHD-SLM2-rv	TTAACTGCAGCTATGACTTTAAAATTTTGTATCTTTT CTCCAGAAAC	
238	BDSL2fw	TTAACTGCAGCTAGGCAACTTTACTCACATATTTGC ATTTG	
392	mCeru-pym27-f	ATTTGCACGAGGCATTCG	pym27-mCerulean-KAN y pym25-

393	mVen-pym25-f	TGC TGG TGC TGG AGC AAT TCT GGT GAG CAA GGG CGA GGA G	mVenus-HYGRO
394	mVen-pym25-r	AAA CAG ATC TGG CGC GCA GTT AAG CTC GAG ATC TGA GTC CG	
401	mCeru-pym27-r	CGT AAT CTG GAA CGT CAT ATG GAT AGG ATC CTT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC	
327	PIL1-S3	GTCGGACACCAGCAAAGTGAGTCTCTTCCCAACA AACAACAGCT	
328	YGR130C-S3	GAT TCC TTG TAT GAA TAT CAT ACT GAG GAA GAC GTC ATG TAT GCC CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
329	EIS1-S3	TCG ATC GAA GAC GAT CAG GAT GCA ATT AGT AAT CAA GAG AAA AAA CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
330	SEG1-S3	GGT AGT TTC GGC AAA AAA CTG AAA AAA ATC TTT GGT AGA AAG AAA CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
331	MDG1-S3	GCT AAG AAT GGA GGG TTC TTT AAA AAG TTG GCC CAG CTT TTG AAG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
332	PST2-S3	CAC GAA ATT CAA GGC AAG ACT TTC TAC GAA ACC GTT GCA AAG TTT CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
333	RFS1-S3	CAC CAA CTT CAA GGG AAG GCC TTT TAC GAC CGT ATC AAA GAT TTG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
334	YCP4-S3	GAA AAG AAG GAG GAC AAA GGA TTA TTA TCC TGC TGT ACT GTC ATG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
335	PKH2-S3	ACA GGA ACA AAT TTC AAA AAC TCA TCT GCA AAA TCG AAG AGG TCG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
336	SLM1-S3	GTT CCC AAT ATT TAT ATT CAA ACT CCA ATA AAC GAT TTC AAA TCA CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
337	SLM2-S3	TTT TAC ATT GAA AAT GTA GAT TCC CCT AGA AAA AGC AAT CAG CTG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
338	SUR7-S3	TTC ACT ATA AGA AAA TCA CAC GAG CGC CCG GAC GAT GTC TCT GTT CGT ACG CTG CAG GTC GAC	
106	NCE102-S3	GGTTCTTTCTCCAAGAGAAGAAGAACTGGCCAAGT CGGTGTTCCAACCATTTCCCAAGTCCGTACGCTGC AGGTCGAC	
121	LSP1-S3	CCGATCATCATGTTAGTCAAACGGTCATACCTCC GGTTCTGAAAACATCCGTACGCTGCAGGTCGAC	
341	EIS1-S2	TCT TAG CCG CAC CAT TTC TTC GTT ATC TAG GCT CAC TAG CAA TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
342	SEG1-S2	AAT ACA TAA CTT GTA CAA GGA GAG AAT TTC TGC CGA GAG TCC CTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
343	MDG1-S2	ATG GCG AGT ACG TCA TAT ATT TAG GTA TTC TCC TGA TTG TTT TCA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
344	PST2-S2	CAT TCA TTT CCA TAG GTA GGA GAA GTA ATA CTT CAA ATT ATT TCA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	pym27-mCerulean- KAN y pym25- mVenus-HYGRO

345	RFS1-S2	ACA GTT ATA CCA TAT CGT ACT TAT GTA AAG ATA TAT ACG GTT TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
346	YCP4-S2	AAT GTT AGT AAG AAC TAA ATA TTA GAC GCG AAC TGT TGT TTC TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
347	PKH2-S2	GTA TTT AAG TAG CTT GAT GAA AAC ATT AGA TAA AAT TAC TAA TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
348	SLM1-S2	GAT GGA AGG AAA TAA AAA CAT TCT AGT TTA CTA TAC TTG TAT TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
349	SLM2-S2	TTA CAT ACA AAC TAG AGC ATT ACT ATA TAA TTA ACT TAC TTG TCA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
350	SUR7-S2	AGG GGT ATA AAT ATA TAT TAC AAA GCG GAA AAC TTG CGC CAT TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
351	ECM7-S2	AAT ATA GTA TGC ATA TGC ATT TTG AAT GAT GGG TGA AAG AAT TCA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
352	TCB3-S2	GTG CCC TTA TTG AGC GTA TAA AAG AAT AGT TTT CAC TGT TTA TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
353	PIL1-S2	ACA ATA TAG AAA GGT TCG AAT ATA TTA ATT ATT AGA AAA AAC TCA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
119	LSP1 S1	TTTATTTGGTATACGAAAGATTAAACTTTCAAAGCT CCAACACAAGAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	
120	LSP1 S2	CAAGCACAATATAGAAAGGTTCTGAATATATTAATTA TTAGAAAAAACTCAATCGATGAATTCGAGCTCG	
105	NCE102-S2	CTTAATTGAAAGTGGCGTAAAATTTAAGTTGGTGC GCTTCAATTA ATCGATGAATTCGAGCTCG	
354	YGR130C-S2	GAG GTG GGA TAT TCC TTG AAC AAA AGT GGA ATA TTA TTT TTT TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	
489	pEG202- mVenus- mVenus-Fw1	CTCCAAGCTTGAATTAATTCCGGGCGCAATGGTGA GCAAGGGCGAGGAGCTG	
490	pEG202- mVenus- mVenus-Rv1	GCTCACAGCACCAGCACCAGCACCTGCTCCAGCT CGAGATCTGAGTCCGGAC	
491	pEG202- mVenus- mVenus-Fw2	CGAGCTGGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGTGA GCAAGGGCGAGGAGCTG	
492	pEG202- mVenus- mVenus-Rv2	TGGCTGCAGGTCTGACTCGAGCGGCCGCCATTCAA GCTCGAGATCTGAGTCCGGAC	
493	pEG202- mVenus- Pil1mVenus- Fw1	CTCCAAGCTTGAATTAATTCCGGGCGGAATGCACA GAACTTACTCTTTAAGAAATTCCAGGGC	pEG202-mVenus, pEg202-Pil1p- mVenus

494	pEG202- mVenus- mCerulean- Rv2	TGGCTGCAGGTCGACTCGAGCGGCCGCCATTAC TTGTACAGCTCGTCCATGCC	
224	EcoRI- ORFSTOP- Pil1-rv	ATTTGAATTCTTAAGCTGTTGTTTGTGGGGAAGAG AC	
253	BamHI-PIL1- FW	AATTGGATCCATGCACAGAACTTACTCTTTAAGAAA TTCC	
227	EcoRI-ORF- LSP1-rv	AATGAATTCGATGTTTTTCAGAACCGGAGGTATGAC CGTTTTG	
229	EcoRI-BD- LSP1-rv	AATGAATTCAGATTCCAAGGCCGATTCAGCATCCA T	pGEX-4t-2-Pil1, pGEX-4t-2-Lsp1, pGEX-4t-2-Pil1mut1, pGEX-4t-2-Pil1mut2, pGEX-4t-2-Pil1mut3
251	BamHI-LSP1- FW	AATTGGATCCATGCACAGAACTTACTCTTTAAGAAA TC	

Tabla 3. Cepas de levaduras utilizadas

Cepas	Genotipo relevante
PSAY592	W303 <i>MATα pil1::KAN LSP1-CHERRY-HIS3</i>
PSAY855	W303 <i>MATα pil1::KAN LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1-GFP-URA3</i>
PSAY848	W303 <i>MATα pil1::KAN LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 R145E-GFP-URA3</i>
PSAY860	W303 <i>MATα pil1::KAN LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)</i>
PSAY861	W303 <i>MATα pil1::KAN LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 K159E K165E-GFP-URA3 (mut1)</i>
PSAY876	W303 <i>MATα pil1::KAN LSP1-CHERRY-HIS3 PIL1 R145E K148E K159E K165E-GFP-URA3 (mut3)</i>
PSAY437	W303 <i>MATα pil1::LEU</i>
PSAY872	W303 <i>MATα pil1::LEU PIL1-GFP-URA3</i>
PSAY873	W303 <i>MATα pil1::LEU PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)</i>
PSAY874	W303 <i>MATα pil1::LEU SUR7-CHERRY::KAN PIL1-GFP-URA3</i>
PSAY875	W303 <i>MATα pil1::LEU SUR7-CHERRY::KAN PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)</i>
PSAY900	W303 <i>MATα PIL1-CHERRY-KAN</i>
PSAY928	W303 <i>MATα PIL1-CHERRY-KAN PIL1-GFP-URA3</i>
PSAY927	W303 <i>MATα PIL1-CHERRY-KAN PIL1 R145E K148E-GFP-URA3 (mut2)</i>
PSAY928	W303 <i>MATα PIL1-CHERRY-KAN PIL1 R145E K148E K159E K165E-GFP-URA3 (mut3)</i>
PSAY907	S288c <i>MATα PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm1-BAR</i>
PSAY929	S288c <i>MATα PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm1 BAR&PH</i>
PSAY 908	S288c <i>MATα PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm2 BAR</i>
PSAY 909	S288c <i>MATα PIL1-MARS-KAN pEW331-GFP-Slm2 BAR&PH</i>
PSAY695	S288c <i>MATα PIL1-MARS-KAN</i>
PSAY516	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb</i>
PSAY230	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb PIL1-GFP-URA</i>
PSAY231	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb PIL1 R145E K148E-GFP-URA (mut2)</i>
PSAY1240	W303 <i>MATα carrying pEG202mVenus (HIS3 ADH1p-mVENUS).</i>

PSAY1133	W303 <i>MATα PIL1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY1019	W303 <i>MATα PIL1-mCERULEAN-kanMX4..</i>
PSAY1041	W303 <i>MATα LSP1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY1040	W303 <i>MATα LSP1-mCERULEAN-kanMX4..</i>
PSAY1245	W303 <i>MATα pil1::caLeu pEG202-Pil1mVenus-HIS.</i>
PSAY1194	W303 <i>MATα lsp1::NAT PIL1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY1059	W303 <i>MATα PIL1-mCERULEAN-kanMX4. LSP1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY1127	W303 <i>MATα LSP1-mCERULEAN-kanMX4. PIL1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY1132	W303 <i>MATdiploid PIL1-mCERULEAN-kanMX4./PIL1-mCERULEAN-kanMX4..</i>
PSAY1091	W303 <i>MATdiploid LSP1-mCERULEAN-kanMX4. /LSP1-mCERULEAN-kanMX4..</i>
PSAY1132	W303 <i>diploid PIL1-mCERULEAN-kanMX4. PIL1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY1307	W303 <i>diploid lsp1::NAT/lsp1::NAT PIL1-mCERULEAN-kanMX4./PIL1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY1091	W303 <i>diploid LSP1-mCERULEAN-kanMX4./LSP1-mVENUS-hphNT1.</i>
PSAY232	<i>pil1::HIS3 lsp1::KAN bar1::LEU2Calb PIL1 R145E K148E K159E K165E-GFP-URA (mut3)</i>

Anexo 2: Conservación de los dominios eisosomales en otras especies.

Eisosomes and plasma membrane organization

Agustina Olivera-Couto · Pablo S. Aguilar

Received: 30 March 2012 / Accepted: 29 June 2012 / Published online: 15 July 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Membrane compartmentalization allows the spatial segregation of different functions, such as signal transduction and protein trafficking, and ensures their fidelity and efficiency. Eisosomes constitute nanoscale furrow-like invaginations of the plasma membrane where proteins and lipids segregate. The intense interest elicited by eisosomes over the last few years has led to the identification and molecular characterization of their key constituents. This review addresses eisosome structure, functions and its implications for the mechanistic understanding of curvature-induced membrane nanodomains formation and signaling compartmentalization in living cells.

Keywords Membrane · Nanodomains · Curvature · Scaffold · Fungi

Introduction

The startling variety of membrane protein and lipid species of eukaryote cells and the propensity of some of them to self-associate *in vitro* have stimulated theoretical and experimental research supporting the existence of segregated domains in both model and biological membranes (Demel et al. 1977; Mouritsen and Bloom 1984;

van Meer et al. 1987; Simons and Ikonen 1997). Extensive work on Madin–Darby canine kidney cells has demonstrated that segregation of the plasma membrane in well-defined compartments is essential to ascertain the functional identity of epithelial cells. Currently, the identities and mechanisms of formation of these micron-scale domains are well understood (Tanos and Rodriguez-Boulan 2008). However, the lack of conclusive microscopic evidence and the limitations of biochemical characterization techniques (e.g., detergent solubilization, sterol depletion) steered a long debate about the identity and even the existence of membrane domains below the micron level (Munro 2003; Hancock 2006). Recently, various novel microscopy techniques have provided conclusive evidence for the existence of plasma membrane nanodomains in living cells. Currently, it is accepted that essential functions such as cell signaling and endocytosis can be organized in nanoscale plasma membrane platforms. However, the debate concerning their identities and mechanisms of formation is still ongoing (Kusumi et al. 2011; Simons and Sampaio 2011; Mueller et al. 2012).

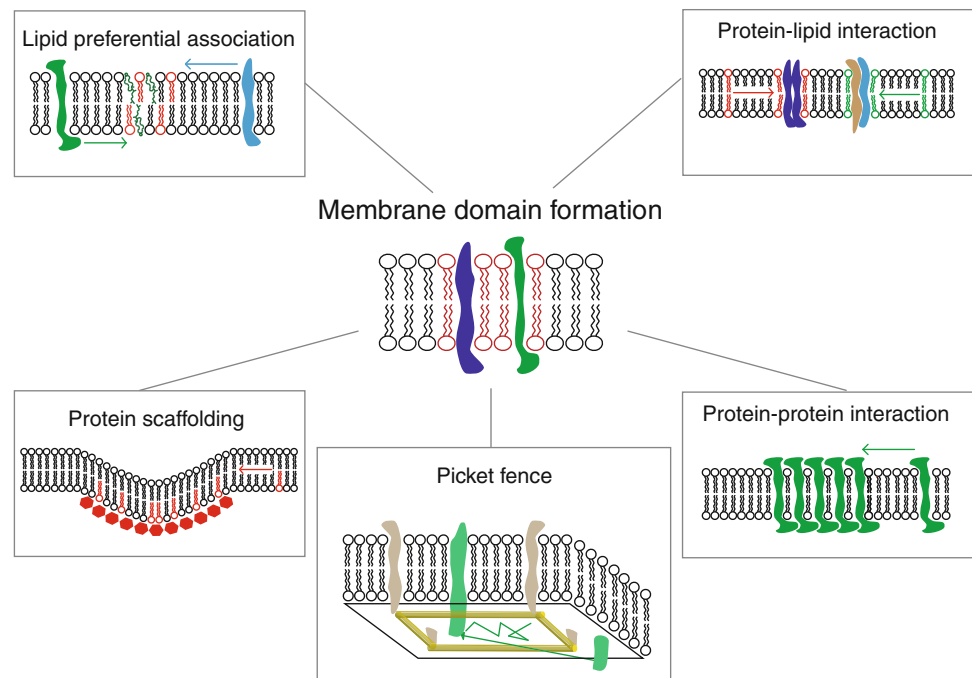
Membrane nanodomains span over a wide range of spatial and temporal scales, extending from tens to hundreds of nanometers and from milliseconds to highly stable and even immutable existence. This diversity contributes to disperse the efforts to build a unifying and simplistic model for plasma membrane nanodomain formation. The current picture involves a complex interplay between at least five different mechanisms (Fig. 1). Preferential association between lipids (e.g., sterols and sphingolipids) provides lipidic platforms, called lipid rafts, where certain protein–protein interactions are favored by selective sorting of proteins (Mouritsen and Bloom 1984; Kaiser et al. 2011; Simons and Sampaio 2011). Within the lipid bilayer, homotypic and heterotypic protein–protein interactions

Communicated by S. Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00438-012-0706-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Olivera-Couto · P. S. Aguilar (✉)
Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay
e-mail: pablo.aguilar@pasteur.edu.uy

Fig. 1 Mechanisms of plasma membrane domain formation. Five not mutually exclusive mechanisms are considered. See text for details



also drive lipid segregation by virtue of preferential protein-lipid interactions (McLaughlin and Murray 2005; Poveda et al. 2008). Dynamic protein-protein interactions of integral membrane proteins can be sufficient to organize domains (Douglass and Vale 2005). Lateral compartmentalization can be achieved by picket fences constituted by transmembrane proteins that are anchored to a submembrane cytoskeleton limiting free diffusion of membrane proteins (Kusumi et al. 2005). Finally, scaffolding of peripheral membrane proteins locally modifies the plasma membrane topography and/or composition by protein-protein and protein-lipid interactions (Johannes and Mayor 2010). As stated by these postulated mechanisms, nanodomain formation occurs throughout self-assembly of different components and consequently this process can be understood as an emergent property of biological membranes (Kusumi et al. 2011; Mueller et al. 2012).

Plasma membrane nanodomains are present in both eukaryotes and prokaryotes (de Bony et al. 1989; Fishov and Woldringh 1999; Matsumoto et al. 2006; Lopez and Kolter 2010). In the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*, descriptions of plasma membrane nanodomains date from 1963 when electron microscopic (EM) views of frozen-etched cells showed hexagonal arrangements of 17 nm diameter particles coexisting with 300 nm long and 50 nm deep furrow-like invaginations (Moor and Muhlethaler 1963). Further studies reported the presence of similar domains in *Schizosaccharomyces pombe* and also indicated that in both, budding and fission yeast, furrow-like invaginations were enriched in quiescent parts of the plasma membrane and absent in sites of active growth

(Streiblova 1968; Takeo 1984). Afterwards, yeast plasma membrane organization received little extra attention besides seminal work on endocytosis (Mulholland et al. 1994). A resurgence of interest in the past n years has resulted in a leap forward in our understanding of the identity, biogenesis and maintenance of yeast plasma membrane domains. In this review we will summarize these advances, focusing on eisosomes and the domains they form in budding yeast and other fungi as well.

Plasma membrane domains in *S. cerevisiae*

A widely used biochemical tool to define membrane domains is solubilization by non-ionic detergents such as Triton X-100. Membranes enriched in sterols and sphingolipids are tightly packed and resistant to Triton X-100 solubilization. This property earned these membranes the acronym DRMs for detergent-resistant membranes (Schroeder et al. 1998). Thus, membrane proteins that after detergent extraction remain associated with DRMs are categorized as lipid rafts components (London and Brown 2000). Prudence has been suggested on the use of this criterion since DRMs obtained with different detergents differ considerably in their protein and lipid content, and these variations are even more prominent between different cell types (Schuck et al. 2003). In *S. cerevisiae*, all plasma membrane proteins analyzed so far partition into DRMs (Bagnat et al. 2000; Malinska et al. 2003, 2004; Lauwers and Andre 2006). In remarkable contrast, fluorescence microscopy analysis of the same membrane revealed the

existence of multiple domains (Malinska et al. 2003, 2004; Berchtold and Walther 2009; Spira et al. 2012). Thus, the DRMs criterion relies on a crude fractionation technique that cannot resolve yeast's plasma membrane domains evidenced by fluorescence microscopy. Consequently, *S. cerevisiae* plasma membrane domains are better defined using cell biological evidence coming from different microscopy approaches. Based on this criterion, both dynamic and static domains have been observed. Dynamic domains include the polarized distribution of proteins and lipids that occurs at sites of cellular growth: buds in vegetative growing cells and “shmoo” projections in cells undergoing mating (Chen and Davis 2000; Bagnat and Simons 2002). These domains are above the micron scale and polarized secretion, differential endocytosis and septin-limited diffusion are postulated mechanisms that contribute to their formation and maintenance (Valdez-Taubas and Pelham 2003; Oh and Bi 2011). A recent survey of yeast plasma membrane organization using total internal reflection microscopy (TIRFM) and deconvolution revealed the existence of more than a dozen nanodomains with different dynamic behaviors and shapes ranging from discrete patches to roughly continuous networks (Spira et al. 2012). Clathrin-mediated endocytic patches are highly dynamic nanodomains (life span of 60–120 s) where cargo is first immobilized, surrounded by a cohort of cytosolic factors and then internalized in a process driven by actin polymerization (Kaksonen et al. 2006). Another example of highly dynamic nanodomains is the foci formed by the target of rapamycin complex 2 (TORC2). Each TORC2 focus is composed by less than ten complexes that assemble, move and disassemble at the plasma membrane within a timescale of a few minutes (Berchtold and Walther 2009).

Examples of static domains are MCCs (for Membrane Compartments occupied by the arginine H⁺-symporter Can1) and MCP (for Membrane Compartment occupied by Pma1) (Grossmann et al. 2007). MCCs are nanoscale patches that have a regular size and are evenly distributed along the plasma membrane. There are between 30 and 40 patches per cell, depending on the cell size, and they are occupied by members of the Sur7/PalI family (pfam06687) and several nutrient H⁺-symporters (Young et al. 2002; Malinska et al. 2003, 2004). Pma1, the major plasma membrane H⁺-ATPase, exports protons creating an electrochemical gradient that drives nutrient import. MCP is a nearly continuous network that partially overlaps with other nanodomains but not with MCCs (Malinska et al. 2003, 2004; Spira et al. 2012). On the cytoplasmic side of each MCC, thousands of units of the paralogous proteins Pil1 and Lsp1 constitute supramolecular membrane-associated complexes called eisosomes (Walther et al. 2006). The current list of static and dynamic domains is certainly

incomplete as it is based on the observation of a large but still discrete set of proteins (Grossmann et al. 2008; Spira et al. 2012). Overall, our current view of yeast plasma membrane organization resembles a patchwork where a multitude of diverse domains coexist and, in some cases, partially overlap (Spira et al. 2012). As described below, eisosomes emerge as topographically distinct domains where lipids and a large number of different proteins are segregated.

Furrow-like invaginations, Mccs and eisosomes

Until recently, the identity of the plasma membrane furrow-like invaginations initially described more than forty years ago had remained mysterious. This knowledge gap has been closed by immuno-EM evidence showing that both the canonical MCC marker Sur7 and the eisosome core protein Pil1 localize at *S. cerevisiae* furrow-like invaginations (Stradalova et al. 2009). Moreover, budding yeast cells lacking Pil1 are deprived of such invaginations. Thus, eisosomes and MCCs are both part of the same subcellular structure: the plasma membrane furrow-like invagination. For simplicity, we will use the term eisosomes to describe furrow-like membrane invaginations and the proteins that partition in them (see Table 1; Fig. 2). Based on colocalization with the sterol-binding drug filipin, it has been proposed that eisosomes also concentrate sterols (Grossmann et al. 2007). Still, because of the propensity of filipin to form aggregates and pores in the plasma membrane of living cells, its use as a sterol marker has been criticized (Robinson and Karnovsky 1980; Valdez-Taubas and Pelham 2003). It has also been proposed that filipin binding is restricted to free but not to sphingolipid-associated sterols and, therefore, it is not an accurate marker for total sterol levels (Jin et al. 2008). Consequently, the usage of ergosterol-like fluorescent lipids such as dehydroergosterol may help to unambiguously determine whether sterols are concentrated at eisosomes (Georgiev et al. 2011). The number of furrow-like invaginations per membrane surface area seen by frozen-etch EM imaging is roughly twice the number of eisosomes observed by fluorescence microscopy. This apparent discrepancy is explained by the resolution limit of conventional light microscopy: two closely located 300 nm long invaginations can be mistaken for one when imaged using fluorescence microscopy (Stradalova et al. 2009). Accordingly, the number of eisosomes per cell seen by super-resolution microscopy is higher than previously calculated (Rankin et al. 2011). Thus, a Pil1-GFP (or Sur7-GFP) plasma membrane fluorescent punctum should not be interpreted as a single eisosome.

Table 1 Eisosomal proteins

Systematic name	Standard name	Evidence	Reference
Membrane-associated proteins			
Ygr086c	Pil1	Eisosome main component	Walther et al. (2006)
Ypl004c	Lsp1	Eisosome main component	Walther et al. (2006)
Ygr130c	Ygr130c	AC/MS, colocalization	Grossmann et al. (2008), Deng et al. (2009)
Ymr031c	Eis1	AC/MS, colocalization	Grossmann et al. (2008), Deng et al. (2009)
Ymr086w	Seg1	AC/MS, colocalization	Deng et al. (2009)
Ykl105c	Ykl105c	AC/MS	Aguilar et al. (2010)
Ynl173c	Mdg1	Colocalization	Grossmann et al. (2008)
Ydr490c	Pkh1	AC/MS, colocalization	Zhang et al. (2004), Walther et al. (2007)
Yol100w	Pkh2	AC/MS, colocalization	Zhang et al. (2004), Walther et al. (2007)
Ydr032c	Pst2	Colocalization	Grossmann et al. (2008)
Ybr052c	Rfs1	Colocalization	Grossmann et al. (2008)
Ycr004c	Ycp4	AC/MS, colocalization	Grossmann et al. (2008), Deng et al. (2009)
Yil105c	Slm1	Colocalization	Grossmann et al. (2008)
Ynl047c	Slm2	Colocalization	Grossmann et al. (2008)
Integral membrane proteins			
Ydl222c	Fmp45	Colocalization	Young et al. (2002)
Yml052w	Sur7	Colocalization	Young et al. (2002), Malinska et al. (2004), Walther et al. (2006)
Ylr414c	Pun1	Colocalization	Alvarez et al. (2008), Grossmann et al. (2008)
Ypr149w	Nce102	Colocalization	Grossmann et al. (2008)
Yel063c	Can1	Colocalization	Malinska et al. (2003)
Yol020w	Tat2	Colocalization	Grossmann et al. (2007)
Ybr021w	Fur4	Colocalization	Malinska et al. (2004)
Ygr131w	Fhn1	Colocalization	Grossmann et al. (2008)
Ynl194c	Ynl194c	Colocalization	Young et al. (2002)

Low-throughput experimental evidence (e.g., affinity chromatography/mass spectrometry (AC/MS) and colocalization) was taken as the criterion for inclusion

Eisosome composition in *S. cerevisiae*

The current list of eisosomal proteins spans almost two dozens and it is expected to increase over time (Table 1). Notably, few components have a molecular function assigned. Among them, proteins that structure eisosomes and proteins involved in nutrient uptake and signal processing have been described. Different genetic and phenotypic analyses provide clues about the function of less well-characterized components. Here, we will discuss major aspects of eisosomal proteins in budding yeast. Composition and organization of eisosomes in other fungi are summarized in “Box 1” and Table 2.

Structural proteins

Pil1 and Lsp1 constitute the core components of eisosomes. The cellular content of these two proteins is comparable to the amount of ribosomal proteins (roughly 2×10^5 molecules/cell) and is at least one order of magnitude higher than the next most abundant eisosomal protein

(Ghaemmaghmi et al. 2003; Walther et al. 2006). Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis of Pil1 indicated that assemblies formed by this protein are highly stable (Walther et al. 2006). Crystallographic and in silico studies have shown that Lsp1 and Pil1 contain a bin/amphiphysin/rvs (BAR) domain encompassing 50 % of the proteins (Olivera-Couto et al. 2011; Ziolkowska et al. 2011). Like canonical BAR domain proteins, Pil1 and Lsp1 form banana-shape dimers that self-assemble into scaffolds which bind and bend liposomes forming tubular membranes (Karotki et al. 2011; Olivera-Couto et al. 2011). Accordingly, it has been proposed that Pil1 and Lsp1 are responsible for structuring the yeast plasma membrane into furrow-like invaginations (Stradalova et al. 2009; Karotki et al. 2011; Olivera-Couto et al. 2011; Ziolkowska et al. 2011). Based on the structure of Lsp1 dimers (Ziolkowska et al. 2011) and the cryo-EM reconstruction images of Pil1 and Lsp1 liposome-bound scaffolds (Karotki et al. 2011), it can be estimated that each furrow-like invagination contains approximately 1,000 molecules of both Pil1 and Lsp1, which is in good agreement with previous calculations

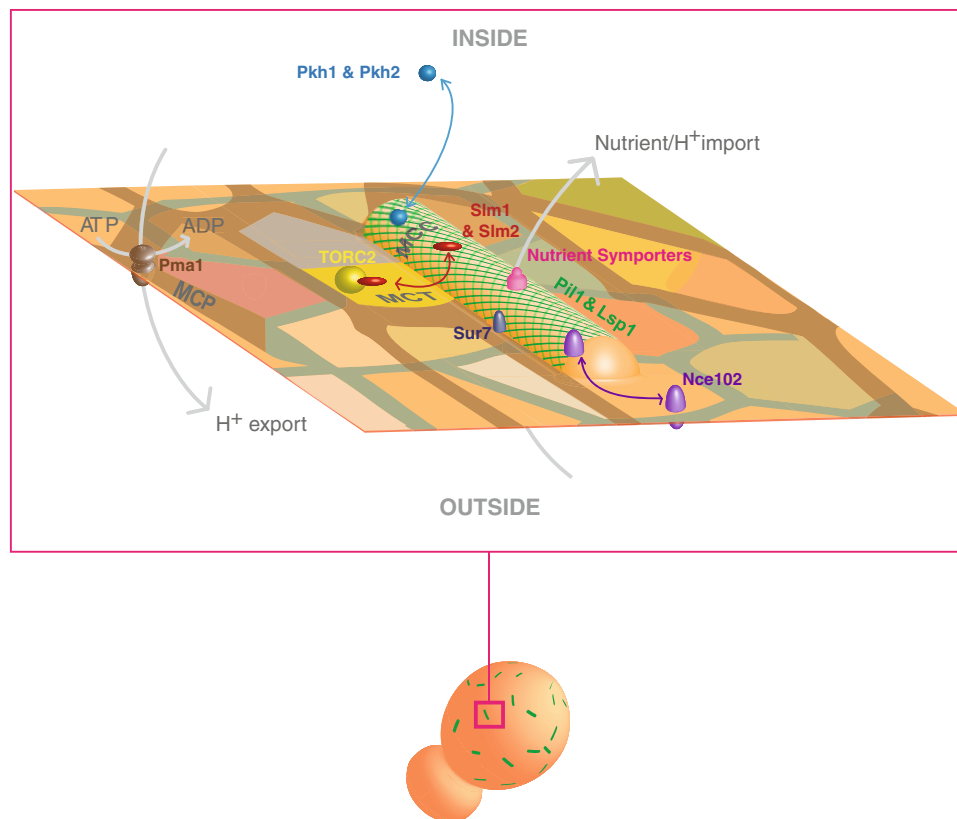


Fig. 2 *Saccharomyces cerevisiae*'s plasma membrane resembles a patchwork where various domains ranging from discrete patches to roughly continuous networks coexist and partially overlap. Among them, eisosome core proteins Pil1 and Lsp1 (green) scaffold and sculpt the plasma membrane into furrow-like invaginations concentrating lipids; nutrient H^+ -symporters (pink); tetra-spanning trans-membrane proteins like Sur7 (dark blue) and Nce102 (lilac); and signaling proteins. Nce102 displays a dual partition that is sensitive to

sphingolipid availability (see text for details). Pkh1 and Pkh2 (light blue) are transiently recruited to a subset of eisosomes where they phosphorylate Pil1 and Lsp1, and presumably other substrates. Pma1 ATPase (brown) is exclusively located at the network-like domain called MCP (brown), whereas TORC2 effectors Slm1 and Slm2 (red) are dynamically exchanged between membrane compartment occupied by TORC2 (MCTs) (yellow) and the invaginations

(Walther et al. 2006). Pil1 and Lsp1 BAR domains preferentially bind to liposomes containing phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PI(4,5)P₂). PI(4,5)P₂ depletion causes detachment of Pil1-GFP from the plasma membrane and conversely, increased PI(4,5)P₂ levels lead to formation of much larger Pil1-GFP scaffolds (Karotki et al. 2011). Thus, eisosome membranes might be reservoirs of this phosphoinositide.

Membrane-associated proteins

Pkh1 and Pkh2 kinases, the functional homologs of the mammalian phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), phosphorylate Pil1 and Lsp1 and regulate eisosome assembly (Zhang et al. 2004; Walther et al. 2007; Luo et al. 2008) (see below). Pkh kinases activity is regulated by long-chain bases (LCBs), which are precursors of sphingolipid biosynthesis (Sun et al. 2000; Friant et al. 2001; Zhang et al. 2004). LCBs are positive regulators of the phosphorylation of several Pkh kinases targets, including

Lsp1. However, LCBs inhibit Pkh-mediated phosphorylation of Pil1 (Zhang et al. 2004). How Pkh1/2 are targeted to eisosomes is currently unknown, although the presence of a phosphoinositide-binding pleckstrin homology (PH) domain in Pkh2 has been recently suggested (Olivera-Couto et al. 2011).

Slm1 and Slm2 are an essential pair of proteins that promotes actin cytoskeleton organization, sphingolipid homeostasis and cell growth (Audhya et al. 2004; Tabuchi et al. 2006). Slms are TORC2 effectors, they physically interact with and are phosphorylated by TORC2 (Audhya et al. 2004). Thus, an apparent paradox is that the expected localizations for Slms are membrane compartment occupied by TORC2 (MCTs) and not eisosomes. This conflict has been recently solved by evidence showing that Slms are dynamically exchanged between these two compartments (Berchtold et al. 2012). The molecular features that sustain Slms dynamic exchange are currently unknown. Both Slm1 and Slm2 have a PH domain that is sufficient for plasma membrane binding but not for recruitment to

Table 2 *S. cerevisiae* eisosomal proteins homology assignment based on phylogenetic analysis

Systematic name	Standard name	Closest homolog or gene clade in <i>S. cerevisiae</i>
Pil1–Lsp1		
<i>A. nidulans</i>		
AN5217	pilA	Pil1–Lsp1
AN3931	pilB	Pil1–Lsp1
<i>C. albicans</i>		
orf19.3149	Lsp1	Pil1
orf19.778	Pil1	Lsp1
<i>A. gossypii</i>		
AEL329W	AgPil1	Pil1
AGL006C	AgLsp1	Lsp1
<i>S. pombe</i>		
SPAC3C7.02c	pil2	Pil1–Lsp1
SPCC736.15	pil1	Pil1–Lsp1
SPBC1347.03	meu14	Pil1–Lsp1 ^a
Pkh1–Pkh2		
<i>A. nidulans</i>		
AN3110	–	Pkh1–Pkh2
<i>C. albicans</i>		
orfO19.12690	–	Pkh1–Pkh2
<i>A. gossypii</i>		
AFR335C	AgPKH1/2	Pkh1–Pkh2
<i>S. pombe</i>		
SPCC576.15c	ksg1	Pkh1–Pkh2
SPBC1778.10c	ppk21	Pkh1–Pkh2
Slm1–Slm2		
<i>A. nidulans</i>		
AN4171	–	Slm1–Slm2
AN5671	–	Slm1–Slm2
<i>C. albicans</i>		
orf19.3505	–	Slm1–Slm2
<i>A. gossypii</i>		
ADL234C	AgSlm1/Slm2	Slm1–Slm2
<i>S. pombe</i>		
SPAC637.13c	slm1	Slm1–Slm2
Sur7–Fmp45–Ynl194c–Pun1		
<i>A. nidulans</i>		
AN1331	–	Sur7–Fmp45–Ynl194c–Pun1
AN5213	–	Sur7–Fmp45–Ynl194c–Pun1
AN4615	surG	Sur7–Fmp45–Ynl194c
<i>C. albicans</i>		
orf19.6489	Fmp45	Fmp45–Ynl194c–Sur7
orf19.6741	–	Sur7–Fmp45–Ynl194c–Pun1
orf19.3414	Sur7	Sur7
<i>A. gossypii</i>		
AER090W	–	Pun1 ^b
ABL156C	–	Fmp45–Ynl194c
AFR368C	AgSur7	Sur7

Table 2 continued

Systematic name	Standard name	Closest homolog or gene clade in <i>S. cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>		
SPAC15A10.09c	pun1	Sur7–Fmp45–Ynl194c–Pun1
<i>Nce102–Fhn1</i>		
<i>A. nidulans</i>		
AN7683	–	Nce102–Fhn1
AN8422	–	Nce102–Fhn1
<i>C. albicans</i>		
orf19.5960	Nce102	Nce102–Fhn1
<i>A. gossypii</i>		
AFR312W	AgNce102	Nce102–Fhn1
<i>S. pombe</i>		
SPBC1685.13.1	fhn1	Nce102–Fhn1
Seg1–Ykl105c		
<i>A. nidulans</i>		
–	–	–
<i>C. albicans</i>		
orf19.8830	–	Seg1–Ykl105c
orf19.1246	–	Seg1–Ykl105c
<i>A. gossypii</i>		
ABL037C	AgSeg1	Seg1–Ykl105c
<i>S. pombe</i>		
–	–	–
Ygr130c		
<i>A. nidulans</i>		
–	–	–
<i>C. albicans</i>		
orf19.6763	<i>Slk19</i>	Ygr130c
<i>A. gossypii</i>		
AFR310C	–	Ygr130c
<i>S. pombe</i>		
–	–	–
Eis1–Ykl050c		
<i>A. nidulans</i>		
AN6340	<i>klpA</i>	Eis1–Ykl050c
<i>C. albicans</i>		
orf19.6160	–	Eis1–Ykl050c
<i>A. gossypii</i>		
ABR081C	–	Eis1–Ykl050c
<i>S. pombe</i>		
–	–	–
Pst2–Ycp4–Rfs1		
<i>A. nidulans</i>		
AN0297	–	Pst2–Rfs1
<i>C. albicans</i>		
orf19.5286	Ycp4	Ycp4
orf19.2241	Pst1	Pst2–Rfs1
orf19.3612	Pst2	Pst2–Rfs1

Table 2 continued

Systematic name	Standard name	Closest homolog or gene clade in <i>S. cerevisiae</i>
orf19.5285 <i>A. gossypii</i>	Pst3	Pst2–Rfs1
– <i>S. pombe</i>		
SPAC3C7.14c Mdg1–Crp1	obr1	Pst2–Rfs1
<i>A. nidulans</i>		
AN4988	–	Mdg1–Crp1
<i>C. albicans</i>		
– <i>A. gossypii</i>		
ABL133C <i>S. pombe</i>	–	Mdg1–Crp1
–		

See phylogenetic trees in Online Resource 1

^a *meu14* is more distantly related to Pil1/Lsp1 than *pil1* and *pil2*

^b Here Pun1 refers to the clade that contain *S. cerevisiae* Pun1, Ylr413w and Ykl187c

eisosomes (Yu et al. 2004). Slms recruitment to eisosomes is assured by the simultaneous presence of a predicted F-BAR domain and the PH domain (Olivera-Couto et al. 2011). Thus, it is possible that Slms targeting to eisosomes depends on protein–lipid interactions, whereas targeting to TORC2 depends mainly on protein–protein interactions.

Integral membrane proteins

Can1, Tat2 and Fur4 are H⁺-symporters that import nutrients and protons into the cell. Sur7 is the prototypical member of the Sur7/PaI1 family of tetra-spanning integral membrane proteins (pfam06687). In *S. cerevisiae*, three other proteins belonging to this family (Fmp45, Pun1 and Ynl194c) are also part of eisosomes. *SUR7* has been associated with endocytosis since its overexpression partially suppresses several phenotypes caused by mutations in amphiphysin-like endocytic proteins Rvs167 and Rvs161 (Sivadon et al. 1997). Single deletion of *SUR7*, *FMP45* or *YNL194C* causes slight defects in sporulation and changes in inositol phosphorylceramides membrane composition (Young et al. 2002). *PUN1* gene expression is induced by different cell wall injuries, metal ion stress and during nitrogen stress-dependent filamentous growth (Lagorce et al. 2003; Xu et al. 2010; Hosiner et al. 2011). Deletion of *PUN1* leads to thin cell walls with low β -glucan content, defective filamentous growth and increased heavy metal stress sensitivity (Xu et al. 2010; Hosiner et al. 2011).

These phenotypes suggest that Pun1 is a stress responsive protein contributing to cell wall integrity maintenance (Xu et al. 2010; Hosiner et al. 2011). Nce102 and its paralog Fhn1 are also tetra-spanning membrane proteins. There are two interesting features that distinguish Nce102 from the other eisosomal integral membrane proteins. First, deletion of NCE102 leads to a *pil1* Δ -like phenotype (Grossmann et al. 2008; Frohlich et al. 2009). Second, Nce102 concentrates at eisosomes depending on sphingolipid availability and influences Pkh kinases signaling (see below).

Eisosome biogenesis and maintenance

In remarkable contrast with most yeast cellular organelles, eisosomes are static. Time-lapse microscopy monitoring of GFP-tagged versions of Sur7, Can1 and Pil1 in mother cells showed that these markers do not change their localization during a life span (Young et al. 2002; Malinska et al. 2003; Walther et al. 2006). In contrast to mother cells, live monitoring of Pil1-GFP and Sur7-GFP showed that eisosomes are assembled de novo in growing buds (Young et al. 2002; Moreira et al. 2009). Active sites of eisosome assembly are first detected at the neck of small-size buds. As the bud size increases, early eisosomes get bigger and new sites of assembly appear towards the bud tip. This vectorial pattern of eisosome assembly (advanced at the neck and nascent at the tip) reflects the polar deposition of brand new plasma membrane during bud anisotropic growth (Moreira et al. 2009). Before cytokinesis, when daughter cells are close to reaching their maximum size, active assembly of eisosomes has already concluded (Moreira et al. 2009). Pairwise correlation analysis of eisosome location demonstrated that their sites at the plasma membrane are not pre-assigned, but randomly distributed (Moreira et al. 2009). Similar features of eisosome assembly have been observed in other fungi as well, such as *S. pombe* and *C. albicans* (Kabeche et al. 2011; Reijntj et al. 2011). Although Pil1 and Lsp1 are the most likely initiators of eisosome assembly, there are still no reports that address simultaneous monitoring of more than one eisosomal protein during this process. This type of analysis would establish which components settle first and which ones colonize the preoccupied spots.

Compelling evidence indicates that Pil1 is the eisosome main organizer. Pil1 production is cell cycle-regulated in synchronicity with bud membrane expansion (Moreira et al. 2009). The absence of Pil1 causes massive eisosome disorganization. In *pil1* Δ cells, eisosomal integral membrane proteins disperse in the plasma membrane, associated proteins fall into the cytoplasm and furrow-like invaginations disappear (Walther et al. 2006; Grossmann et al. 2007; Stradalova et al. 2009; Aguilar et al. 2010). Still, *pil1* Δ cells

have few eisosome “remnants” that concentrate elevated amounts of eisosomal proteins and correspond to large aberrant plasma membrane invaginations (Walther et al. 2006; Stradalova et al. 2009). In striking contrast with Pil1, Lsp1 absence did not render a noticeable phenotype indicating that Pil1 alone is sufficient to sustain eisosome formation and maintenance (Walther et al. 2006).

Eisosome integrity does not depend on either actin or tubulin cytoskeletons since Pil1 and Can1 localization were unperturbed by latrunculin A or nocodazole treatments (Malinska et al. 2004; Walther et al. 2006). Depolarization of the plasma membrane, either by application of an external electrical field or by adding the H^+ gradient uncoupler FCCP, releases Can1, Tat2 and Fur4 nutrient H^+ -symporters from their eisosomal location. This behavior is reversible, after repolarization H^+ -symporters move back to eisosomes. Notably, only these H^+ -symporters are sensitive to membrane depolarization since Pil1, Nce102, Sur7 and even Pma1 localizations were unperturbed under the same conditions (Grossmann et al. 2007, 2008). This differential behavior of H^+ -symporters suggests that their activities may be influenced by location. Accordingly, when Can1 is artificially removed from eisosomes it becomes inactive (Spira et al. 2012). It is currently unknown whether inactive mutant versions of Can1 and other H^+ -symporters are still concentrated at eisosomes and/or sensitive to depolarization-induced changes in localization.

Eisosome organization is highly sensitive to perturbations in plasma membrane lipid composition. Pil1 and Lsp1 bind preferentially to liposomes containing PI(4,5)P₂, a phosphoinositide that is enriched in yeast plasma membrane. Eisosomes disassemble when yeast cells are depleted of PI(4,5)P₂, more likely due to loss of direct interaction between Pil1 and Lsp1 with this phosphoinositide at the plasma membrane (Karotki et al. 2011). Pil1 assembly is also affected by sphingolipid-sensitive Pkh kinases activity (Walther et al. 2007; Luo et al. 2008). Pkh kinases overexpression increases the amount of phospho-Pil1, which detaches from the plasma membrane and accumulates in the cytoplasm leaving few assembled eisosomes per cell. Depletion of the sphingolipid precursors LCBs by adding the drug myriocin also leads to increased levels of phospho-Pil1 and eisosome disassembly (Walther et al. 2007; Luo et al. 2008; Frohlich et al. 2009). This is consistent with results showing loss of eisosome organization when a phospho-mimicking variant of Pil1 is the only source of Pil1. Reciprocally, in vivo inactivation of Pkh kinases leads to Pil1 hypophosphorylation and formation of large eisosomes, as does the use of a Pil1 variant lacking phosphorylation sites. (Walther et al. 2007; Luo et al. 2008). Thus, a hyperphosphorylation state of Pil1 promotes eisosomes disassembly and conversely, assembly

increases if Pil1 is hypophosphorylated. However, other non-phosphorylatable variants of Pil1 are unable to form eisosomes remaining in the cytoplasm (Luo et al. 2008). A possible explanation for this discrepancy is that different sets of phosphorylated residues play different roles in protein-lipid and protein-protein interactions. Many Pil1 phosphorylated residues locate either in the concave (lipid-binding) face of the BAR domain or in areas proposed to be involved in Pil1 dimer-dimer interactions (Karotki et al. 2011; Olivera-Couto et al. 2011; Ziolkowska et al. 2011). Another player in the regulation of Pil1 phosphorylation status mediated by sphingolipids is Nce102. It has been proposed that Nce102 is a sphingolipid-responsive protein that negatively regulates Pil1 phosphorylation (Frohlich et al. 2009). Based on this model, high sphingolipid availability drives Nce102 partition towards eisosome domains where it inhibits Pkh kinases. The resulting decrease in phospho-Pil1 levels promotes eisosome assembly. Conversely, when sphingolipid availability is compromised (e.g., under myriocin treatment) Nce102 abandons eisosomes and relieves Pkh kinases inhibition leading to high levels of phospho-Pil1 and eisosomes disassembly (Frohlich et al. 2009). Cellular sterol composition also impacts on eisosome integrity. Deletion of the ergosterol biosynthetic genes *ERG2*, *ERG24* and *ERG6* lead to loss of eisosome assembly (Grossmann et al. 2008). Since yeast cells adjust their sphingolipid composition in response to changes in sterols structure it is possible that the observed phenotypes are due to altered Pkh kinases activity (Guan et al. 2009). Eisosome integrity is also lost in *slm2Δ slm1^{ts}* mutants but the mechanism involved is still unknown (Kamble et al. 2011).

Molecular and cellular functions of eisosomes, outstanding questions

Work accumulated during the last decade offers a molecular portrait of plasma membrane domain organization in fungi. At first glance, eisosome domains are the best understood case: the key players have been identified, molecular structures have been solved and a dynamic description of domain formation has already been sketched. Thus, the starting materials needed to elucidate the molecular mechanisms of eisosome-mediated membrane domain formation are already available. Still, our understanding of eisosome cellular functions remains elusive. As described below, eisosomes have been involved in many vital cellular functions. However, massive eisosome disorganization caused by *PIL1* deletion is not accompanied by a noticeable decrease in cellular fitness. This conundrum may be a consequence of the lifestyle of prevalent laboratory yeast strains. In our opinion, the most pressing

question is why have eisosome domains been conserved during fungi evolution? Below, we briefly summarize current topics of eisosomes molecular and cellular functionality giving prominence to still open questions, which are also listed in “Box 2”.

Membrane domain formation and maintenance

Eisosomes construct invaginated plasma membrane domains. Extensive work on different model fungi positions Pil1 as the main organizer of eisosomes (Young et al. 2002; Walther et al. 2006; Grossmann et al. 2007, 2008; Moreira et al. 2009; Stradalova et al. 2009; Vangelatos et al. 2010; Kabeche et al. 2011; Seger et al. 2011). Since Pil1 and Lsp1 self-assemble and form membrane-bound scaffolds of tubular shape an immediate question that arises is whether these proteins are sufficient to build membrane domains (Karotki et al. 2011; Olivera-Couto et al. 2011). Curvature-induced lipid segregation has been theoretically described and experimentally demonstrated (Markin 1981; Roux et al. 2005). Membrane tube pulling in giant unilamellar vesicles (GUVs) is sufficient to induce lipid segregation within ternary mixtures of sphingomyelin, phosphatidylcholine and cholesterol (Roux et al. 2005). Curvature-induced lipid sorting is amplified by sphingolipid-clustering proteins such as cholera toxin B-subunit (Sorre et al. 2009). Analogously, the phosphoinositide-binding capacity of Pil1 and Lsp1 may aid to cluster lipids into nascent domains. In vitro reconstitution of membrane domain formation using liposomes and purified proteins will be an important step in determining the minimal machinery required for eisosome-driven membrane compartmentalization.

One of the most striking differences between budding yeast Pil1 and Lsp1 is the inability of the latter to organize eisosomes in the absence of the former. Why are Pil1 and Lsp1 so similar but behaving so differently? In *Ashbya gossypii*, this functional divergence is also observed for the highly similar pair (74 % amino acid identity) of Pil1-Lsp1 orthologs (Seger et al. 2011). Elucidation of the intrinsic differences between *S. cerevisiae* Pil1 and Lsp1 proteins will shed light on this issue. Lsp1 phosphorylation sites have not been characterized yet and Pil1 and Lsp1 phosphatases, if they exist, are still unidentified. The current crystal structure of Lsp1 lacks the first 50 amino acid residues of the poorly conserved N-terminus (Ziolkowska et al. 2011). In both Pil1 and Lsp1, this region is important for in vitro assembly and membrane binding (Karotki et al. 2011). It is currently unknown whether Pil1/Lsp1 N-termini, like N-terminal extra amphipathic helices in BAR domain proteins, confer differential membrane-sculpting capacities (Zimmerberg and Kozlov 2006). Also, whether these regions interact with different subsets of eisosomal proteins remains to be determined.

Another unsolved issue is how integral membrane proteins are targeted to eisosomes. The different behaviors of eisosome integral membrane proteins suggest the existence of at least two mechanisms operating in eisosome targeting. Can1 and Tat2 are being continuously exchanged between eisosomes and MCP (Brach et al. 2011). These symporters abandon eisosomes upon plasma membrane depolarization. Thus, either functional- or membrane potential-dependent conformational changes affecting protein–protein and/or protein–lipid interactions may mediate this displacement (Grossmann et al. 2007). In contrast, Sur7 localization is not affected by plasma membrane depolarization. Whether the other members of the Sur7 family that localize at eisosomes behave similarly is currently unknown. Mug33, a fission yeast member of the Sur7/Pal1 family provides an interesting clue in this regard. Wild-type Mug33 resides at the plasma membrane but does not colocalize with Pil1. Deletion of Mug33 C-terminal cytoplasmic tail redirects the resultant protein to eisosomes. This suggests that the remaining N-terminal portion, which strictly spans the four transmembrane domains, contains enough structural information for eisosome targeting (Snaith et al. 2011). Similarly, the structural determinants that keep Pma1 in the MCP network await further characterization.

Eisosomes and endocytosis

Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast depends on actin dynamics and involves the progressive assembly of more than 60 proteins at the plasma membrane (Kaksonen et al. 2006). Colocalization analyses using the lipid dye FM4-64 and the plasma membrane protein cargo Hxt2 suggested that Pil1 marks sites for endocytosis (Walther et al. 2006). The endocytic rate of the α -factor mating pheromone receptor Ste3 is diminished in *pil1Δ lsp1Δ* double mutants (Walther et al. 2006). Loss of Pil1 leads to several defects in assembly of endocytic mediators (e.g., Abp1, Las17, Rvs161/Rvs167, Sjl2) at endocytic sites (Murphy et al. 2011). Genetic interactions between *SUR7*, *PIL1*, *LSP1* and known endocytic mediators (e.g., *RVS161*, *RVS167*, *SJL1*, *SJL2*) reinforced the link between eisosomes and endocytosis (Sivadon et al. 1997; Walther et al. 2006; Fiedler et al. 2009; Aguilar et al. 2010; Karotki et al. 2011). However, colocalization analyses of different markers of clathrin-actin-mediated endocytosis (e.g., Abp1, Sla1, Ede1, Sla2, Rvs161) indicated that endocytic events occur within MCPs independently of eisosome organization (Grossmann et al. 2008; Brach et al. 2011). Moreover, *PIL1* or *NCE102* deletion resulted in accelerated endocytosis of Can1 and Fur1 (Grossmann et al. 2008). These results supported the idea that eisosomes protect these symporters from being internalized (Grossmann et al. 2008). However, an independent analysis of Can1 and Tat2

endocytic rates found no differences between *pil1Δ* and wild-type cells (Brach et al. 2011). Besides these contrary results, these reports agree showing that calthrin-actin-dependent endocytic mediators do not gather at eisosomes. Moreover, the lack of colocalization between different calthrin-actin-dependent endocytic mediators and eisosomes has also been reported in both *A. gossypii* and *S. pombe* (Kabeche et al. 2011; Seger et al. 2011). Overall, the role of eisosomes in endocytosis is under serious criticism and further research is needed to unambiguously solve this issue. Recently, a clathrin-independent actin-dependent endocytic pathway has been described in *S. cerevisiae*. This novel pathway depends on the GTPase Rho1 and the formin Bni1 and seems to be Abp1- and Las17-independent (Prosser et al. 2011). No specific cargo for this pathway has been identified yet and the spatial/functional relationship with eisosomes remains to be determined.

Eisosomes and signaling

Pkh kinases and Slm1/Slm2-TORC2 are involved in cell growth, heat stress-response, actin cytoskeleton organization and sphingolipid homeostasis. It has been proposed that these shared functions are channeled through the AGC kinases orthologs Ypk1 and Ypk2. To be fully activated, Ypk1 and Ypk2 require dual phosphorylation by Pkh kinases and TORC2 (Roelants et al. 2002; Kamada et al. 2005; Aronova et al. 2008). The lack of lipid-binding motifs in Ypk1 and Ypk2 made it difficult to explain how these kinases were activated at the plasma membrane. However, it has been shown that TORC2 effectors Slm1 and Slm2 recruit Ypk1 to the plasma membrane for phosphorylation by TORC2 which, in turn, facilitates the subsequent activation of Ypk1 by Pkh1/2 (Niles et al. 2012). In agreement with these findings, it has been shown that under plasma membrane stress (e.g., hiposmotic shock, sphingolipid synthesis inhibition) Slm1 abandons eisosomes and interacts with TORC2 to further promote recruitment and activation of Ypk1 (Berchtold et al. 2012). Thus, in this scenario, eisosomes act as reservoirs of signaling molecules that are released according to need. It is currently unknown whether relocation of Pkh kinases is also required for plasma membrane stress-mediated Ypk1 activation.

Pkh kinases, TORC2 and Ypk1 are also involved in aminophospholipid flippase mediated activation (Roelants et al. 2010). Phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine are returned to the inner leaflet of the plasma membrane via lipid translocases or flippases. The membrane-associated protein kinase Fpk1, a flippase activator, is phosphorylated and inactivated by Ypk1 in a Slm1/Slm2- and Pkh1/2-dependent manner (Roelants et al. 2010; Niles

et al. 2012). Fluorescent microscopy imaging showed that Fpk1 localizes diffusely in the cytoplasm, at endosomal/TGN structures and at the plasma membrane (Nakano et al. 2008; Roelants et al. 2010). It is currently unknown whether eisosomes participate in these signaling events.

In both *A. nidulans* and *S. cerevisiae*, a signaling pathway that includes the Sur7/PalI family member PalI (Rim9 in *S. cerevisiae*) mediates ambient pH sensing (Penalva et al. 2008). PalI/Rim9 associates with the plasma membrane sensor PalH (Rim21 and Dfg16 in *S. cerevisiae*). This pathway, dubbed Pal/RIM, requires components of the ESCRT machinery and arrestin-like proteins. Live fluorescent microscopy monitoring of *S. cerevisiae* cells showed that activation of this pathway leads to sequential recruitment of arrestins, Pal/RIM and ESCRT proteins into plasma membrane static foci that are distributed in an eisosome-like pattern (Herrador et al. 2010; Galindo et al. 2012). These signaling foci are not involved in actin-clathrin-mediated endocytosis and whether or not they are related with eisosomes is currently unknown (Galindo et al. 2007).

Most of the mentioned signaling components are very low abundant proteins with a highly dynamic behavior making live monitoring a technically difficult task. However, the power of yeast genetics combined with novel microscopy techniques, such as live stochastic optical reconstruction microscopy (live STORM), image correlation spectroscopy (ICS), fluorescence lifetime imaging (FLIM) and fluorescence cross correlation spectroscopy (FCCS), will help dissecting the specific roles of eisosomes as signaling platforms.

Acknowledgments We thank Héctor Yuyo Romero for helping with phylogenetic reconstructions and analysis. We also thank Arlinet Kierbel and Gustavo Pesce for collaborating with stimulating discussions and critical reading of the manuscript. This work was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (INNOVA URUGUAY-DCI-ALA/2007/19.040 URU-UE, P.S.A.; Sistema Nacional de Becas, A.O.-C.; and Sistema Nacional de Investigadores, P.S.A.) and the Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (A.O.-C. and P.S.A.).

Box 1: Eisosome conservation and organization in other fungi

There is currently no evidence for eisosome presence in organisms outside the fungi kingdom. However, structurally comparable domains called caveolae are found in the plasma membrane of mammalian cells. Caveolae are 60–80 nm flask-shaped stable invaginations formed by scaffolding of the integral membrane proteins caveolins and the membrane-associated proteins cavins (Hansen and Nichols 2010). Like eisosomes, caveolae concentrate

sterols and phosphoinositides and have been implicated in plasma membrane stress-mediated signaling and regulation of lipid homeostasis (Bastiani and Parton 2010; Hansen and Nichols 2010). Besides these appealing similarities, the repertoire of known core components and mechanism of assembly of both domains are quite dissimilar (Moreira et al. 2009; Hayer et al. 2010). Eisosomes and caveolae might, therefore, represent a case of convergent evolution.

Conservation of different eisosomal components across all fungi is disparate. Most eisosomal components are present in ascomycetes, Pil1 and Lsp1 and few others are found in basidiomycetes and no eisosomal proteins were found in zygomycetes or chytridiomycetes (Olivera-Couto et al. 2011). A phylogenetic analysis across the ascomycota phylum shows that most eisosomal proteins share a history filled with multiple events of gene duplication and gene loss, a common feature in this phylum (see Online Resource 1). In addition to extensive work in budding yeast, eisosomes are being actively characterized in four other ascomycetes, annotation of eisosomal proteins and their phylogenetic relationships are summarized in Table 2 and Online Resource 1:

Aspergillus nidulans: In ungerminated conidia of this filamentous fungus, eisosome organization is similar to budding yeast: Pil1/Lsp1 orthologs (PilA and PilB) and Sur7 ortholog (SurG) all colocalize at the spore periphery forming a dense net of foci (Vangelatos et al. 2010). In contrast, in actively growing hyphae eisosome organization is markedly different: PilA forms foci, whereas PilB is cytoplasmic and SurG shows vacuolar and endosomal localization. PilA is required for organization of SurG peripheral foci but not of PilB foci. On the other hand, *SURG* deletion leads to loss of PilB (but not PilA) peripheral foci (Vangelatos et al. 2010).

Ashbya gossypii: Eisosomes in this filamentous fungus share several common features with their *S. cerevisiae* counterparts: Pil1 and Lsp1 form static and stable foci that are assembled de novo at active sites of cellular growth (Seger et al. 2011). Also, eisosomes organization depends on the presence of Pil1 (but not of Lsp1). Unlike *S. cerevisiae*, deletion of *NCE102* in *A. gossypii* does not affect eisosome organization, suggesting that there is no connection between Nce102 and Pkh kinases signaling. In addition to loss of eisosome organization, *PIL1* deletion in *A. gossypii* leads to severe reduction of polar surface expansion and formation of abnormal bulged hyphae (Seger et al. 2011). The ortholog of YMR086w/YKL105c, *SEG1*, is needed to maintain eisosome stability (Seger et al. 2011).

Candida albicans: Studies in this human pathogen, which exhibits both budding yeast and hyphae morphologies, uncovered novel functional roles for Sur7. Like in *S. cerevisiae*, in *C. albicans* Pil1, Lsp1, Sur7 and Fmp45

form static foci in budding cells and also in hyphae (Alvarez et al. 2008; Reijntj et al. 2011; Wang et al. 2011). *C. albicans* eisosomes are absent at the tips of growing hyphae or buds, suggesting that de novo assembly is also restricted to areas of active growth (Reijntj et al. 2011). In contrast to *S. cerevisiae*, deletion of *C. albicans SUR7* ortholog leads to several phenotypes, including lack of septin localization at bud necks, defective growth polarization, ectopic growth of cell wall, defective biofilm formation and, more importantly, decreased virulence in a mouse model of infection (Alvarez et al. 2008; Bernardo and Lee 2010; Wang et al. 2011; Douglas et al. 2012). Since septins control the correct positioning of actin patches and cell wall-synthesizing enzymes, it has been proposed that many of the phenotypes observed in *sur7Δ* cells are due to defects in septin organization (Alvarez et al. 2008). How Sur7 is implicated in septin organization remains to be elucidated. Notably, *SUR7* deletion does not affect Lsp1 foci organization (Alvarez et al. 2008). Currently, there is no published evidence about the phenotypes caused by deletion of *PIL1* or *LSP1* in *C. albicans*. Thus, it is currently unknown whether *C. albicans* eisosomes mediate plasma membrane organization and if they are needed to sustain Sur7 functions.

Schizosaccharomyces pombe: Both frozen-etch EM and fluorescent microscopy data showed that fission yeast has 1–2 μm long eisosomes, much larger than those present in *S. cerevisiae* (Moor and Muhlethaler 1963; Streiblova 1968; Takeo 1984; Kabeche et al. 2011). Like *S. cerevisiae*, eisosomes are formed de novo behind the active sites of growth. Eisosomes are also stable and static (Kabeche et al. 2011). However, during cell division eisosomes are actively removed from the future zone of septation. This clearance includes breakage, disassembly and even directional movement of eisosomes away from the cell division zone (Kabeche et al. 2011). Gene swapping experiments suggest that there is a Pil1-independent mechanism that regulates eisosome assembly in both fission and budding yeasts. In an *S. pombe pil1Δ pil2Δ* strain, expression of *S. cerevisiae PIL1-GFP* leads to formation of 1–2 μm long filaments that are indistinguishable from those observed in wild-type fission yeast cells. Conversely, expression of *S. pombe Pil1-GFP* in a *pil1Δ S. cerevisiae* strain renders Pil1-GFP puncta that colocalize with endogenous Lsp1 (Kabeche et al. 2011).

Like Nce102 in *S. cerevisiae*, *S. pombe Fhn1* presents a dual localization being dispersed along the plasma membrane and concentrated at Pil1 filaments. Similarly, in *pil1Δ* cells Fhn1 disperses homogeneously in the plasma membrane and Pil1 filaments are less numerous and shorter in *fhn1Δ* cells (Kabeche et al. 2011). Surprisingly, *S. pombe Slm1* and Sur7 orthologues do not colocalize with

Pil1 or depend on Pil1 for their localization stressing the functional divergence that exists in budding and fission yeast's Pil1 (Kabeche et al. 2011). There is a third, more distantly related Pil1/Lsp1 ortholog, Meu14, which is required for maturation of the forespore membrane (FSM) during sporulation (Okuzaki et al. 2003). The FSM is a double-membrane envelope that extends and engulfs each of the haploid nuclei produced by meiosis during sporulation. The extending FSM adopts a cup-like shape and Meu14 localizes at the rim, which is called the leading edge. In Meu14-depleted cells, the leading edges are abnormally assembled and FSMs are morphologically aberrant (Okuzaki et al. 2003). A high sensitivity search for distant orthologs suggested that, like Pil1 and Lsp1, Meu14 is a BAR domain-containing protein (our unpublished results). Thus, it is tempting to speculate that the molecular function of Meu14 is to maintain the high curvature of the FSM leading edge.

Box 2: Outstanding questions

- Is there a physiological or genetic context in which eisosome domain organization is essential for cell growth?
- Are Pil1 and Lsp1 sufficient to segregate proteins and lipids?
- What are the molecular features that distinguish eisosome targeting of H⁺-symporters from proteins of the Sur7 and Nce102 families?
- Which are the molecular functions of still uncharacterized eisosomal proteins?
- Which are the Pil1 and Lsp1 phosphatases?
- What keeps eisosomes static?
- How is eisosome assembly controlled?
- Which are the molecular features that distinguish Pil1 from Lsp1?
- Is there an eisosome-dependent endocytic pathway?
- What is the molecular mechanism that releases Slm1 from eisosomes upon plasma membrane stress?

References

- Aguilar PS, Frohlich F, Rehman M, Shales M, Ulitsky I, Olivera-Couto A, Braberg H, Shamir R, Walter P, Mann M, Ejsing CS, Krogan NJ, Walther TC (2010) A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nat Struct Mol Biol* 17:901–908
- Alvarez FJ, Douglas LM, Rosebrock A, Konopka JB (2008) The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 19:5214–5225
- Aronova S, Wedaman K, Aronov PA, Fontes K, Ramos K, Hammock BD, Powers T (2008) Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell Metab* 7:148–158
- Audhya A, Loewith R, Parsons AB, Gao L, Tabuchi M, Zhou H, Boone C, Hall MN, Emr SD (2004) Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* 23:3747–3757
- Bagnat M, Simons K (2002) Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14183–14188
- Bagnat M, Keranen S, Shevchenko A, Simons K (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3254–3259
- Bastiani M, Parton RG (2010) Caveolae at a glance. *J Cell Sci* 123:3831–3836
- Berchtold D, Walther TC (2009) TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell* 20:1565–1575
- Berchtold D, Piccolis M, Chiaruttini N, Riezman I, Riezman H, Roux A, Walther TC, Loewith R (2012) Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat Cell Biol* 14:542–547
- Bernardo SM, Lee SA (2010) *Candida albicans* SUR7 contributes to secretion, biofilm formation, and macrophage killing. *BMC Microbiol* 10:133
- Brach T, Specht T, Kaksonen M (2011) Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J Cell Sci* 124:328–337
- Chen L, Davis NG (2000) Recycling of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* 151:731–738
- de Bony J, Lopez A, Gilleron M, Welby M, Laneelle G, Rousseau B, Beaucourt JP, Tocanne JF (1989) Transverse and lateral distribution of phospholipids and glycolipids in the membrane of the bacterium *Micrococcus luteus*. *Biochemistry* 28:3728–3737
- Demel RA, Jansen JW, van Dijck PW, van Deenen LL (1977) The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 465:1–10
- Deng C, Xiong X, Krutchinsky AN (2009) Unifying fluorescence microscopy and mass spectrometry for studying protein complexes in cells. *Mol Cell Proteomics* 8:1413–1423
- Douglas LM, Wang HX, Keppler-Ross S, Dean N, Konopka JB (2012) Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*. *MBio* 3(1). doi: 10.1128/mBio.00254-11
- Douglass AD, Vale RD (2005) Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein–protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 121:937–950
- Fiedler D, Braberg H, Mehta M, Chechik G, Cagney G, Mukherjee P, Silva AC, Shales M, Collins SR, van Wageningen S, Kemmeren P, Holstege FC, Weissman JS, Keogh MC, Koller D, Shokat KM, Krogan NJ (2009) Functional organization of the *S. cerevisiae* phosphorylation network. *Cell* 136:952–963
- Fishov I, Woldring CL (1999) Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32:1166–1172
- Friant S, Lombardi R, Schmelzle T, Hall MN, Riezman H (2001) Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J* 20:6783–6792
- Frohlich F, Moreira K, Aguilar PS, Hubner NC, Mann M, Walter P, Walther TC (2009) A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J Cell Biol* 185:1227–1242
- Galindo A, Hervas-Aguilar A, Rodriguez-Galan O, Vincent O, Arst HN Jr, Tilburn J, Penalva MA (2007) PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic* 8:1346–1364

- Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN Jr, Penalva MA (2012) An ordered pathway for the assembly of ESCRT-containing fungal ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J Cell Sci* 125:1784–1795. doi:10.1242/jcs.098897
- Georgiev AG, Sullivan DP, Kersting MC, Dittman JS, Beh CT, Menon AK (2011) Osh proteins regulate membrane sterol organization but are not required for sterol movement between the ER and PM. *Traffic* 12:1341–1355
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425:737–741
- Grossmann G, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* 26:1–8
- Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarova M, Tanner W (2008) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol* 183:1075–1088
- Guan XL, Souza CM, Pichler H, Dewhurst G, Schaad O, Kajiwara K, Wakabayashi H, Ivanova T, Castillon GA, Piccolis M, Abe F, Loewith R, Funato K, Wenk MR, Riezman H (2009) Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol Biol Cell* 20:2083–2095
- Hancock JF (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:456–462
- Hansen CG, Nichols BJ (2010) Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 20:177–186
- Hayer A, Stoeber M, Bissig C, Helenius A (2010) Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic* 11:361–382
- Herrador A, Herranz S, Lara D, Vincent O (2010) Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol Cell Biol* 30:897–907
- Hosiner D, Sponder G, Graschopf A, Reipert S, Schweyen RJ, Schuller C, Aleschko M (2011) Pun1p is a metal ion-inducible, calcineurin/Crz1p-regulated plasma membrane protein required for cell wall integrity. *Biochim Biophys Acta* 1808:1108–1119
- Jin H, McCaffery JM, Grote E (2008) Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. *J Cell Biol* 180:813–826
- Johannes L, Mayor S (2010) Induced domain formation in endocytic invagination, lipid sorting, and scission. *Cell* 142:507–510
- Kabeche R, Baldissard S, Hammond J, Howard L, Moseley JB (2011) The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast. *Mol Biol Cell* 22:4059–4067
- Kaiser HJ, Orłowski A, Rog T, Nyholm TK, Chai W, Feizi T, Lingwood D, Vattulainen I, Simons K (2011) Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16628–16633
- Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:404–414
- Kamada Y, Fujioka Y, Suzuki NN, Inagaki F, Wullschlegler S, Loewith R, Hall MN, Ohsumi Y (2005) Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* 25:7239–7248
- Kamble C, Jain S, Murphy E, Kim K (2011) Requirements of Slm proteins for proper eisosome organization, endocytic trafficking and recycling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci* 36:79–96
- Karotki L, Huisken JT, Stefan CJ, Ziolkowska NE, Roth R, Surma MA, Krogan NJ, Emr SD, Heuser J, Grunewald K, Walther TC (2011) Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *J Cell Biol* 195:889–902
- Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34:351–378
- Kusumi A, Suzuki KG, Kasai RS, Ritchie K, Fujiwara TK (2011) Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem Sci* 36:604–615
- Lagorce A, Hauser NC, Labourdette D, Rodriguez C, Martin-Yken H, Arroyo J, Hoheisel JD, Francois J (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278:20345–20357
- Lauwers E, Andre B (2006) Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. *Traffic* 7:1045–1059
- London E, Brown DA (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* 1508:182–195
- Lopez D, Kolter R (2010) Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev* 24:1893–1902
- Luo G, Gruhler A, Liu Y, Jensen ON, Dickson RC (2008) The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J Biol Chem* 283:10433–10444
- Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2003) Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* 14:4427–4436
- Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2004) Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci* 117:6031–6041
- Markin VS (1981) Lateral organization of membranes and cell shapes. *Biophys J* 36:1–19
- Matsumoto K, Kusaka J, Nishibori A, Hara H (2006) Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol* 61:1110–1117
- McLaughlin S, Murray D (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438:605–611
- Moor H, Muhlethaler K (1963) Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J Cell Biol* 17:609–628
- Moreira KE, Walther TC, Aguilar PS, Walter P (2009) Pil1 controls eisosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 20:809–818
- Mouritsen OG, Bloom M (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys J* 46:141–153
- Mueller NS, Wedlich-Soldner R, Spira F (2012) From mosaic to patchwork: Matching lipids and proteins in membrane organization. *Mol Membr Biol*. doi:10.3109/09687688.2012.687461
- Mulholland J, Preuss D, Moon A, Wong A, Drubin D, Botstein D (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol* 125:381–391
- Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115:377–388
- Murphy ER, Boxberger J, Colvin R, Lee SJ, Zahn G, Loor F, Kim K (2011) Pil1, an eisosome organizer, plays an important role in the recruitment of synaptojanins and amphiphysins to facilitate receptor-mediated endocytosis in yeast. *Eur J Cell Biol* 90:825–833
- Nakano K, Yamamoto T, Kishimoto T, Noji T, Tanaka K (2008) Protein kinases Fpk1p and Fpk2p are novel regulators of phospholipid asymmetry. *Mol Biol Cell* 19:1783–1797
- Niles BJ, Mogri H, Hill A, Vlahakis A, Powers T (2012) Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:1536–1541
- Oh Y, Bi E (2011) Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol* 21:141–148

- Okuzaki D, Satake W, Hirata A, Nojima H (2003) Fission yeast *meu14+* is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. *J Cell Sci* 116:2721–2735
- Olivera-Couto A, Grana M, Harispe L, Aguilar PS (2011) The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Mol Biol Cell* 22:2360–2372
- Penalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* 16:291–300
- Poveda JA, Fernandez AM, Encinar JA, Gonzalez-Ros JM (2008) Protein-promoted membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1778:1583–1590
- Prosser DC, Drivas TG, Maldonado-Baez L, Wendland B (2011) Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J Cell Biol* 195:657–671
- Rankin BR, Moneron G, Wurm CA, Nelson JC, Walter A, Schwarzer D, Schroeder J, Colon-Ramos DA, Hell SW (2011) Nanoscopy in a living multicellular organism expressing GFP. *Biophys J* 100:L63–L65
- Reijntj P, Walther A, Wendland J (2011) Dual-colour fluorescence microscopy using yEmCherry-/GFP-tagging of eisosome components Pil1 and Lsp1 in *Candida albicans*. *Yeast* 28:331–338
- Robinson JM, Karnovsky MJ (1980) Evaluation of the polyene antibiotic filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol. *J Histochem Cytochem* 28:161–168
- Roelants FM, Torrance PD, Bezman N, Thorne J (2002) Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol Biol Cell* 13:3005–3028
- Roelants FM, Baltz AG, Trott AE, Fereres S, Thorne J (2010) A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:34–39
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P, Goud B (2005) Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J* 24:1537–1545
- Schroeder RJ, Ahmed SN, Zhu Y, London E, Brown DA (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem* 273:1150–1157
- Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5795–5800
- Seger S, Rischatsch R, Philippson P (2011) Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *J Cell Sci* 124:1629–1634
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572
- Simons K, Sampaio JL (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004697
- Sivadon P, Peypouquet MF, Doignon F, Aigle M, Crouzet M (1997) Cloning of the multicopy suppressor gene SUR7: evidence for a functional relationship between the yeast actin-binding protein Rvs167 and a putative membranous protein. *Yeast* 13:747–761
- Snaith HA, Thompson J, Yates JR 3rd, Sawin KE (2011) Characterization of Mug33 reveals complementary roles for actin cable-dependent transport and exocyst regulators in fission yeast exocytosis. *J Cell Sci* 124:2187–2199
- Sorre B, Callan-Jones A, Manneville JB, Nassoy P, Joanny JF, Prost J, Goud B, Bassereau P (2009) Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:5622–5626
- Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich-Soldner R (2012) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol* 14(6):640–648. doi:10.1038/ncb2487
- Stradalova V, Stahlschmidt W, Grossmann G, Blazikova M, Rachel R, Tanner W, Malinsky J (2009) Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci* 122:2887–2894
- Streiblova E (1968) Surface structure of yeast protoplasts. *J Bacteriol* 95:700–707
- Sun Y, Taniguchi R, Tanoue D, Yamaji T, Takematsu H, Mori K, Fujita T, Kawasaki T, Kozutsumi Y (2000) Sli2 (Ypk1), a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Mol Cell Biol* 20:4411–4419
- Tabuchi M, Audhya A, Parsons AB, Boone C, Emr SD (2006) The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol Cell Biol* 26:5861–5875
- Takeo K (1984) Lack of invaginations of the plasma membrane during budding and cell division of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett* 22:97–100
- Tanos B, Rodriguez-Boulan E (2008) The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* 27:6939–6957
- Valdez-Taubas J, Pelham HR (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr Biol* 13:1636–1640
- van Meer G, Stelzer EH, Wijnaendts-van-Resandt RW, Simons K (1987) Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J Cell Biol* 105:1623–1635
- Vangelatos I, Roumelioti K, Gournas C, Suarez T, Scazzocchio C, Sophianopoulou V (2010) Eisosome organization in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 9:1441–1454
- Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439:998–1003
- Walther TC, Aguilar PS, Frohlich F, Chu F, Moreira K, Burlingame AL, Walter P (2007) Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO J* 26:4946–4955
- Wang HX, Douglas LM, Amanianda V, Latge JP, Konopka JB (2011) The *Candida albicans* Sur7 protein is needed for proper synthesis of the fibrillar component of the cell wall that confers strength. *Eukaryot Cell* 10:72–80
- Xu T, Shively CA, Jin R, Eckwahl MJ, Dobry CJ, Song Q, Kumar A (2010) A profile of differentially abundant proteins at the yeast cell periphery during pseudohyphal growth. *J Biol Chem* 285:15476–15488
- Young ME, Karpova TS, Brugger B, Moschenross DM, Wang GK, Schreiner R, Wieland FT, Cooper JA (2002) The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol* 22:927–934
- Yu JW, Mendrola JM, Audhya A, Singh S, Keleti D, DeWald DB, Murray D, Emr SD, Lemmon MA (2004) Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 13:677–688
- Zhang X, Lester RL, Dickson RC (2004) Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem* 279:22030–22038
- Zimmerberg J, Kozlov MM (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:9–19
- Ziolkowska NE, Karotki L, Rehman M, Huisken JT, Walther TC (2011) Eisosome-driven plasma membrane organization is mediated by BAR domains. *Nat Struct Mol Biol* 18:854–856

Supplemental Material:

Eisosomes and plasma membrane organization

Molecular Genetics and Genomics

Agustina Olivera-Couto and Pablo S. Aguilar

Institut Pasteur de Montevideo, 11400, Uruguay

Address correspondence to: Pablo S. Aguilar (pablo.aguilar@pasteur.edu.uy)

Phylogenetic analysis:

To determine homology relationships of *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *A. gossypii*, *C. albicans* and *S. pombe* eisosomal proteins we performed a phylogenetic analysis across 16 fungal genomes encompassing all ascomycota subphyla and two basidiomycota subphyla. Eisosomal proteins amino acid sequences from *S. cerevisiae* S288c strain were obtained from SGD (<http://www.yeastgenome.org/>). These sequences were used as queries to perform genomic psi-blast searches (Altschul et al. 1997) using NCBI web-server (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi). The analyzed fungal genomes were: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Coccidioides immitis*, *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitanae*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus neoformans* and *Ustilago maydis*. Subsequent multiple sequence alignments were done using Mafft employing both L-INS-i and G-INS-i methods (Kato et al. 2002; Kato and Toh 2010). Ensuing alignment editions were done with trimAl using the gappyout method (Capella-Gutierrez et al. 2009). Evolution models were selected using ProtTest (Darriba et al. 2011). Phylogenetic reconstructions were inferred with PhyML using the SPR algorithm (Guindon et al. 2005; Guindon et al. 2010). Tree nodes with a SH-like branch support greater than 75 were considered for homology determination.

Phylogenetic tree images:

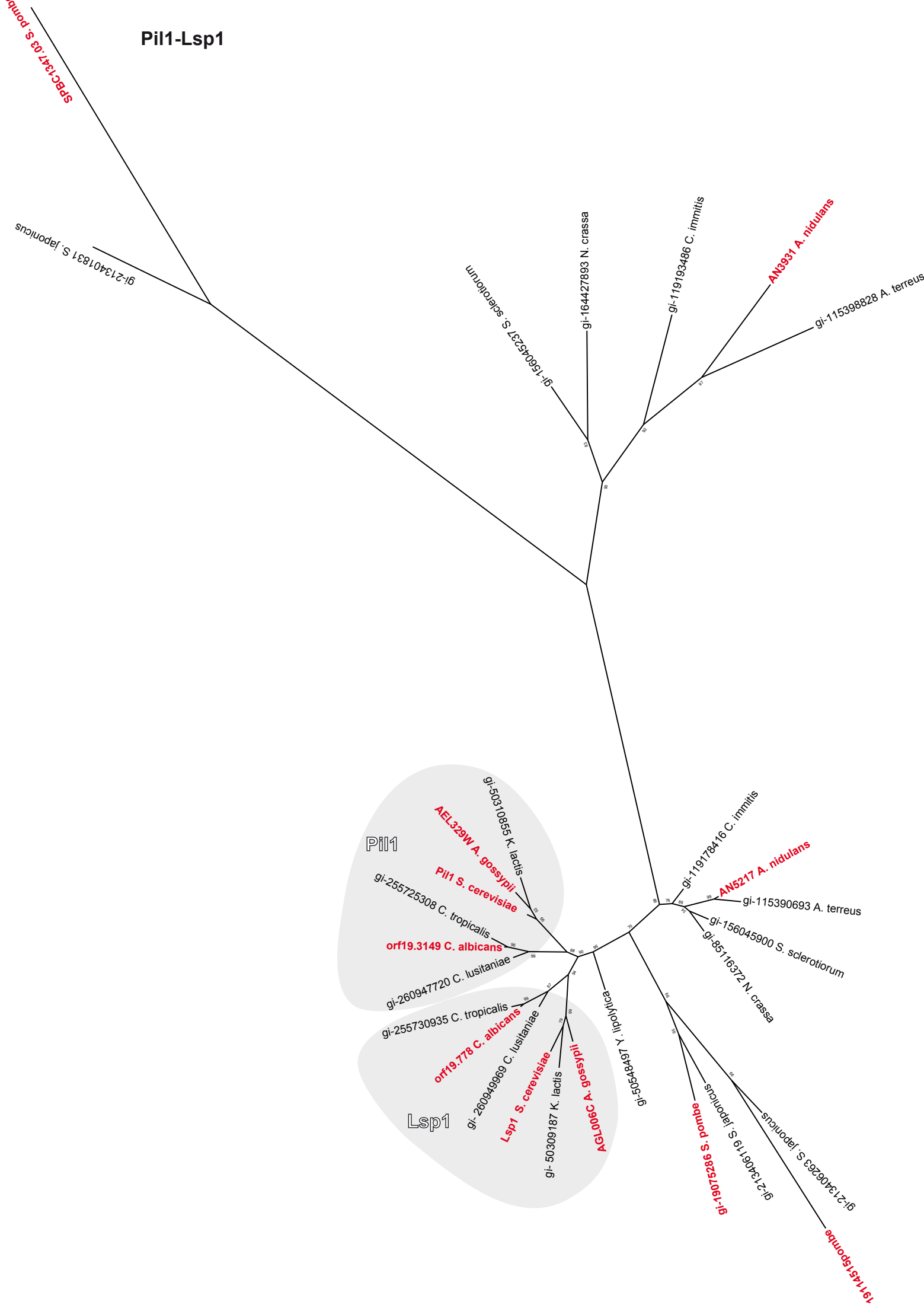
One phylogenetic tree is presented for each *S. cerevisiae* eisosomal protein or protein group analyzed. Proteins in bold red letters correspond to Table 2. Numbers correspond to SH-like branch support. Proteins were named by systematic name for *A. gossypii*, *C. albicans*, *A. nidulans* and *S. pombe*, whereas the standard name was used for *S. cerevisiae* and GI number of NCBI

protein database for the remaining organisms. When a clear out-group appears in the tree it is indicated in green. When evident, gene clades were shaded in grey.

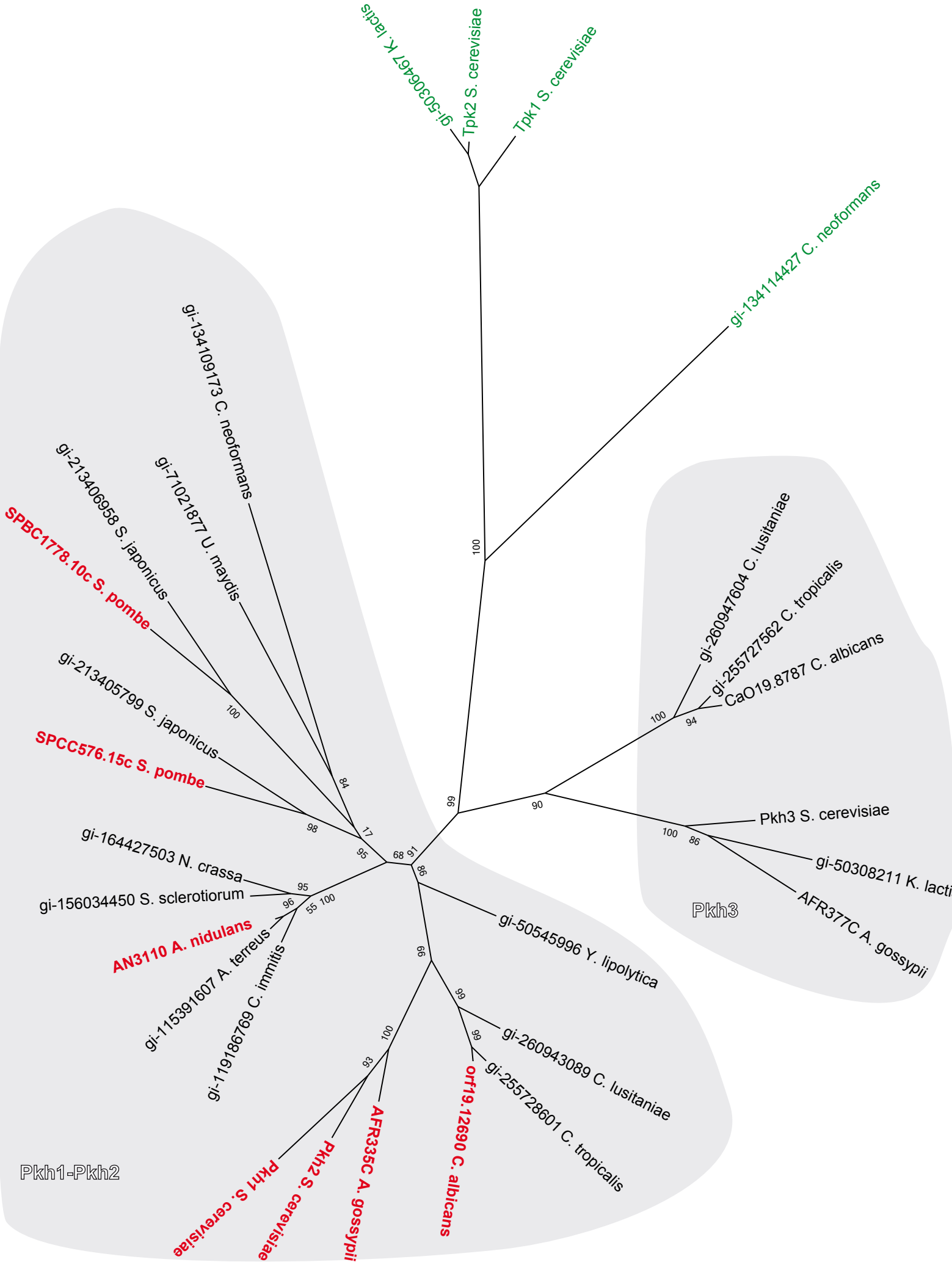
References:

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25:1972-1973
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2011) ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27:1164-1165
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307-321
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33:W557-559
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059-3066
- Katoh K, Toh H (2010) Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26:1899-1900

Pil1-Lsp1



Pkh1-Pkh2



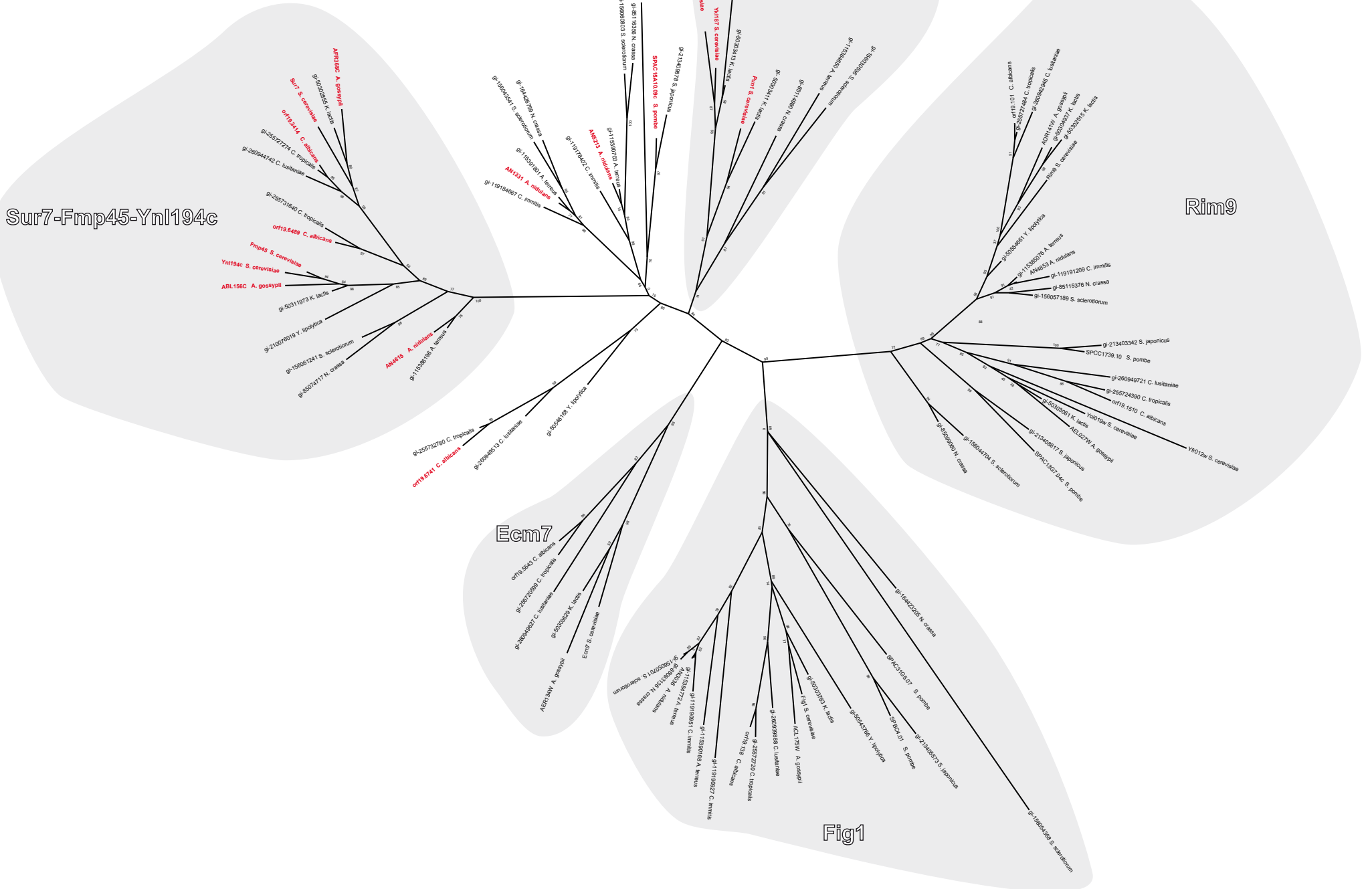
Pkh1-Pkh2

Slm1-Slm2



Slm1-Slm2

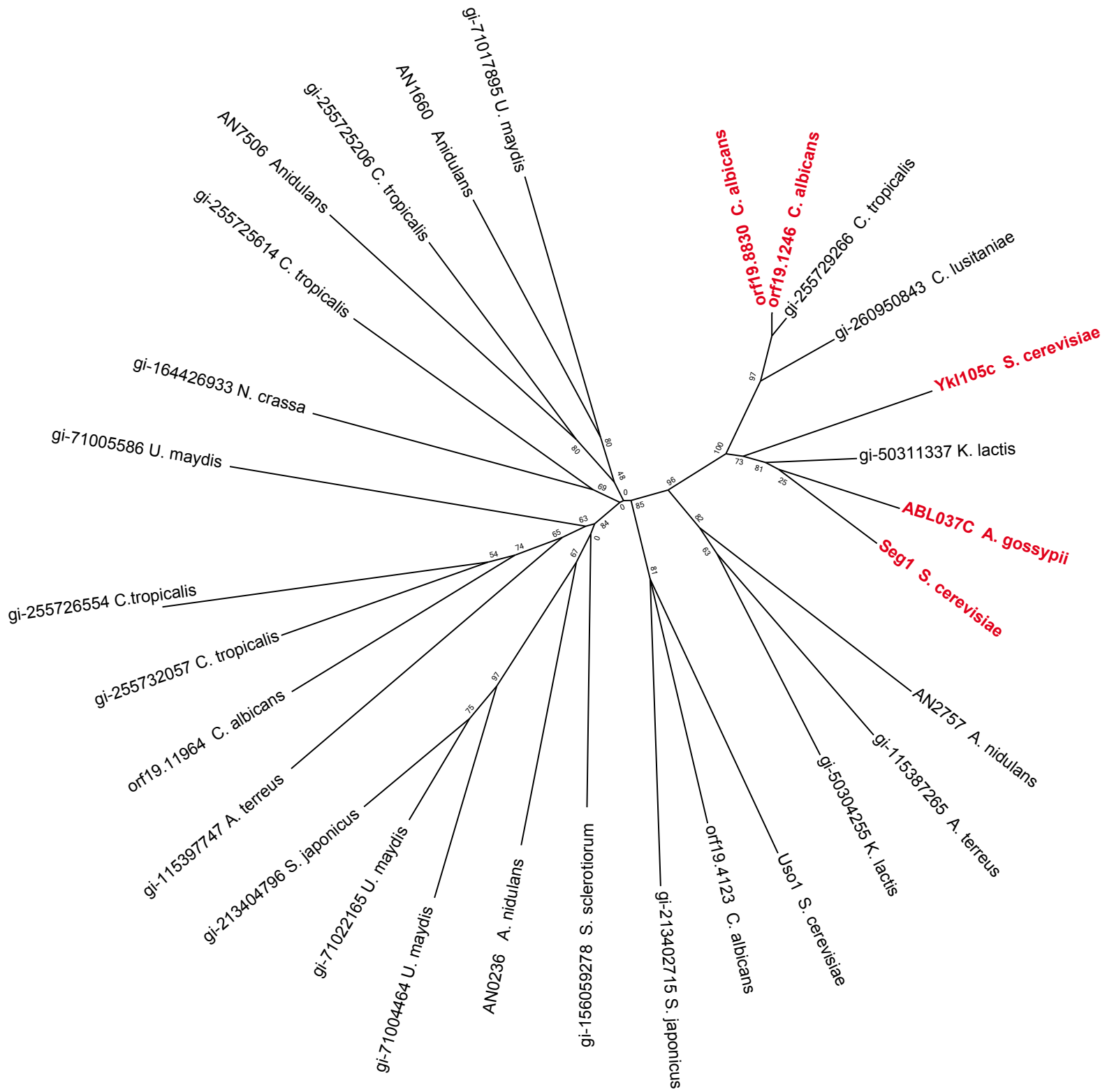
Sur7-Fmp45-Ynl194c-Pun1



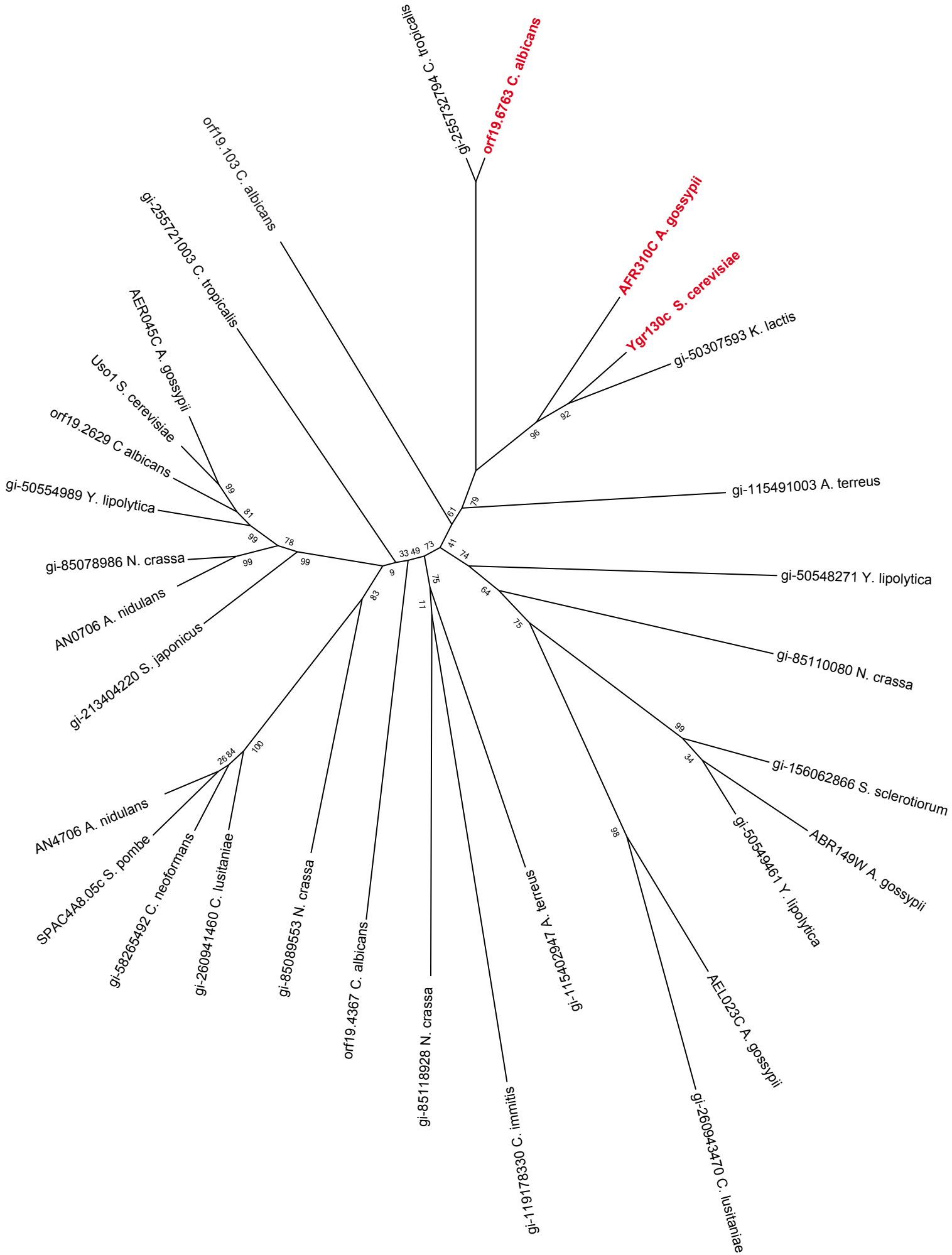
Nce102-Fhn1



Seg1-Ykl105c



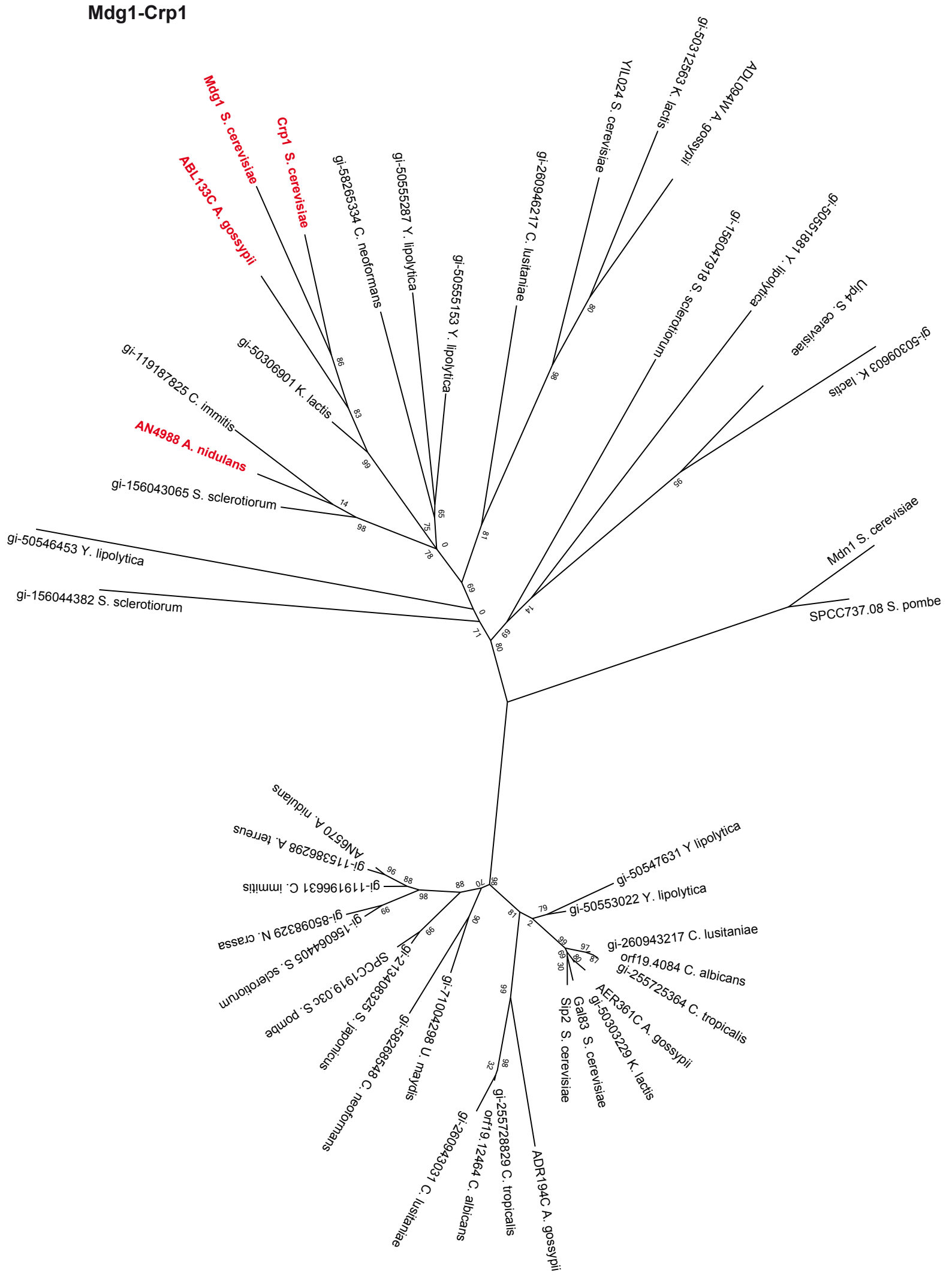
Ygr130c



Pst2-Rfs1-Ycp4



Mdg1-Crp1



Los nanodominios eisosomales están claramente conservados dentro del phylum Ascomycotina. La conservación de los diferentes componentes proteicos eisosomales en todos los hongos estudiados es muy dispar y fue parte del foco de estudio de la presente tesis (ver anexo 2) (Olivera-Couto & Aguilar, 2012).

Pil1p, Lsp1p y algunos otros pocos componentes eisosomales también se encuentran conservados en el grupo de los Basidiomicetes. Sin embargo, con las herramientas bioinformáticas utilizadas (especialmente diseñadas para homologías lejanas), no se han podido detectar homologías claras ni Zygomycetes ni en Chytridiomicetes (Olivera-Couto & Aguilar, 2012) (ver anexo 2 para más detalles).

En cuanto a la biología celular y molecular de los eisosomas en otros hongos del phylum Ascomycotina, se han estudiado cuatro organismos principalmente los cuales han podido mostrar como algunas características están ampliamente conservadas mientras que otras son muy dispares.

Candida albicans

Este hongo patogénico para humanos y que exhibe tanto crecimiento en forma de hifa como de gemas, presenta eisosomas en ambas estructuras (hifas y gemas) formadas por las proteínas Pil1p, Lsp1p, Sur7p and Fmp45p (Alvarez et al, 2008; Douglas et al, 2012; Reijnt et al, 2011; Wang et al, 2011). Los eisosomas de *C. albicans* no se observan en el extremo de las hifas ni las gemas en crecimiento (áreas de formación activa de membrana plasmática), sugiriendo formación por ensamblaje *de novo*, al igual que en *S. cerevisiae* (Reijnt et al, 2011). Sin embargo, a diferencia de *S. cerevisiae*, la delección del ortólogo de SUR7 genera varios fenotipos anormales incluyendo la deslocalización de las septinas del cuello de las gemas, crecimiento polarizado defectuoso, crecimiento ectópico de la pared celular, formación defectuosa de “biofilms” y disminución de la virulencia en un modelo de infección en ratón (Alvarez et al, 2008; Bernardo & Lee, 2010; Douglas et al, 2012; Wang et al, 2011).

Aspergillus nidulans

Los ortólogos de Pil1p/Lsp1p en este hongo (PilA and PilB) Así como el ortólogo de Sur7p (SurG) colocalizan en la periferia de la espora formando estructuras que bajo el microscopio confocal de fluorescencia lucen de manera muy similar a los eisosomas de *S. cerevisiae* (Vangelatos et al, 2010). Sin embargo, si son observadas las hifas en activo crecimiento la organización eisosomal que puede observarse es claramente distinta a la de la levadura del pan: PilA forma estructuras que se observan como puntos mientras que PilB se mantiene con localización citoplasmática y SurG se mantiene en la vacuola y los endosomas. La presencia de PilA es necesaria para que SurG llegue a formar eisosomas en las esporas no así para PilB. Por otro lado la delección del gen codificante para la proteína SURG general deslocalización de PilB (pero no de PilA) (Vangelatos et al, 2010). AnNce102 (el ortólogo de Nce102p) también colocaliza con las estructuras eisosomales en las esporas y tiene un rol celular crucial en la determinación del número y la densidad de eisosomas. AnNce102 junto con PilA regulan en forma negativa las rutas biosintéticas de los esfingolípidos (Athanasopoulos et al, 2015).

Ashbya gossypii

Los Eisosomas en este hongo filamentoso son aún más similares a los de *S. cerevisiae*: Pil1p y Lsp1p forman estructuras que observadas bajo microscopía confocal de fluorescencia lucen como focos puntuales con la misma dinámica de formación que los eisosomas la cual depende de la presencia de Pil1p pero no de Lsp1p. Además de afectar a la organización eisosomal, la delección del gen codificante para la proteína Pil1p, afecta la expansión polar de la superficie durante la formación de las hifas dando lugar a hifas anormales. A diferencia de *S. cerevisiae*, en *A. gossypii* la delección de NCE102 no afecta la organización eisosomal (Seger et al, 2011). El ortólogo de YMR086wp/YKL105cp, SEG1, es necesario para mantener la estabilidad eisosomal (Seger et al, 2011)

Schizosaccharomyces pombe

La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* también presenta eisosomas que pueden ser observados tanto por microscopía de fluorescencia como por microscopia electrónica como estructuras alargadas de 1 a 2 μm de largo, mucho más grandes que las observadas en *S. cerevisiae* (Kabeche et al, 2011; Moor & Muhlethaler, 1963; Streiblova, 1968). *S. pombe* además de los ortólogos de Pil1p y Lsp1p (llamados Pil1 y Pil2) tiene un tercer ortólogo más lejano que fue denominado Meu14. Dicha proteína no es eisosomal sino que se localiza en la membrana plasmática durante el proceso de esporulación y es necesaria para la maduración de las esporas (Okuzaki et al, 2003). Al igual que en *S. cerevisiae*, los eisosomas se forman *de novo* en los sitios activos de crecimiento de la membrana plasmática. Sin embargo, durante la división celular por fisión, los eisosomas se eliminan activamente de la zona donde se dará la formación del tabique, proceso que incluye el desensamblaje e incluso el movimiento direccional de los eisosomas lejos de la zona de la división celular (Kabeche et al, 2011). Experimentos de intercambio de genes entre especies mostraron que existe un mecanismo independiente de Pil1p que regula el largo de los eisosomas, ya que la cepa de *S. pombe* a la cual se le han eliminado los genes codificantes para Pil1 y Pil2 y se le han agregado los genes de *S. cerevisiae* codificantes para Pil1p-GFP, conduce a la formación de eisosomas filamentosos de 1-2 μm de indistinguibles de los observados en células de levadura de fisión de tipo salvaje. Del mismo modo, si se realiza el experimento análogo en *S. cerevisiae*, los eisosomas obtenidos son del largo normal de dicha especie (Kabeche et al, 2011). Al igual que la proteína eisosomal Nce102 en *S. cerevisiae*, la ortóloga en *S. pombe*, Fhn1, presenta una doble localización dinámica fuera y dentro de los eisosomas. Por otro lado, sorprendentemente las proteínas ortólogas a las proteínas Slm1p y Sur7p en *S. pombe* no localizan en los eisosomas (Kabeche et al, 2011).

5. Bibliografía:

Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105

Aguilar PS, Frohlich F, Rehman M, Shales M, Ulitsky I, Olivera-Couto A, Braberg H, Shamir R, Walter P, Mann M, Ejsing CS, Krogan NJ, Walther TC (2010) A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nature structural & molecular biology* **17**: 901-908

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Walter P (2007) *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 1, 5 edn. New York: Garland Publishing, Inc.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403-410

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402

Alvarez FJ, Douglas LM, Rosebrock A, Konopka JB (2008) The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **19**: 5214-5225

Andreeva A, Howorth D, Chandonia JM, Brenner SE, Hubbard TJ, Chothia C, Murzin AG (2008) Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. *Nucleic Acids Res* **36**: D419-425

Apodaca G, Gallo LI, Bryant DM (2012) Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nat Cell Biol* **14**: 1235-1243

Aresta-Branco F, Cordeiro AM, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F, de Almeida RF (2011) Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, and sphingolipid-enriched lipid rafts. *The Journal of biological chemistry* **286**: 5043-5054

Arkhipov A, Yin Y, Schulten K (2008) Four-scale description of membrane sculpting by BAR domains. *Biophys J* **95**: 2806-2821

Astro V, de Curtis I (2015) Plasma membrane-associated platforms: dynamic scaffolds that organize membrane-associated events. *Science signaling* **8**: re1

Athanasopoulos A, Gournas C, Amillis S, Sophianopoulou V (2015) Characterization of AnNce102 and its role in eisosome stability and sphingolipid biosynthesis. *Scientific reports* **5**: 15200

Bagatolli LA, Gratton E (2000) Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophys J* **78**: 290-305

Bagatolli LA, Ipsen JH, Simonsen AC, Mouritsen OG (2010) An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Progress in lipid research* **49**: 378-389

Bagatolli LA, Parasassi T, Gratton E (2000) Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods: a two photon fluorescence microscopy study. *Chemistry and physics of lipids* **105**: 135-147

Barnett JA (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **16**: 755-771

Barnett JA (2003) A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast* **20**: 509-543

Barnett JA (2007) A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics. *Yeast* **24**: 799-845

Barnett JA, Lichtenthaler FW (2001) A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. *Yeast* **18**: 363-388

Bassett DE, Jr., Basrai MA, Connelly C, Hyland KM, Kitagawa K, Mayer ML, Morrow DM, Page AM, Resto VA, Skibbens RV, Hieter P (1996) Exploiting the complete yeast genome sequence. *Current opinion in genetics & development* **6**: 763-766

Berchtold D, Piccolis M, Chiaruttini N, Riezman I, Riezman H, Roux A, Walther TC, Loewith R (2012) Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat Cell Biol* **14**: 542-547

Berchtold D, Walther TC (2009) TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell* **20**: 1565-1575

Berman H, Henrick K, Nakamura H, Markley JL (2007) The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Res* **35**: D301-303

Bernardino de la Serna J, Perez-Gil J, Simonsen AC, Bagatolli LA (2004) Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant

membranes at physiological temperatures. *The Journal of biological chemistry* **279**: 40715-40722

Bernardo SM, Lee SA (2010) *Candida albicans* SUR7 contributes to secretion, biofilm formation, and macrophage killing. *BMC microbiology* **10**: 133

Brach T, Specht T, Kaksonen M (2011) Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *Journal of cell science* **124**: 328-337

Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology* **14**: 111-136

Chong YT, Koh JL, Friesen H, Duffy SK, Cox MJ, Moses A, Moffat J, Boone C, Andrews BJ (2015) Yeast Proteome Dynamics from Single Cell Imaging and Automated Analysis. *Cell* **161**: 1413-1424

Danielli JF, Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **5**: 495-508

Davies RB (1987) Hypothesis testing when a nuisance parameter is present only under the alternative. *Biometrika* **74**: 33-43

Dawson JC, Legg JA, Machesky LM (2006) Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends in cell biology* **16**: 493-498

de Almeida RF, Fedorov A, Prieto M (2003) Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys J* **85**: 2406-2416

Demel RA, Jansen JW, van Dijck PW, van Deenen LL (1977) The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **465**: 1-10

Deng C, Xiong X, Krutchinsky AN (2009) Unifying fluorescence microscopy and mass spectrometry for studying protein complexes in cells. *Mol Cell Proteomics* **8**: 1413-1423

Di Rienzo C, Gratton E, Beltram F, Cardarelli F (2013) Fast spatiotemporal correlation spectroscopy to determine protein lateral diffusion laws in live cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 12307-12312

Digman MA, Dalal R, Horwitz AF, Gratton E (2008) Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophys J* **94**: 2320-2332

Douglas LM, Wang HX, Keppler-Ross S, Dean N, Konopka JB (2012) Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*. *mBio* **3**

Dujon B (2010) Yeast evolutionary genomics. *Nature reviews Genetics* **11**: 512-524

Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schonle A, Hell SW (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**: 1159-1162

Engel SR, Cherry JM (2013) The new modern era of yeast genomics: community sequencing and the resulting annotation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* strains at the *Saccharomyces* Genome Database. *Database : the journal of biological databases and curation* **2013**: bat012

Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A (2008) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* **426**: 145-159

Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Jr., Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA (2005) A comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research* **46**: 839-861

Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**: D211-222

Fishov I, Woldringh CL (1999) Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**: 1166-1172

Fröhlich F, Christiano R, Olson DK, Alcazar-Roman A, DeCamilli P, Walther TC (2014) A role for eisosomes in maintenance of plasma membrane phosphoinositide levels. *Molecular Biology of the Cell* **25**: 2797-2806

Frohlich F, Moreira K, Aguilar PS, Hubner NC, Mann M, Walter P, Walther TC (2009) A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *The Journal of cell biology* **185**: 1227-1242

Frost A, Unger VM, De Camilli P (2009) The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**: 191-196

Gallop JL, McMahon HT (2005) BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochemical Society symposium*: 223-231

Goddard MR, Greig D (2015) *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Research* **15**: fov009-fov009

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-547

Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarova M, Tanner W (2008a) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *The Journal of cell biology* **183**: 1075-1088

Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarova M, Tanner W (2008b) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *The Journal of cell biology* **183**: 1075-1088

Grossmann G, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007a) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* **26**: 1-8

Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007b) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *GBM Annual Spring meeting Mosbach 2007* **2007**: 1710

Grossmann G, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W (2006) Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **5**: 945-953

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704

Hansen CG, Nichols BJ (2010) Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends in cell biology* **20**: 177-186

Hess ST, Gould TJ, Gudheti MV, Maas SA, Mills KD, Zimmerberg J (2007) Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 17370-17375

Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**: 275-282

Kabeche R, Baldissard S, Hammond J, Howard L, Moseley JB (2011) The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast. *Mol Biol Cell* **22**: 4059-4067

Karotki L, Huiskonen JT, Stefan CJ, Ziolkowska NE, Roth R, Surma MA, Krogan NJ, Emr SD, Heuser J, Grunewald K, Walther TC (2011) Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *The Journal of cell biology* **195**: 889-902

Klose C, Ejsing CS, Garcia-Saez AJ, Kaiser HJ, Sampaio JL, Surma MA, Shevchenko A, Schwille P, Simons K (2010) Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains. *The Journal of biological chemistry* **285**: 30224-30232

Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N, Mann M (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature methods* **11**: 319-324

Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**: 351-378

Lauwers E, Andre B (2006) Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. *Traffic* **7**: 1045-1059

Lee SH, Kerff F, Chereau D, Ferron F, Klug A, Dominguez R (2007) Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure* **15**: 145-155

Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular ecology* **16**: 2091-2102

Lenne PF, Wawrezynieck L, Conchonaud F, Wurtz O, Boned A, Guo XJ, Rigneault H, He HT, Marguet D (2006) Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *The EMBO journal* **25**: 3245-3256

Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**: 46-50

Lopez D, Kolter R (2010) Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev* **24**: 1893-1902

Luo G, Gruhler A, Liu Y, Jensen ON, Dickson RC (2008) The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *The Journal of biological chemistry* **283**: 10433-10444

Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2003) Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* **14**: 4427-4436

Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2004) Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *Journal of cell science* **117**: 6031-6041

Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: D237-240

McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**: 590-596

Moor H, Muhlethaler K (1963) Fine Structure in Frozen-Etched Yeast Cells. *The Journal of cell biology* **17**: 609-628

Moreira KE, Schuck S, Schrul B, Frohlich F, Moseley JB, Walther TC, Walter P (2012) Seg1 controls eisosome assembly and shape. *The Journal of cell biology* **198**: 405-420

Moreira KE, Walther TC, Aguilar PS, Walter P (2009) Pil1 controls eisosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **20**: 809-818

Mouritsen OG, Bloom M (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys J* **46**: 141-153

Mueller NS, Wedlich-Soldner R, Spira F (2012) From mosaic to patchwork: matching lipids and proteins in membrane organization. *Molecular membrane biology* **29**: 186-196

Nagle JF, Tristram-Nagle S (2000a) Lipid bilayer structure. *Current opinion in structural biology* **10**: 474-480

Nagle JF, Tristram-Nagle S (2000b) Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 159-195

Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**: 205-217

Okuzaki D, Satake W, Hirata A, Nojima H (2003) Fission yeast *meu14+* is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. *Journal of cell science* **116**: 2721-2735

Olivera-Couto A, Aguilar PS (2012) Eisosomes and plasma membrane organization. *Molecular Genetics and Genomics* **287**: 607-620

Olivera-Couto A, Grana M, Harispe L, Aguilar PS (2011) The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Molecular Biology of the Cell* **22**: 2360-2372

Olivera-Couto A, Salzman V, Mailhos M, Digman MA, Gratton E, Aguilar PS (2015) Eisosomes are dynamic plasma membrane domains showing pil1-lsp1 heteroligomer binding equilibrium. *Biophysical journal* **108**: 1633-1644

Parton RG, Simons K (2007) The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 185-194

Pasteur L (1860) Memoire sur la fermentation alcoolique. *Annales de chimie et de physique* **58**: 4

Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**: 495-499

Phillips MC, Ladbrooke BD, Chapman D (1970) Molecular interactions in mixed lecithin systems. *Biochim Biophys Acta* **196**: 35-44

Rankin BR, Moneron G, Wurm CA, Nelson JC, Walter A, Schwarzer D, Schroeder J, Colon-Ramos DA, Hell SW (2011) Nanoscopy in a living multicellular organism expressing GFP. *Biophys J* **100**: L63-65

Reijnt P, Walther A, Wendland J (2011) Dual-colour fluorescence microscopy using yEmCherry-/GFP-tagging of eisosome components Pil1 and Lsp1 in *Candida albicans*. *Yeast* **28**: 331-338

Ritchie K, Iino R, Fujiwara T, Murase K, Kusumi A (2003) The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review). *Molecular membrane biology* **20**: 13-18

Ritchie K, Shan XY, Kondo J, Iwasawa K, Fujiwara T, Kusumi A (2005) Detection of non-Brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking. *Biophys J* **88**: 2266-2277

Robinson JM, Karnovsky MJ (1980) Evaluation of the polyene antibiotic filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **28**: 161-168

Rodriguez-Boulan E, Macara IG (2014) Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**: 225-242

Russell RB, Barton GJ (1992) Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins* **14**: 309-323

Sadreyev RI, Baker D, Grishin NV (2003) Profile-profile comparisons by COMPASS predict intricate homologies between protein families. *Protein Sci* **12**: 2262-2272

Sako Y, Kusumi A (1995) Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether. *The Journal of cell biology* **129**: 1559-1574

Sanchez BJ, Nielsen J (2015) Genome scale models of yeast: towards standardized evaluation and consistent omic integration. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **7**: 846-858

Sankaram MB, Thompson TE (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 8686-8690

Scharf C, Virgo N, Cleaves HJ, 2nd, Aono M, Aubert-Kato N, Aydinoglu A, Barahona A, Barge LM, Benner SA, Biehl M, Brassler R, Butch CJ, Chandru K, Cronin L, Danielache S, Fischer J, Hernlund J, Hut P, Ikegami T, Kimura J, Kobayashi K, Mariscal C, McGlynn S, Menard B, Packard N, Pascal R, Pereto J, Rajamani S, Sinapayen L, Smith E, Switzer C, Takai K, Tian F, Ueno Y, Voytek M, Witkowski O, Yabuta H (2015) A Strategy for Origins of Life Research. *Astrobiology* **15**: 1031-1042

Schroeder R, London E, Brown D (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12130-12134

Seger S, Rischatsch R, Philippsen P (2011) Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Journal of cell science* **124**: 1629-1634

Sengupta P, Baird B, Holowka D (2007) Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 583-590

Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572

Simons K, Sampaio JL (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: a004697

Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731

Sivadon P, Peypouquet MF, Doignon F, Aigle M, Crouzet M (1997) Cloning of the multicopy suppressor gene SUR7: evidence for a functional relationship between the yeast actin-binding protein Rvs167 and a putative membranous protein. *Yeast* **13**: 747-761

Slaughter BD, Schwartz JW, Li R (2007) Mapping dynamic protein interactions in MAP kinase signaling using live-cell fluorescence fluctuation spectroscopy and imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20320-20325

Soding J (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* **21**: 951-960

Spira F, Dominguez-Escobar J, Muller N, Wedlich-Soldner R (2012a) Visualization of cortex organization and dynamics in microorganisms, using total internal reflection fluorescence microscopy. *Journal of visualized experiments : JoVE*: e3982

Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich-Soldner R (2012b) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol* **14**: 640-648

Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich-Söldner R (2012c) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nature Cell Biology* **14**: 640-648

Stradalova V, Stahlschmidt W, Grossmann G, Blazikova M, Rachel R, Tanner W, Malinsky J (2009) Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *Journal of cell science* **122**: 2887-2894

Streiblova E (1968) Surface structure of yeast protoplasts. *J Bacteriol* **95**: 700-707

Tanos B, Rodriguez-Boulan E (2008) The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* **27**: 6939-6957

Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* **172**: 34-44

Valdez-Taubas J, Pelham HR (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Current biology : CB* **13**: 1636-1640

van Meer G, Stelzer EH, Wijnaendts-van-Resandt RW, Simons K (1987) Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *The Journal of cell biology* **105**: 1623-1635

Vangelatos I, Roumelioti K, Gournas C, Suarez T, Scazzocchio C, Sophianopoulou V (2010) Eisosome organization in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell* **9**: 1441-1454

Veatch SL, Keller SL (2002) Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Physical review letters* **89**: 268101

Walther TC, Aguilar PS, Frohlich F, Chu F, Moreira K, Burlingame AL, Walter P (2007) Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *The EMBO journal* **26**: 4946-4955

Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**: 998-1003

Wang HX, Douglas LM, Amanianda V, Latge JP, Konopka JB (2011) The *Candida albicans* Sur7 protein is needed for proper synthesis of the fibrillar component of the cell wall that confers strength. *Eukaryotic cell* **10**: 72-80

Young ME, Karpova TS, Brugger B, Moschenross DM, Wang GK, Schneiter R, Wieland FT, Cooper JA (2002) The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Molecular and cellular biology* **22**: 927-934

Yu H, Schulten K (2013) Membrane sculpting by F-BAR domains studied by molecular dynamics simulations. *PLoS computational biology* **9**: e1002892

Zhang X, Lester RL, Dickson RC (2004) Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *The Journal of biological chemistry* **279**: 22030-22038